Année universitaire 2010-2011

Université Paris-sud 11 – Faculté des Sciences d'Orsay

Université de Tunis El Manar – Faculté des Sciences de Tunis

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Ecophysiologie végétale

Présentée par : **Touhami RZIGUI**

Pour obtenir le grade de :

Docteur en Sciences de l'Université Paris-sud 11 et de l'Université de Tunis El Manar

Analyse de la réponse d'un mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris* au manque d'eau.

Soutenue le 23 Septembre 2011 devant la commission d'examen :

Pr	Michel	Dron	Président
Dr	Fabrice	Rebeillé	Rapporteur
Pr	Ali	Ferchichi	Rapporteur
Pr	Samira	Smiti	Examinateur
Dr	Peter	Streb	Directeur de thèse
Pr	Saida	Ammar	Co-Directrice de thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord Dr Peter Streb (Maître de Conférences à l'Université Paris XI) pour m'avoir accueilli dans son équipe au sein du laboratoire 'Ecologie, Systématique et Evolution', et d'avoir encadré mon travail. Merci d'avoir fait en sorte que je puisse faire cette thèse.

Je remercie également Saida Ammar, Professeur Emérite à la Faculté des Sciences de Tunis pour tout le temps qu'elle m'a consacré au cours du Master et maintenant comme co-directrice de ma thèse.

Je tiens à remercier Dr Fabrice Rebeillé et le Professeur Ali Ferchichi de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail en acceptant d'en être les rapporteurs, et les professeurs Michel Dron et Samira Smiti qui ont accepté d'en être les examinateurs.

Un grand merci à Dr Rosine De Paepe pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur le mutant mitochondrial de *Nicotiana sylvestris*, de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de son aide, et pour les nombreux échanges scientifiques fructueux.

Un grand merci au Professeur Gabriel Cornic de m'avoir fait profiter de ses connaissances au cours de nos réunions, et de m'avoir initié aux systèmes des échanges gazeux.

Merci à l'ensemble du département Ecophysiologie Végétale, Eric Dufrêne**,** Jean-Yves Pontailler, Laurent Vanbostal, Chantal Fresneau, Kamel Soudani, Zoran Cerovic, Nicolas Delpierre, Stéphane Bazot, Jaleh Ghashghaie et surtout Daniel Berveiller pour son aide et sa sympathie**.** Tous mes remerciements vont aussi à Noureddine Bouaïcha pour son soutien et son aide. Un merci spécial à Claire Damesin pour son aide et sa gentillesse.

Je remercie tous les doctorants et les post-doctorants de notre équipe : Constance Laureau, Gwendal Latouche, Alissar Cheaib, Sébastien Bellow, Gabriel Hmimina et un merci particulier à Alice Michelot nouveau docteur dans l'équipe. Je souhaite également remercier Claire Marsden et Thomas Eglin.

Merci à Amandine et Lionel de s'être occupés de mes plants de tabacs lorsque cela s'est avéré nécessaire, de leur sympathie lors de mes passages à la serre.

Je veux remercier du fond du cœur mes amis pour leur soutien et leur encouragement : Mohammed Hamad, Mounir Dahmani, Said Ettayeb, Walid Zorrig, Hichem Smairi, Chamseddine Mediouni, Mohammed Nakkach, Rachid Sendi et Walid Elifa.

Enfin toute ma reconnaissance est adressée à ma famille, mes parents à qui je dois mon éducation, ma réussite dans la vie et dans mes études, à mes sœurs et mes frères, pour tous ce qu'ils ont fait pour moi, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis au cours de mes études.

Je remercie toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin.

Sommaire

Contexte de la thèse 8

Introduction 11
I. La photosynthèse et la respiration 11
I.1. Généralités sur la chaîne respiratoire mitochondriale 12
I.2. La photosynthèse 14
I.2.1 Les réactions primaires de la photosynthèse 14
I.2.2. Réactions secondaires de la photosynthèse: fixation du CO2 22
I.2.3. Réponse de la photosynthèse au dioxyde de carbone et à l'oxygène 24
I.3. La photorespiration : communication inter-compartiments dans le métabolisme foliaire 27
II. Les plantes et la sécheresse 30
II.1. État hydrique de la plante 31
II.1.1. Potentiel hydrique et ses composants 31
II.1.2. Le contenu en eau 33
II.1.3. Les mouvements d'eau dans la cellule 33
II.2. conductance hydraulique foliaire 33
II.2.1. Généralités 33
II .2.2. Les aquaporines 36
II.2.3. La cavitation 37
II.3. Impacts et réponses des plantes au stress hydrique 37
II.3.1. La réponse des stomates à la contrainte hydrique : contrôle hormonale *vs.* contrôle hydraulique 37
II.3.2. Les limitations imposées par la contrainte hydrique sur la photosynthèse 40
II.3.3. Effets de la contrainte hydrique sur la respiration 42
II.3.4. interactions mitochondrie-chloroplaste durant le stress hydrique 43
II.3.5. Implication de la mitochondrie dans la tolérance à la sécheresse 44

III. Etude de mutants mitochondriaux : une approche indispensable pour l'obtention d'une meilleure compréhension du rôle de la mitochondrie et des interactions mitochondries/chloroplastes dans la tolérance au stress hydrique 47
III.1. Les mutants mitochondriaux 48
III.2. Le mutant CMSII de Nicotiana sylvestris 49
III.2.1. Caractéristiques respiratoires du mutant CMSII 49
III.2.2. Conséquences physiologiques de la mutation 50
IV. Objectifs de l'étude 54

Matériels et Méthodes 57
I. Materiel Vegetal 58
I.1. Nicotiana sylvestris WT et CMSII 58
I.2. Conditions de culture 58
II. Méthodes 59
II.1. Mesure de l'état hydrique des plantes 59
II.1.1. Contenu relative en eau 59

II.1.2. Détermination des courbes Pression-Volume 59
II.1.4. Mesure de point de congélation 60
II.2. la conductance hydraulique 60
II.2.1. Principe 60
II.2.2. Capacitance 61
II.2.3. Réponse de la conductance hydraulique foliaire (K_{fol}) à la diminution de potentiel hydrique foliaire (Ψ_{fol}) : vulnérabilité à la cavitation 62
II.3. Echanges gazeux foliaires et fluorescence chlorophyllienne 63
II.3.1. Principes 63
II.3.2. Courbes de réponses de la photosynthèse à la concentration de CO_2 67
II.3.3. Calculs basés sur le couplage des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne 68
II.3.4.. Calcul de la limitation stomatique 70
II.4. application d'un stress hydrique couplé à différente intensité lumineuse 70
II.5. Dosage des pigments et des protéines solubles totales 70
II.5.1. Chlorophylles et caroténoïdes 70
II.5.2. Protéines solubles totales 71
II.6. Dosage des métabolites avec GC-MS 72
II.7. Analyse des acides aminés par HPLC quantitative 73
III. Analyses staististiques 74

Résultats 75
I. Comparaison des paramètres hydriques entre des plantes WT et des mutants CMS 75
I.1. Croissance et caractéristique des plantes 76
I.2. Les stomates sont plus fermés chez les plantes CMS 77
I.3 Les facteurs qui influencent les mouvements des stomates 78
I.3.1 Réponse des stomates à la fraction molaire intercellulaire de CO_2 78
I.3.2. Statut hydrique des plantes 79
I.3.3. La conductance hydraulique 82
II. Comparaison des plantes WT et CMS de *Nicotian sylvestris* au cours de la déshydratation 84
II.1 Contexte 85
II.2. Changement du contenu relatif en eau au cours de la déshydratation 85
II.3. Fermeture stomatique au cours de la déshydratation 86
II.3.1. Estimation de la perte d'eau au cours de la déshydratation 86
II.3.2. la régulation des stomates au cours de la déshydratation 87
II.3.3 Analyse de la déshydratation des disques foliaires et des feuilles détachés 88
II.4. Inhibition de la photosynthèse au cours de la déshydratation 90
II.5. Variation de flux d'électrons au cours de la déshydratation 92
II.6. Disponibilité du CO_2 au niveau de chloroplaste sous stress hydrique 93
II.7. La respiration au cours de la déshydratation 94
II.8. Vulnérabilité de la feuille à la cavitation 95
III. Limitations physiologiques et métaboliques de la photosynthèse chez les plantes WT et CMS de *Nicotian sylvestris* maintenues à un RWC de 80% 97
III.1 Contexte 98
III.2. Photosynthèse en conditions ambiantes de CO2 et d'oxygène 98
III.3. les limitations de la photosynthèse chez les deux génotypes en conditions hydriques limitantes 99
III.3.1. Réponse de l'assimilation nette de CO_2 par une feuille au CO_2 99
III.3.2. Variations et régulation du flux d'électrons photosynthétiques (ETR) 101

III.3.3. Estimation des vitesses d'oxygénation (J_o) et de carboxylation (J_c)..... 106
III.3.4. La diffusion du CO_2 109
III.4. Contenu en métabolites 109
III.4 .1 Métabolites dérivés du cycle photorespiratoire..... 109
III.4.2 Les sucres solubles sont plus accumulés chez les WT sous l'effet de la contrainte hydrique..... 114
III.4.3 Le contenu en acides aminés diminue chez les CMS80..... 116

Discussion Générale 119
I. La plus faible transpiration du CMS lui confère une meilleure résistance à la déshydratation 120
II. L'inhibition d'A_n dépend de g_s au cours de la déshydratation..... 123
III. Acclimatation à un RWC de 80% 124
III.1. Limitation stomatique et non stomatique de la photosynthèse 125
III.2 Variations et régulation du flux d'électrons photosynthétiques (ETR)..... 127
III.3. Métabolites du cycle photorespiratoire..... 129
III.4. Les limitations diffusives non-stomatiques..... 130
III.5. Inhibition de l'activité de la Rubisco 131
III.6. L'accumulation des sucres et des acides aminés suite au maintien à un RWC de 80% est différente entre les plantes WT et CMS..... 132

Conclusions et Perspectives..... 134

Références Bibliographiques..... 138

Annexe..... 158

Liste des abréviations :

ABA : acide abscissique
AOX : alternative oxydase
Amax : assimilation maximale
An : assimilation nette en CO_2
ATP : adénosine triphosphate
ADP : adénosine diphosphate
BSA : Bovine serum albumin
COX : cytochrome oxydase
Ca : concentration en CO_2 de l'air ambiant
Cc : concentration en CO_2 au niveau des sites de carboxylation
Ci : concentration en CO_2 dans la cavité sous-stomatique
CMSII /WT : Mutant male cytoplasmique et sauvage de *Nicotiana sylvestris*.
Dans les parties Résultats et Discussion le mutant bien hydratée est indiqué par CMS.
CMS80/WT80 : plantes CMSII et WT maintenues à un RWC de 80%
CO_2 : Dioxyde de carbone
Car : caroténoïdes
Chl : chlorophylles
DCMU : 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthyluré
FADH : flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
E : transpiration
ETR : transport électronique linéaire (electron transport rate)
Fdx : ferrédoxine
F_0 : rendement de fluorescence minimal d'une feuille adaptée à l'obscurité
F_0' : rendement de fluorescence minimal d'une feuille adaptée à la lumière
Fm : rendement de fluorescence maximal d'une feuille adaptée à l'obscurité
Fm' : rendement de fluorescence maximal d'une feuille adaptée à la lumière
Fv : fluorescence variable
Fs = Emission de fluorescence à l'état stationnaire sous une lumière actinique
Fp = maximum de l'émission de fluorescence immédiatement après le passage d'une feuille de l'obscurité à la lumière
Fv/Fm : rendement quantique maximum de la photochimie du PSII
Fv'/Fm' : rendement quantique maximum de la photochimie des centres ouverts chez une feuille à la lumière
gm : conductance mésophyllienne
gs : conductance stomatique
Gly : glycine
Glu : glutamate
GDC : glycine décarboxylase
Gln :glutamine
GS : glutamine synthétase
GOGAT : glutamine oxoglutarate
H_20_2 : Peroxyde d'hydrogène
HPLC :chromatographie liquide à haute performance
IRGA : InfraRed Gas Analysis
Jt : flux électronique total
J_C : flux électronique vers la carboxylation
Jmax : flux électronique en condition de lumière saturante
J_O : flux électronique vers la photorespiration
K : conductance hydraulique
K_{fol} : conductivité hydraulique foliaire
Kc, Ko : constance cinétique de la Rubisco, respectivement pour le CO_2 et l'O_2

Ls : limitation stomatique
MDH : malate déshydrogénase
NPQ : quenching non-photochimique
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
NMS : nuclear male sterility
NCS : non chromosomal stripe
O : pression partielle en oxygène dans l'espace intercellulaire
OAA : oxaloacétate
Pi : phosphate inorganique
PSI : photosystème I
PSII : photosystème II
PQ : plastoquinones
P : pression de turgescence
Po : pression de turgescence à la saturation
qp = concentration relative des centres ouverts ou quenching photochimique
$\mathbf{Q_A}$: quinone A
$\mathbf{Q_B}$: quinone B
RWC : teneur relative en eau (Relative Water Content)
$\mathbf{RWC_{TLP}}$: teneur relative en eau au point de la perte de turgescence (TLP : turgor loss point)
Rd : respiration mitochondriale à la lumière
Rn : respiration mitochondriale à l'obscurité
ROS : radical oxygen species
Rubisco : Rubilose-1,5-biphosphate carboxylase
RuBP : Ribulose-1,5-bisphosphatae
SPS : sucrose phosphate synthase
Ser : sérine
SHMT : sérinehydroxyméthyltransférase
TCA : le cycle de l'acide tricarboxylique
VMT : virus mosaïque de Tabac (Tobacco mosaic virus)
Vc : taux de carboxylation
Vcmax : taux de carboxylation maximal
VPDL: leaf vapor pressure deficit
α: coefficient d'absorption de la lumière
$\mathbf{\Phi_{CO2}}$: efficience de fixation du CO2
$\mathbf{\Phi_{PSII}}$ = rendement quantique opérationnelle du PSII
$\mathbf{\Pi}$: potentiel osmotique
$\mathbf{\Pi_0}$: potentiel osmotique à saturation
$\mathbf{\Pi_{TLP}}$: potentiel osmotique au point de la perte de turgescence (TLP : turgor loss point)
$\mathbf{\Psi}$: potentiel hydrique
$\mathbf{\Psi_{TLP}}$: potentiel hydrique à la perte de turgescence
$\mathbf{\Psi f_{ol}}$: potentiel hydrique foliaire
$\mathbf{\Psi cav}$: potentiel hydrique de cavitation
μ^*_w : potentiel chimique de l'eau pure
μ_w : potentiel chimique de l'eau dans la solution
Γ : point de compensation en CO2
Γ^* : point de compensation en CO2 en l'absence de respiration mitochondriale
τ: facteur de spécificité de la Rubisco
2-OG : 2-oxoglutarate

Contexte de la thèse

La sécheresse est l'un des facteurs principaux qui limitent la croissance des plantes et la production des écosystèmes dans de nombreuses régions du monde. Le stress hydrique modifie sensiblement le métabolisme des plantes et affecte profondément les écosystèmes et l'agriculture. Une meilleure compréhension des mécanismes qui permettent aux plantes de survivre durant une sécheresse prolongée contribuerait à sélectionner des génotypes plus tolérants à la sécheresse en identifiant les traits spécifiques qui déterminent la performance des cultures en conditions de déficit hydrique. En effet, l'acclimatation à la sécheresse est le résultat d'intégration de plusieurs événements, allant de la perception et la transduction du signal de la contrainte jusqu'à la régulation de l'expression des gènes et des changements métaboliques.

Un stress hydrique se développe chez les plantes terrestres lorsque l'eau transpirée par les feuilles dépasse celle absorbée de l'environnement par leurs racines. Ainsi, la teneur relative en eau (RWC), le potentiel hydrique (Ψ) et la turgescence des cellules sont réduites alors que les concentrations des ions et d'autres solutés augmentent, ce qui diminue le potentiel osmotique (Ψ_{Π}.). En subissant le stress hydrique, les plantes développent une série de réponses à l'échelle de la plante entière, ainsi qu'au niveau cellulaire et moléculaire. Les pores stomatique à la surface foliaire se ferment progressivement en diminuant la conductance à la diffusion de vapeur d'eau et donc ralentissant la transpiration et le rythme à laquelle le déficit en eau se développe.

En outre, l'assimilation photosynthétique de CO_2 (A_n) diminue souvent d'une façon concomitante avec la diminution de la conductance à la diffusion de CO_2. Il ya une controverse sur les mécanismes par lesquelles l'activité photosynthétique est diminué sous l'effet du stress hydrique. La fermeture stomatique est probablement le facteur majeur qui contrôle la photosynthèse mais le rôle relatif de la limitation stomatique sur la photosynthèse dépend de la sévérité du déficit hydrique. En cas de stress sévère, la photosynthèse peut être plus contrôlée par la capacité des chloroplastes à fixer le CO_2 (activité de la Rubisco) que par l'augmentation de la résistance à la diffusion de CO_2. En plus, la sécheresse conduit généralement à l'accumulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Une production excessive de ROS peut causer un stress oxydatif et affecte ainsi la fonction normale des

cellules. Une augmentation de l'abondance des ROS peut être considérée comme une menace pour la cellule, et la capacité de détoxifier les ROS et de réduire leurs effets néfastes peut être corrélée avec la tolérance des plantes au stress hydrique. Ils peuvent agir aussi comme des messagers secondaires impliqués dans la transduction du signal de stress (Foyer et Noctor, 2005).

Un autre facteur pour déterminer l'impact du stress hydrique sur la productivité des plantes est l'effet qu'il impose sur la respiration mitochondriale. Bien que le taux de la respiration soit généralement d'un ordre de grandeur inférieur à celui de l'assimilation nette de CO_2, collectivement la respiration des racines et des parties aériennes joue un rôle majeur dans la détermination du bilan du carbone et la productivité des plantes. Quelles que soient les conditions d'hydratation, le maintien de la respiration peut avoir un rôle positif pour la croissance et la survie des plantes. Par exemple, indépendamment de la disponibilité en eau, les chloroplastes et les mitochondries des feuilles sont très interdépendants, ce qui reflète les échanges considérables d'énergie et de métabolites entre les deux organites et le cytosol. La chaîne respiratoire aide à la dissipation de l'excès de réducteurs originaires des chloroplastes (Yoshida *et al.,* 2007). Les voies non phosphorylantes de la respiration, impliquant l'alternative oxidase (AOX) et les NAD(P)H déshydrogénases, sont considérés comme des systèmes de dissipation efficaces de ces réducteurs.

Bien qu'il y ait des preuves pour un rôle crucial des mitochondries dans la réponse au stress hydrique, en raison de leur rôle central dans les flux d'énergie et dans la fourniture de métabolites permettant le fonctionnement du métabolisme général, l'incorporation de l'azote inorganique par la plante etc., il ya peu d'informations sur leurs rôles dans l'acclimatation des plantes au manque d'eau. Une hypothèse avancée est celle de leur rôle dans le maintien de l'état redox de la cellule, incluant le chloroplaste, à travers le fonctionnement de la navette malate oxalo-acétate (Pastore *et al.,* 2007). Le présent travail a pour objectif principal l'obtention de nouvelles informations sur la participation proposée de la mitochondrie végétale dans la tolérance à la sécheresse.

Pour cela les effets d'une mutation mitochondriale sur les réponses physiologiques et métaboliques au manque d'eau ont été examinés en comparant le type sauvage (WT) de *Nicotiana sylvestris* à son mutant CMSII dépourvu du complexe I de la chaîne respiratoire principale (Pla *et al.,* 1995 ; Guettierres *et al.,* 1997). Tandis que la respiration foliaire est maintenue grâce a l'engagement des voies de respiration alternes, l'assimilation nette de CO_2 (A_n) et la conductance stomatique (g_s) sont plus faibles chez les feuilles de CMSII que chez les feuilles du WT (Sabar *et al.,* 2000 ; Dutilleul *et al.,* 2003b). D'autre part, la

photorespiration est augmentée chez le mutant CMSII à cause de sa plus faible conductance interne à la diffusion de CO_2 (Priault *et al.,* 2006 b). Le mutant CMSII est incapable d'ajuster son assimilation nette de CO_2 à une forte lumière de croissance (Priault *et al.,* 2006a). L'équilibre entre le métabolisme carboné et azoté est perturbé chez le CMSII avec une plus forte accumulation d'acides aminés, particulièrement ceux riches en azote, et de NADH qui est deux fois plus élevé dans les feuilles du CMSII (Dutilleul *et al.,* 2005). Chez le CMSII, certaines composantes du système antioxydant sont induites en parallèle au maintien de l'homéostasie redox. Cette modification du système antioxydant cellulaire chez le CMSII est associé à une plus grande tolérance à l'ozone et au virus de la mosaïque de tabac (Dutilleul *et al., 2003a*). D'autre part, la plus faible conductance stomatique est susceptible de limiter les pertes d'eau en cas de déficience hydrique. Des résultats précédemment obtenus au laboratoire ont montré qu'après arrêt de l'arrosage les feuilles des plantes CMSII maintiennent mieux leur RWC que les feuilles des plantes WT, bien que la concentration en ABA foliaire, un facteur clé de la régulation de l'ouverture stomatique (Trejo *et al.,* 1993) ne soit pas affectée. Ainsi le mutant CMSII offre des possibilités intéressantes, pour étudier l'implication de la mitochondrie, ainsi que l'interaction entre les fonctions respiratoires et photosynthétiques, en cas de déficit hydrique.

La première partie du présent travail a porté sur la différence de l'ouverture stomatique entre les feuilles des plantes WT et CMSII bien hydratées et la détermination du degré d'influence de certains paramètres hydriques sur cette différence. La deuxième partie a été consacrée à une comparaison du comportement des deux génotypes après un arrêt de l'arrosage en examinant le rôle de la faible conductance stomatique chez le CMSII dans le maintien d'un RWC élevé durant la déshydratation. Dans une troisième partie, nous avons voulu connaître les capacités d'acclimatation de ces deux génotypes maintenus sous alimentation hydrique limitante permettant l'établissement d'un RWC de 80%. L'étude des réponses au manque d'eau ont été examinés en utilisant des méthodes analytiques notamment les échanges gazeux, la fluorescence chlorophyllienne, la chromatographie et la spectrométrie de masse.

I. La photosynthèse et la respiration

Dans cette section sont données brièvement les caractéristiques de ces deux grandes fonctions, en rappelant quelques éléments qui sont utiles pour la compréhension des techniques utilisées et des résultats obtenus.

I.1. Généralités sur la chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries sont essentielles dans les processus énergétiques cellulaires. Elles sont limitées par deux membranes de propriétés très différentes. Leur membrane interne renferme les éléments de la chaîne de transport des électrons qui assure la phosphorylation oxydative. Au cours de la respiration, la libération d'énergie lors de l'oxydation complète de composés fournis essentiellement par le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) est couplée à la conversion de l'ADP et Pi en ATP (Siedow et Umbach, 1995). Le TCA est lui-même principalement alimenté, par le fonctionnement de la glycolyse dans le cytoplasme, mais aussi par la formation d'oxaloacétate lors de la carboxylation du phosphoénol pyruvate ou le transfert de malate en provenance du chloroplaste, par exemple. Le TCA produit très majoritairement le CO2 dégagé lors de la respiration (Siedow et Umbach, 1995).

Le transfert des électrons du NAD(P)H sur l'oxygène (***figure 1***) s'effectue par l'intermédiaire de transporteurs d'électrons organisés en quatre complexes (Trumpower et Gennis, 1994) :

- Le complexe I (**NADH : ubiquinone oxydoréductase**) est une NADH déshydrogénase qui oxyde le NADH. Au NADH généré lors du déroulement du cycle de Krebs s'ajoute chez les plantes le NADH produit par l'oxydation de la glycine dans la matrice. Le complexe I réduit un pool d'ubiquinone se trouvant dans la membrane interne.
- Le complexe II (**succinate : ubiquinone oxydo-réducatse)** catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et transfère les électrons qui en résultent également à l'ubiquinone.
- L'ubiquinone réduit par le complexe I et II est oxydé par le complexe III (**ubiquinone : cytochrome c oxydoreductase**) qui transfère les électrons vers une molécule de cytochrome c.
- Le complexe IV (**cytochrome c oxydase**) qui constitue le complexe terminal de la série oxyde le cytochrome c réduit et transfère les électrons sur l'oxygène (Siedow et Umbach, 1995).

Ce transfert d'électrons est couplé au passage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV. Le gradient électrochimique transmembranaire qui en résulte est utilisé par l'ATP synthase pour la production d'ATP. Cette voie de transfert jusqu'au dioxygène via la **cytochrome oxydase** (COX) se retrouve chez tous les eucaryotes (Anthony *et al.,* 2002).

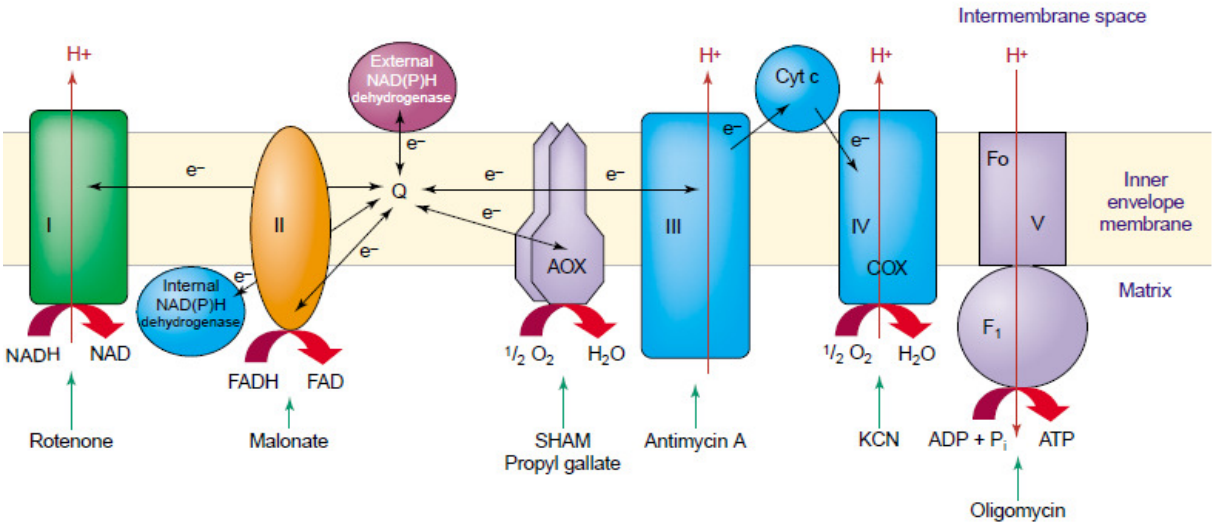


Figure 1 : Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons, des sites de pompage des protons et des inhibiteurs de chaque complexe (Raghavendra et Padmasree, 2003). Complexe **I** : NADH ubiquinone oxydoréductase; **II** : succinate ubiquinone oxydoréductase; **III** : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase; **IV**: cytochrome c oxydoréductase. SHAM : acide salicylhydroxamique.

Outre le complexe I, les mitochondries des plantes et d'autres organismes possèdent des NAD(P)H déshydrogénases localisées sur la face interne et externe de la membrane interne (Douce et Neuburger, 1989). Les NAD(P)H déshydrogénase internes oxydent le NADH de la matrice mitochondriale tandis que le NAD(P)H déshydrogénase externe peut oxyder le NADH et le NADPH du cytosol (Moller et Ramsusson, 1998 ; Rasmusson *et al.,* 2004).
De plus, il existe une oxydase terminale supplémentaire, **l'alternative oxydase** (AOX), qui court-circuite le cytochrome c oxydase, ce qui constitue la voie alterne de la respiration (voie AOX). L'activité de l'alternative oxydase est insensible aux inhibiteurs de la COX tels l'antimycine A et le cyanure.

La réduction de l'oxygène par l'AOX n'est pas couplée à la formation d'un gradient électrochimique et l'énergie est perdue sous forme de chaleur (Lambers, 1982). L'alternative oxydase est généralement considérée comme essentielle dans la modulation du niveau

énergétique cellulaire. Lorsque le cycle de Krebs produit trop rapidement de NADH et de $FADH_2$ par rapport à la capacité d'oxydation de la chaîne respiratoire, l'AOX serait activée et évitant ainsi le blocage des réactions respiratoires en permettant aux processus d'oxydation des substrats par la glycolyse et le cycle de Krebs de continuer à fonctionner (Vanlerberghe et McIntosh, 1997). Enfin, l'activité AOX peut limiter la production mitochondriale de ROS, en maintenant la chaîne mitochondriale de transport d'électrons relativement oxydée (Vanlerberghe et McIntosh, 1997 ; Moller, 2001). Compte tenu de son rôle dans l'ajustement du métabolisme respiratoire chez les plantes, toute condition métabolique qui conduit à une accumulation d'ubiquinone réduit, de NADPH mitochondrial ou de pyruvate peut avoir le potentiel d'augmenter le flux d'électrons vers la voie alternative. Ces conditions peuvent éventuellement être induites lors de l'existence d'un déséquilibre entre les deux extrémités du métabolisme respiratoire : le catabolisme de carbone et le transfert des électrons (Vanlerberghe et McIntosh, 1997). La partition entre la voie conduisant à la COX et celle conduisant à l'AOX est régulée suivant les besoins métaboliques de la cellule et les conditions environnementales.

I.2. La photosynthèse

Lors de la photosynthèse, l'énergie solaire est utilisée pour produire des composés organiques, à partir du CO_2 atmosphérique. Le mécanisme se décompose en deux types de réactions : des réactions primaires pendant lesquelles l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique et pouvoir réducteur sous forme d'ATP et de NADPH, et des réactions secondaires pendant lesquelles l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la synthèse des carbohydrates au niveau du cycle de Calvin. Les réactions primaires fournissent aussi l'énergie pour activer l'équipement enzymatique nécessaire à la fixation du dioxyde de carbone.

I.2.1 Les réactions primaires de la photosynthèse

L'énergie lumineuse est captée au niveau de deux grands complexes plurimoléculaires appelés photosysème I (PSI) et photosystème II (PSII) localisés dans la membrane des thylacoïdes. Les photosystèmes sont constitués d'un centre réactionnel et d'une antenne collectrice (ou LHC light harvesting complexe). Les centres réactionnels du PSI et PSII sont

désignés respectivement par les termes de P700 (deux chlorophylles a dont le maximum d'absorption se situe à 700 nm) et P680 (4 chlorophylles a dont le maximum d'absorption se situe à 680 nm). Chez les plantes, les chlorophylles du LHC piègent la lumière et transfèrent son énergie d'excitation aux centres réactionnels de l'un des deux photosystèmes. L'excitation provoquée par les photons dans les antennes est transmise avec une grande efficacité de chlorophylles en chlorophylles, par résonance, jusqu'au centre réactionnel (***figure 2***) (Allen et Williams, 1998).

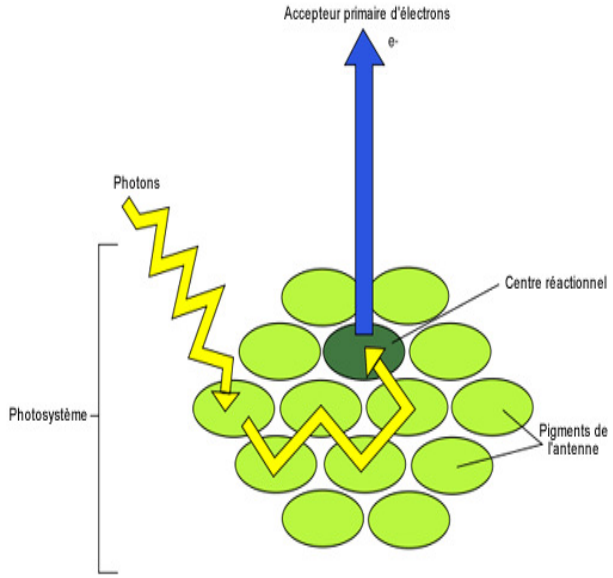


Figure 2 : Transfert d'énergie par résonnance des pigments assimilateurs au centre réactionnel (d'après Taiz et Zeiger, 2002) : un photosystème comprend une antenne et un centre réactionnel. Les molécules de pigments de l'antenne absorbent les photons incidents et transfèrent l'énergie d'excitation au centre réactionnel où se déroule la réaction photochimique d'oxydoréduction.

L'énergie lumineuse absorbée par l'appareil photosynthétique n'est pas totalement transformée en énergie chimique. Une partie est perdue sous forme de chaleur et de fluorescence (Butler, 1978). Suite à l'absorption d'un photon, la chlorophylle excitée passe à son état singulet ($^1Chl^*$). Elle retourne à son état fondamental via plusieurs voies de dissipation de l'énergie qu'elle contient (Muller *et al.,* 2001) (***figure 3***) :

- Elle peut être réémise sous forme de fluorescence chlorophyllienne
- Elle peut être transmise aux centres réactionnels et ensuite utilisée pour la photochimie
- Elle peut être dissipée sous forme de chaleur
- la chlorophylle peut aussi passer de son état singulet excité à l'état triplet ($^3Chl^*$). $^3Chl^*$ peut transférer son énergie à l'oxygène pour générer l'oxygène singulet

($^1O_2^*$), qui est un oxygène réactif extrêmement nuisible à l'appareil photosynthétique (Appel et Hirt, 2004).

Les processus de la photochimie, de la fluorescence chlorophyllienne et de la perte sous forme de chaleur sont en concurrence pour l'énergie absorbée. Si le taux d'un processus augmente les taux des deux autres diminueront (Baker, 2008).

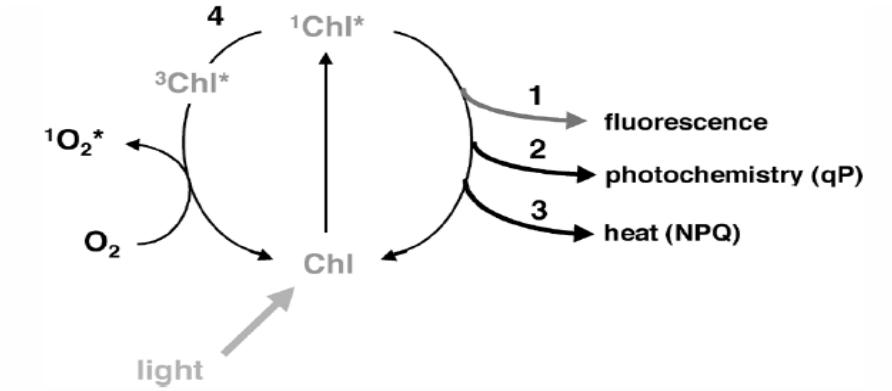


Figure 3 : Les destins possibles de chlorophylle excitée (Muller *et al.,* 2001). Lorsque Chl absorbe la lumière, elle passe de son état fondamentale à son état excité singulet $^1Chl^*$. À partir de cet état, il y avait plusieurs voies pour dissiper l'énergie d'excitation. Elle peut être réémise sous forme de fluorescence (1). Cette excitation peut être utilisée pour activer les réactions photosynthétiques (2) ou dissiper sous forme de chaleur (3), ces deux mécanismes réduisent la quantité de fluorescence. Ils se réfèrent comme qP et NPQ de la fluorescence chlorophyllienne.

Les changements de la fluorescence chlorophyllienne ont été observés dès 1931 par Kautsky et Hirsch, et ont été associés avec les changements dans l'assimilation de CO_2, autrement dit à l'état de réduction des accepteurs primaires d'électrons du photosystème II, les quinones Q_A. En effet, quand une feuille adaptée à l'obscurité est transférée à la lumière, les centres réactionnels du PS II se ferment progressivement lorsque les Q_A sont réduites, menant à une diminution du rendement de la photochimie, et donc à une augmentation du rendement de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne.

Lors du passage de l'obscurité à la lumière, cette émission augmente, schématiquement, en deux paliers : le premier est atteint très rapidement (temps nécessaire : une centaine de µs), c'est le niveau F_O pendant lequel les Q_A demeurent oxydées et qui témoigne exclusivement de

la migration de l'énergie lumineuse dans les antennes collectrices; le second est Fp, qui est le pic de l'émission dans les conditions expérimentales qui témoigne de la réduction des Q_A.
A partir de Fp l'émission de fluorescence diminue pour atteindre une valeur stationnaire Fs, (FS<FP) qui dépend du niveau de lumière (arrivée de l'excitation) et de l'utilisation de son énergie par le métabolisme en aval. La baisse de l'émission de fluorescence chlorophyllienne est un phénomène appelé habituellement "quenching" (atténuation) de la fluorescence.
Lorsque l'observation est faite en présence d'un inhibiteur de l'activité PSII, comme le DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthyluré), qui se place sur le site où se fixe habituellement Q_B avant de recevoir les électrons venant de Q_A, l'émission de la fluorescence chlorophyllienne est maximum, restant bloquée à une valeur plateau Fm (fluorescence maximum). La différence Fm-Fo = Fv est la fluorescence variable.

Il a été bien établi que des changements importants, qui active la dissipation sous forme de chaleur peuvent se produire au niveau de l'antenne du PSII et de son centre réactionnel. L'atténuation de l'émission de la fluorescence est expliquée principalement par des processus se déroulant en aval du PSII. On distingue :

* le quenching photochimique (qP) qui est une mesure de la concentration des centres PSII ouverts. qP dépend de l'équilibre entre l'arrivée des électrons sur Q_A et de leur utilisation par le métabolisme en aval (réduction photosynthétique du CO_2 ou de l'O_2, par exemple).

* le quenching non photochimique (NPQ) qui correspond à une augmentation du rendement avec lequel l'énergie est convertie en chaleur (Muller et al, 2001) et qui se met en place lorsque des protons s'accumulent dans le lumen thylacoïdien. Il se produit dans presque tous les eucaryotes photosynthétiques et il aide à réguler et protéger la photosynthèse dans les environnements dans lesquels l'absorption de l'énergie lumineuse dépasse la capacité d'utilisation de la lumière (Muller *et al.,* 2001). C'est un mécanisme qui implique un gradient de protons de part et d'autre de la membrane thylacoïdienne (ΔpH) et le cycle des xanthophylles, (***figure 4***). Sous forte lumière, le flux linéaire de transfert des électrons au niveau de la chaîne chloroplastique augmente.
L'abaissement du pH du lumen entraine une protonation de PsbS (protéine de l'antenne collectrice). Cela provoque un changement conformationnel de l'antenne qui favorise la désactivation thermique des chlorophylles excitées (Muller *et al.,* 2001). Ce mécanisme se

met en place rapidement lors d'une augmentation de lumière et est aussi rapidement réversible (***figure 4***).

L'acidification du lumen active l'interconversion de certains pigments de xanthophylles qui sont principalement liés aux protéines LHC (Gimore, 1997). L'activation du cycle des xanthophylles correspond d'abord à la conversion de violaxanthine en antheraxanthine puis en zeaxanthine : suite à l'acidification du lumen l'enzyme violaxanthine dé-époxydase vient s'associer avec les membranes thylakoïdiennes pour y catalyser la déépoxydation de la violaxanthine en zéaxanthine (Hager and Holocher, 1994 ; Finazzi *et al.,* 2006 ; Muller *et al.,* 2001). Il se produit aussi un changement dans la conformation de l'antenne. A noter cependant que les xanthophylles se trouvent à la fois librement dans la membrane thylacoïdienne et aussi associées aux autres pigments des antennes. La quantité de zéaxanthine synthétisée par le cycle des xanthophylles est largement corrélée avec le niveau de quenching non photochimique chez un grand nombre de plantes sous diverses conditions (Demmig-Adams, 1990).

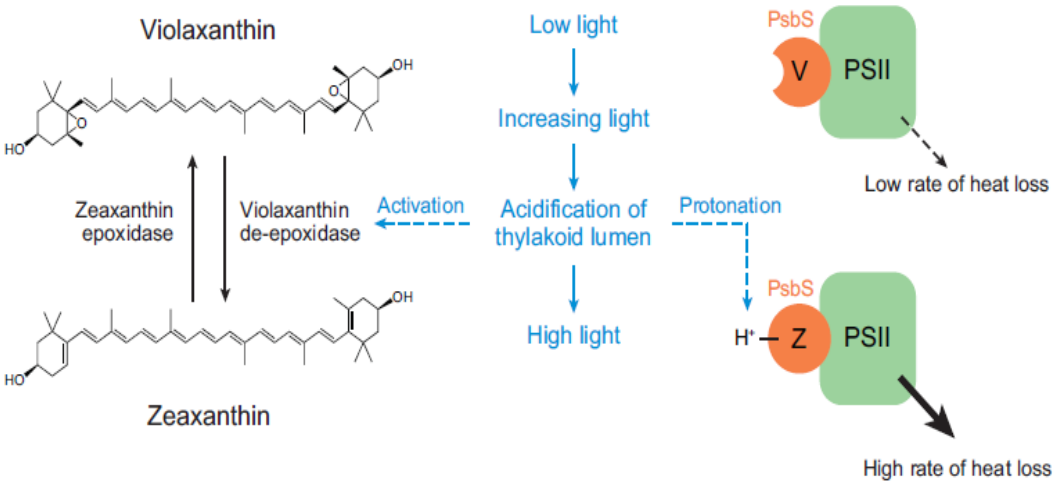


Figure 4: Mécanismes d'induction de quenching non photochimique de l'énergie d'excitation du PSII (Baker, 2008).

Si PsbS est déprotoné rapidement lorsque la lumière diminue, l'époxydation de zéaxanthine en violaxanthine (via zéaxanthine époxydase) est plus lente et sa quantité peut rester élevée longtemps après que la conditions « fortes lumières » ait disparu (Muller *et al.,* 2001) : la plante s'acclimate à un environnement variable en évitant les effets délétères de la lumière.
En pratique l'émission de fluorescence chlorophyllienne est mesurée sous une faible lumière modulée non-actinique, ce qui permet des observations sous différents niveaux lumineux (***figure 5***). La mesure de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne associée à celle des échanges gazeux permet une étude plus complète de la photosynthèse foliaire et en particulier de ses réactions primaires associées au transport des électrons de la chaîne chloroplastique, en distinguant et quantifiant la part de l'énergie absorbée utilisée pour la photochimie et dissipée sous forme de chaleur. Cela permet de plus de mesurer le flux d'électrons passant par le PS II (Baker, 2008).

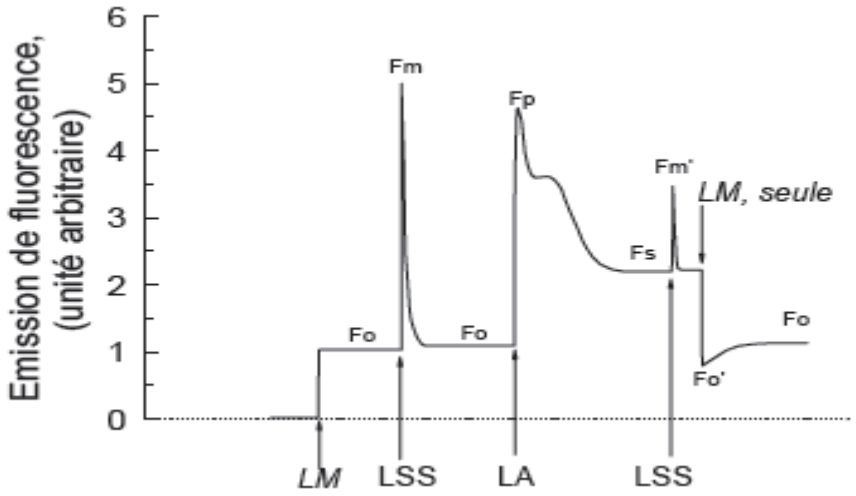


Figure 5. Variation de la fluorescence modulée en fonction du temps sur une feuille intacte. La feuille est d'abord maintenue à l'obscurité puis éclairée par une lumière modulée, LM**,** de très faible intensité (la lumière analytique). La fluorescence monte au niveau Fo. On donne à cette feuille, toujours soumise à LM, un flash, qui dure 1 seconde, de lumière sursaturante, LSS. LSS ferme tous les centres PSII et l'émission de fluorescence atteint le niveau Fm puis redescend au niveau Fo. La lumière actinique, LA, fermant des centres, entraîne aussi une augmentation de l'émission de la fluorescence jusqu'à Fp, puis vers un niveau Fs. Lorsque de la LSS est donnée durant une seconde on atteint le niveau de fluorescence Fm'. Lorsque la LA est éteinte, on récupère le niveau Fo initiale après une transitoire minimum de Fo' qui représente la valeur de Fo à la lumière et qui persiste quelques secondes à l'obscurité.

Le transport d'électrons commence dès que le P680 est oxydé par l'énergie arrivant des antennes (***Figure 6***). Les électrons libérés au niveau du PSII sont transférés jusqu'à un premier accepteur soluble situé dans le stroma, la ferrédoxine (Fdx). Trois complexes protéiques sont impliqués dans ce transfert successivement le photosystème II, le cytochrome *b6f* et le photosystème I. Il est également associé à des transferts de protons entre le stroma et le lumen mettant en jeu des plastoquinones libres dans le thylacoïde et une ATP synthase.

Sur le PSII : la forme excitée du centre réactionnel (P680*) transfère un électron à la phéophytine premier accepteur d'électrons du PSII. La phéophytine cède son électron à une première quinone appelé Q_A puis à une deuxième quinone Q_B, plastoquinone qui se lie transitoirement au PSII et qui est issu du pool intrathylacoïdien. Q_B réduite deux fois et protonée (par des protons venant du stroma) retourne dans le pool intrathylacoïdien sous forme de PQH2 et P680 oxydé récupère son électron lorsque l'eau est oxydée par le système d'oxydation de l'eau (OEC : oxygène-evolving complex) en libérant l'oxygène et des protons dans le lumen (Hopkins *et al.,* 2003).

Les PQH2 diffusent vers le site oxydant du cytochrome *b6f*, côté lumen. Les protons passent dans le lumen et les électrons réduisent le cyt *b6f*, puis la plastocyanine (1 électrons par plastocyanine), petite protéine se trouvant libre dans le lumen. Le complexe cytochrome *b6f* peut aussi réduire les plastoquinones à un deuxième site, côté stroma, dans lequel il récupère aussi des protons. Le résultat net de ces réactions, connu sous le nom de cycle des quinones, est le transfert de protons du stroma vers le lumen créant une différence de pH de part et d'autre de la membrane et, selon l'importance du mouvement d'ions qui se déroule en sens inverse, une différence de potentiel électrique. Le tout forme un gradient électrochimique nécessaire à la synthèse d'ATP via l'activité de l'ATP synthase à travers laquelle se dissipe le gradient de protons.

La plastocyanine (PC) réduite passe son électron au centre réactionnel de PSI (P700) oxydé. L'oxydation de P700 par les photons absorbés par le PSI permet de réduire in fine la ferrédoxine qui peut être considérée comme un centre de distribution du pouvoir réducteur nécessaire à de nombreuses réactions dans le chloroplaste (Batie et Kamin, 1984).

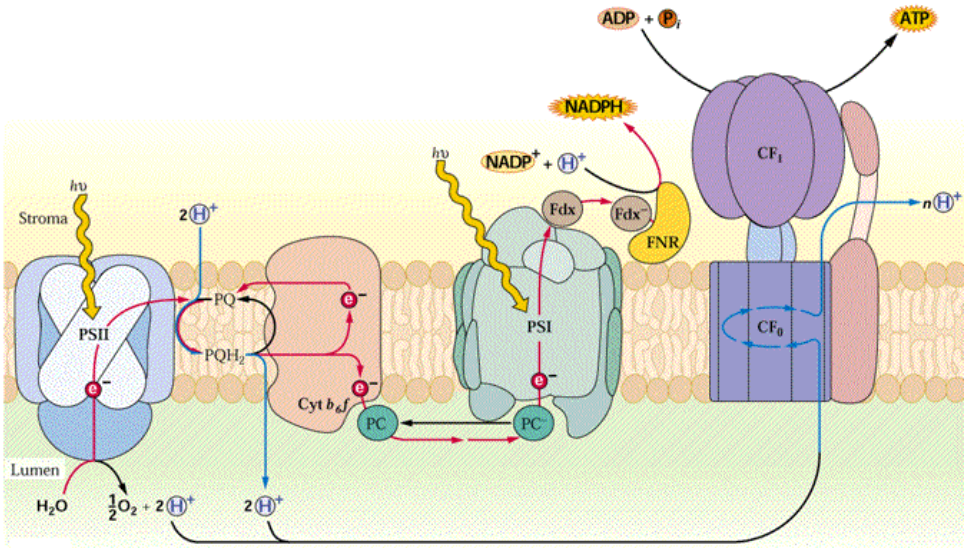


Figure 6 : Chaîne chloroplastique de transfert d'électron localisée dans les membranes thylacoïdiennes: l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique (ATP et NADPH) qui sera utilisé par le Cycle de Calvin. (Buchan *et al.,* 2002).

En plus de ce transfert linéaire des électrons, il existe un **transport cyclique d'électrons** (***figure 7***) : Les électrons du P700* sont transmis à la ferrédoxine. La ferrédoxine, plutôt que réduire le $NADP^+$, cède les électrons à la plastoquinone (PQ) via le cytochrome *b6f*. Le NADPH peut aussi réduire le pool de plastoquinones via une NAD(P)H déshydrogénase de la membrane thylacoïdienne. Les électrons reviennent finalement au PSI en passant par le complexe du cytochrome et la plastocyanine. Le transport cyclique d'électrons permet la synthèse d'ATP sans production de NADPH : photophosphorylation cyclique (Finazzi *et al.,* 2006).

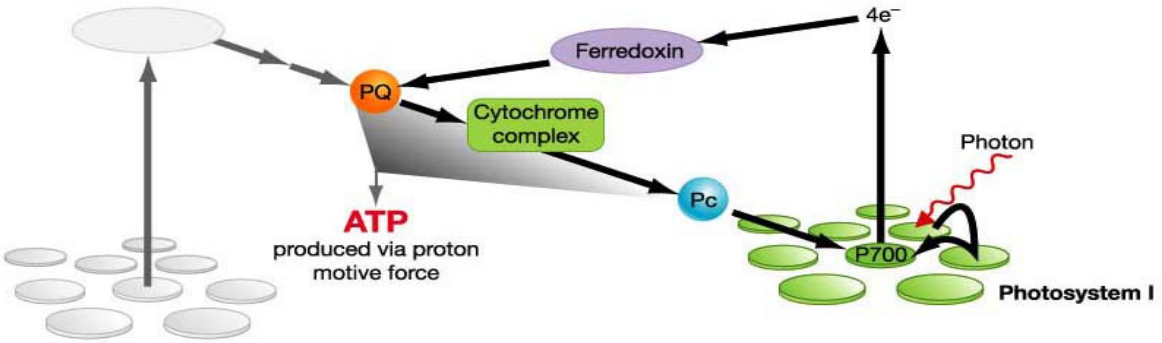


Figure 7: Transport cyclique d'électrons. Ce transport ne produit pas de NADPH mais l'énergie peut être utilisée pour produire de l'ATP.

Les vitesses relatives des transports linéaires et cycliques sont influencées par le rapport des concentrations de NADPH et de $NADP^+$. Quand le rapport NADPH / $NADP^+$ est élevé, le $NADP^+$ peut limiter le transport linéaire. Sous ces conditions, le transport cyclique des électrons peut augmenter. Le flux d'électrons cyclique est un mécanisme utilisé par les plantes pour produire une acidification du lumen (et donc une dissipation thermique de l'énergie captée par les antennes collectrices du PSII) dans des conditions de stress (Heber et Walker, 1992 ; Burrows *et al.,* 1998).

I.2.2. Réactions secondaires de la photosynthèse: fixation du CO2

L'ATP et le NADPH sont utilisées au niveau du cycle de Calvin (***figure 8***) pour la réduction du CO_2 et de l'O_2 atmosphérique. Le CO_2 et l'O_2 sont fixés sur le même accepteur organique, le RuBP.

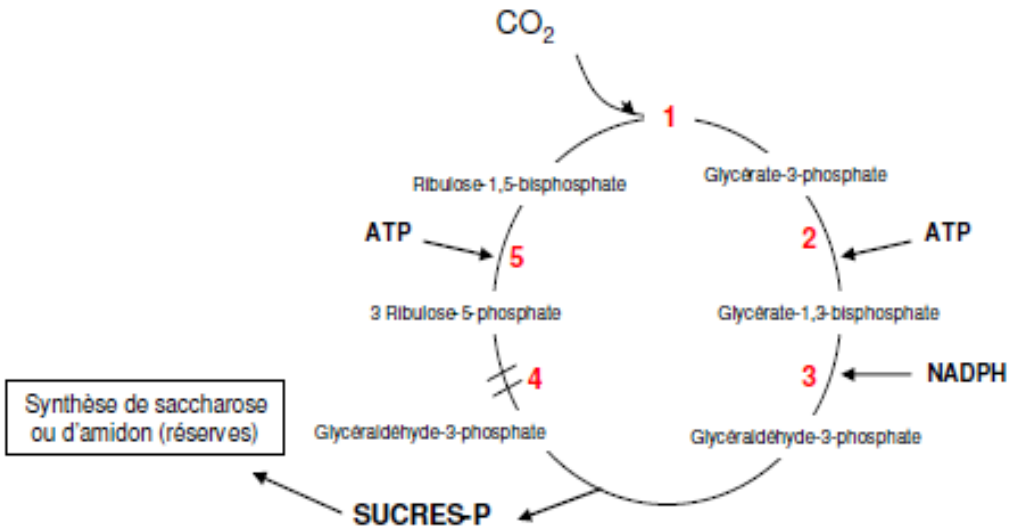


Figure 8: Cycle de Calvin-Benson-Bassham simplifié (ead.univ-angers.fr) ***:*** L'énergie chimique (ATP et pouvoir réducteur sous la forme de NADPH) produit par la chaîne chloroplastique de transfert des électrons est utilisée dans le cycle de Calvin- Benson-Bassham (cycle CBB). Les principales enzymes impliquées dans ce cycle sont: **1**: Rubisco ; **2**: Phosphoglycérate kinase ; **3**: Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; **4**: recyclage du ribulose-1,5-bisphosphate via la voie des pentoses phosphate ; **5**: phosphoribulokinase.

L'enzyme clé de ce cycle est la Ribulose 1,5- biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco). La Rubisco catalyse l'étape initiale de l'assimilation du CO_2 qui est la carboxylation de Ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) mais une activité oxygénase existe. L'équilibre entre les

deux réactions compétitives est déterminé par les propriétés cinétiques de la Rubisco et les concentrations de CO_2 et O_2 au niveau du site actif de l'enzyme (Laing *et al.,* 1974 ; Tcherkez *et al.,* 2006) :

$v_c/v_o = (VcKo/VoKc)([CO_2]/[O_2])$ (**1**), ou v_c et v_o sont respectivement les vitesses de carboxylation et d'oxygénation, *Vc* et *Vo* sont les vitesses maximales des deux réactions et *Kc* et *Ko* sont les constantes de Michaelis du CO_2 et de l'O_2. Le facteur de spécificité *VcKo/VoKc* (τ) détermine les taux relatifs des deux réactions à n'importe quelles concentrations données de CO_2 et d'O_2.

L'affinité de la Rubisco pour le CO_2 est suffisamment forte pour que cette réaction ait lieu même pour de faibles concentrations en CO_2 (Yokota et Kitaoka, 1985). La Rubisco peut représenter entre 30 et 50% de l'ensemble des protéines solubles de la feuille (Parry *et al.,* 2003). L'activité Rubisco varie suivant les conditions environnementales (apport lumineux et gazeux) afin de maintenir un équilibre entre le taux d'utilisation et de régénération du RuBP (Bernacchi *et al.,* 2001).

Les réactions de carboxylation et d'oxygénation sont catalysées sur les mêmes sites actifs de la Rubisco et le CO_2 et l'O_2 sont des substrats compétitifs (Jordan et Orgen, 1984). Un processus essentiel à l'activité de la Rubisco est **la carbamylation** d'un résidu lysine du site actif (Parry *et al.,* 2003). Elle correspond à l'activation de la Rubisco par une molécule de CO_2 (autre que celle servant de substrat à la carboxylation) qui réagit avec un groupe NH_2 présent au niveau du site actif de l'enzyme. La Rubisco est active lorsque le résidu lysine est carbamylé avec le CO_2 et que l'ion Mg^{2+} se fixe à ce carbamate. L'ampleur de cette carbamylation dépend de la concentration de CO_2 et de Mg^{2+} et de l'activité de Rubisco activase (Portis, 1992). L'activité de cette enzyme (Rubisco activase) est contrôlée par le rapport ATP/ADP (Streusand et Portis, 1987). Le rôle de cette enzyme est de relarguer le plus rapidement possible les sucres phosphatés liés à la Rubisco pour la préparer à la carbamylation. La Rubisco activase enlève également le 2-carboxy-D-arabinitol 1-phosphate (CA1P) à partir des sites carbamylé de la Rubisco (Robinson et Portis, 1988). Le CA1P, synthétisé à l'obscurité, a la capacité de se lier au site actif de la Rubisco et d'inhiber son activité. Il pourrait être un régulateur de l'activité à faible intensité lumineuse mais pourrait intervenir d'une manière plus importante dans la protection de la Rubisco de sa dégradation par les protéases lorsque le RuBP est présent en faibles concentrations (Khan *et al.,* 1999).

Les réactions suivantes du cycle de Calvin impliquent la synthèse de trioses phosphate et la régénération du RubP. Les trioses phosphates sont transportés hors du chloroplaste (cytosol)

pour aboutir à la synthèse de saccharose, mais peuvent être aussi transformés sur place en amidon qui est la principale réserve énergétique des cellules végétales.

I.2.3. Réponse de la photosynthèse au dioxyde de carbone et à l'oxygène

Lors de la photosynthèse, le CO_2 diffuse de l'atmosphère entourant la feuille (C_a) vers la cavité sous-stomatique interne (C_i) à travers les stomates. Ensuite, il diffuse vers le site de carboxylation (C_c) dans le stroma des chloroplastes à travers le mésophylle des feuilles.

I.2.3.a. Diffusion du CO_2 de l'atmosphère au chloroplaste

Deux étapes de diffusion de CO_2 peuvent être distinguées :
Un trajet diffusionnel en phase gazeuse qui est commun avec celui de la vapeur d'eau, mais en sens inverse. Dans ce trajet diverses limitations affectent la diffusion de CO_2. La couche d'air limite autour de la feuille constitue la première barrière à franchir avant d'atteindre la surface de la feuille (Farquhar et Sharkey, 1982). La conductance de la couche limite dépend de plusieurs propriétés physiques et environnementales de la feuille, en particulier, la surface foliaire, l'emplacement des stomates et la circulation de l'air autour de la feuille (Bernacchi *et al.,* 2002). Puisque la cuticule est quasi imperméable à la diffusion des gaz, la majeure partie de CO_2 entre dans la feuille via les pores stomatiques, situés sur les faces inferieures et parfois supérieures des feuilles. Les mouvements des stomates influencent fortement la diffusion de CO_2 puisqu'un changement de degré d'ouverture des stomates peut augmenter ou diminuer l'entrée de CO_2 dans les feuilles. Cette résistance stomatique est influencée par la physiologie des plantes et les conditions de l'environnement. Une fois dans les espaces intercellulaires du mésophylle, le CO_2 continue à diffuser sous forme gazeuse. La résistance à la diffusion dans les espaces intercellulaires dépend principalement de la structure interne de la feuille (Lawlor, 2002 ; Flexas *et al.,* 2008).

***La suite de trajet du CO_2 se fait en phase liquide*.** La somme de la résistance à la diffusion du CO_2 en phase liquide dans la cellule et de la résistance à sa diffusion en phase gazeuse dans les espaces intercellulaires constitue la résistance du mésophylle encore appelée résistance interne, R_m (ou son inverse, conductance, g_m). Le transport du CO_2 de la cavité-sous

stomatique jusqu'aux chloroplastes dépend largement de la conductance de mésophylle. La conductance mésophyllienne est très dynamique, elle change rapidement avec les variations de l'environnement, voire plus vite que la conductance stomatique (Flexas *et al.,* 2007a). Deux types de mesures sont couramment employés pour sa détermination, la discrimination isotopique durant les mesures des échanges gazeux (Evans *et al.,* 1986 ; Sharkey *et al.,* 1991 ; Loreto *et al.,* 1992 ; Lloyd *et al.,*1992) et des mesures simultanées de fluorescence chlorophyllienne et d'échanges gazeux (Bongi and Loreto, 1989; Harley *et al.,* 1992 ; Di Marco *et al.,*1990). Les deux méthodes reposent sur un certains nombres d'hypothèses qui sont largement indépendantes mais qui donnent des résultats similaires (Pons *et al.,* 2009). Plus récemment, il a été montré que la g_m chez les plantes C_3 peut être estimée en utilisant la réponse de la photosynthèse à l'O_2 sous CO_2 limitant (Bunce, 2009). Malgré un coefficient de diffusion en phase aqueuse très inférieur, la conductance interne du CO_2 est du même ordre de grandeur que la conductance stomatique (Galmès *et al.,* 2007).

Le CO_2 en phase liquide peut se trouver sous trois formes principales, CO_2, HCO_3^- et CO_3^{2-}. L'anhydrase carbonique catalyse l'interconversion CO_2/HCO_3^- (Coleman, 2004). La résistance en phase gazeuse est faible et est considérée comme facteur non limitant (Bernacchi *et al.,* 2002). En outre, il a été récemment prouvé que g_{liq} (dissolution en phase liquide à l'intérieure des cellules) et g_w (diffusion à travers la paroi cellulaire) sont les principaux déterminants de g_m (Flexas *et al.,* 2008). Le positionnement des chloroplastes en périphérie des cellules et l'importance des espaces intercellulaires dans une feuille sont deux caractéristiques anatomiques facilitant la diffusion interne et l'assimilation du CO_2 par les feuilles (Evans et Loreto, 2000). De plus, des aquaporines spécifiques facilitent aussi le transport de CO_2 à travers les membranes (Uehlein *et al.,* 2003 ; Uehlein *et al.,* 2008 ; Flexas *et al.,* 2006c). Leur rôle dans le transport de CO_2 pourrait tenir compte de la modulation rapide de g_m en réponse à des facteurs environnementaux tels que la température, le CO_2 et la dessiccation (Flexas *et al.,* 2006c). La présence d'anhydrase carbonique, d'aquaporines et la diffusivité de CO_2 dans l'eau ont tous été suggéré comme des processus modulant la diffusion de CO_2 jusqu'aux sites de carboxylation de Rubisco.

I.2.3.b. Courbes de réponses au CO_2

La réponse d'A_n à C_i peut être établie en mesurant A_n pour différentes C_a. Les courbes de réponses d'*An* au CO_2 intercellulaire permettent d'étudier la régulation de la photosynthèse par le CO_2, indépendamment de la régulation stomatique (Long et Bernacchi, 2003).

A de très faibles C_i, il n'y a plus d'assimilation nette de CO_2 parce que la production de CO_2 par la respiration n'est pas complètement compensée par la fixation de CO_2 par la photosynthèse. La concentration de CO_2 à laquelle la fixation et la production de CO_2 sont compensées à la lumière est appelée **le point de compensation pour le CO_2 (Γ).** Chez les plantes C3, à 25°C et sous pression atmosphérique, les valeurs de **Γ** sont compris entre 40 et 50 µmol CO_2 mol^{-1} (Lambers *et al.,* 2008).

Au-delà du point de compensation, deux régions de la courbe de réponse au CO_2 sont distinguées (***figure 9***) :

Pour des concentrations faibles ou intermédiaires en CO_2, la photosynthèse augmente fortement avec l'augmentation de CO_2. La photosynthèse est limitée par la capacité de carboxylation de la Rubisco, ou le RuBP est présent en quantité saturante (CO_2 limited région).

Pour de fortes concentrations en CO_2, la photosynthèse est limitée par la disponibilité en RuBP (RuBP-limited region), qui dépend du transport électronique et de l'activité de cycle de Calvin.

I.2.3.c. Réponses de la photosynthèse à l'oxygène

L'oxygène atmosphérique inhibe fortement l'activité photosynthétique des plantes en C_3 lorsque la teneur en CO_2 est proche de celle de l'atmosphère (380 ppm). Cet effet inhibiteur de l'oxygène sur la photosynthèse est appelé effet Warburg (qui le décrivait la première fois chez la Chlorelle). Le CO_2 et l'O_2 sont impliqués dans deux réactions en compétition catalysées par la Rubisco. En revanche la fonction oxygénase de la Rubisco est inhibée lorsque la concentration en O_2 dans l'atmosphère est abaissée. Si on abaisse la teneur en oxygène de l'air de 21 à ≤1%, la vitesse d'assimilation du CO_2 sera augmentée.

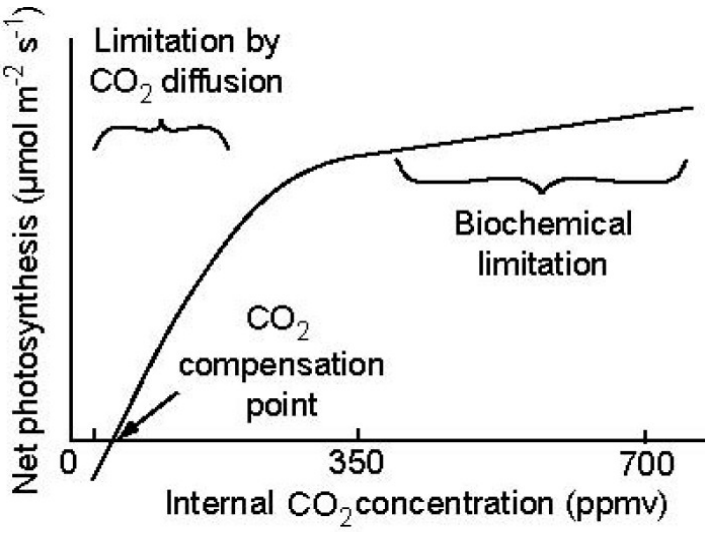


Figure 9: Exemple de courbe de réponse de l'assimilation nette de CO_2 à la concentration en CO_2 des espaces intercellulaires.http://sylvaindelzon.com/wordpress/www/wpcontent/uploads/Cours-MASTER-I-EVI-713.pdf

I.3. La photorespiration : communication inter-compartiments dans le métabolisme foliaire

Les fonctions biochimiques se déroulent grâce à la coordination de plusieurs compartiments cellulaires. L'interaction entre le chloroplaste et la mitochondrie constitue un exemple type de cette coordination. Le métabolisme respiratoire continue son activité à la lumière ce qui parait essentiel au maintien de la l'assimilation de CO_2 (Padmasree *et al.,* 2002 ; Kromer, 1995). Cette interaction inter-compartiments comprend aussi le peroxysome et le cytosol. La perturbation de l'un de ces compartiments perturbe le métabolisme de la totalité de la cellule (Raghavendra *et al.,* 1994). La mitochondrie parait jouer un rôle central à cause de sa fonction durant la photorespiration qui commence par l'oxygénation du ribulose-1,5-biphosphate (RubP), une réaction catalysée par la Rubisco (***figure 10***). Avec l'augmentation de la température, la spécificité de la Rubisco au CO_2 diminue (Brooks et Farquhar 1985) et la solubilité du CO_2 diminue aussi par rapport à celle de l'oxygène, ce qui résulte en une augmentation de la photorespiration.

Il a été suggéré que la photorespiration est impliquée dans la dissipation de l'énergie et évite ainsi la photoinhibition (Murata *et al.,* 2007 ; Takahashi et Murata, 2008). De plus la photorespiration produit des métabolites comme la sérine et la glycine, qui peuvent être utilisés par d'autres processus métaboliques, par exemple la glycine pour la synthèse du

glutathion (Noctor *et al.,* 1997). Puisque le glutathion est un composant du système antioxydant (Noctor et Foyer, 1998), la photorespiration peut constituer un moyen de protection additionnelle par la fourniture de glycine.

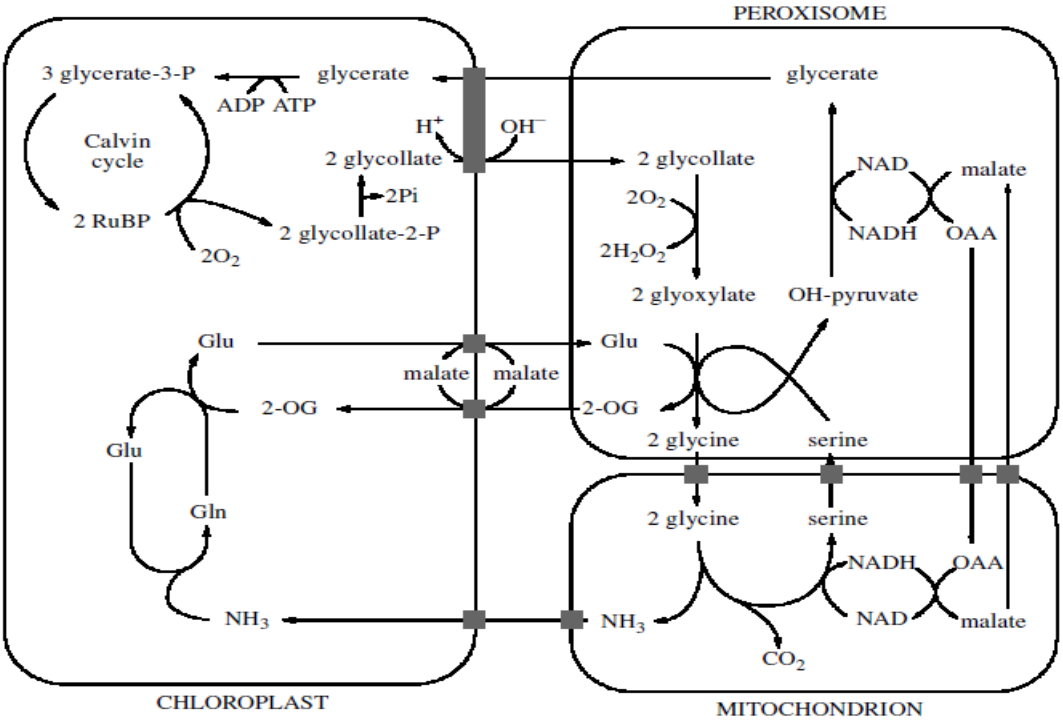
L'oxygénation de la RuBP mène à la production d'une molécule de glycerate-3-P et d'une molécule de glycolate-2-P, c'est la première étape du cycle photorespiratoire, encore appelé cycle C_2 (***figure 10***). Ainsi, 75% du carbone de phosphoglycolate produit par l'oxygénation est recyclé via cette cycle et retourne dans les chloroplastes (Lorimer, 1981 ; Leegood *et al.,* 1995 ; Gardestrom, 1996). Au cours de la photorespiration, le phosphoglycolate est tout d'abord déphosphorylé en glycolate par la phosphoglycolate phosphatase (enzyme chloroplastique). Après son transport au peroxysome, le glycolate est oxydé en glyoxylate par la glycolate oxydase. Cette réaction consomme de l'oxygène et produit le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui sera ensuite décomposé par la catalase (CAT). L'étape suivante implique deux réactions parallèles, catalysées par la sérine :glyoxylate aminotransférase (SGT) et la glutamate : glyoxylate aminotransférase (GGT), qui conduisent à la transamination de glyoxylate en glycine.

Dans la mitochondrie, deux molécules de glycine produisent une molécule de sérine par l'action combinée de la glycine décarboxylase (GDC) et de la sérine hydroxyméthyltransférase (SHMT). Ces deux enzymes sont présents en concentrations élevées dans la matrice mitochondriale des feuilles vertes (Douce *et al.,* 2001 ; Taylor *et al.,* 2004). Cette réaction mitochondriale est d'un grand intérêt en ce qui concerne les interactions chloroplaste/mitochondrie. D'une part elle produit du NH_3 et du CO_2, et d'autre part elle est couplée à la réduction de NAD en NADH. La totalité du NH_3 et une partie du CO_2 libéré seront refixés par le chloroplaste (Keys, 2006) tans dis que le NADH formé peut être ré-oxydé par la chaine de transport d'électrons mitochondriale (Gardestrom, 1996) ou transféré dans le peroxysome sous forme de malate.

Après son transfert de la mitochondrie au peroxysome, la sérine est convertie en hydroxypuryvate par la sérine :glyoxylate aminotransférase (SGT). L'hydroxypuryvate produit est réduit en glycérate par l'hydroxypyruvate réductase NADH-dépendante (HPR1). Le NADH ne peut pas traverser les membranes des peroxysomes, mais doit être généré par le malate déshydrogénase consommant le malate produit par le chloroplaste et la mitochondrie. En parallèle, il existe une voie alterne de la photorespiration au niveau de cytosol ou l'hydroxypyruvate est réduit par une hydroxypyruvate réductase à NADH cytosolique

(HPR2). Bien que l'activité HPR2 soit généralement faible (= 10% de l'activité de la forme péroxysomale), cette soupape permet de métaboliser l'hydroxypyruvate photorespiratoire si l'apport en NADH peroxysomale devient limitante. Ensuite, le glycérate est phosphorylé par le glycérate Kinase dans le chloroplaste et le glycérate-3-phosphate produit est converti en RuBP qui va réintégrer le cycle de Calvin (pour revue Wingler *et al.,* 2000).

Globalement la photorespiration implique l'échange de carbone et de pouvoir réducteur entre les organelles, mais également d'azote. Le NH_3 issu de la conversion Gly/Ser est réassimilé au niveau du cycle glutamine synthétase/ glutamine 2- oxoglutarate aminotransférase (cycle GS/GOGAT) chloroplastique.



.

Figure 10: Le métabolisme photorespiratoire fait intervenir trois compartiments cellulaires : le chloroplaste, le peroxysome et la mitochondrie. Le 3- phosphoglycérate régénéré au cours du cycle photorespiratoire réintègrent le cycle de Calvin. Les transporteurs des métabolites sont indiqués par des rectangles solides. Une étape clé du cycle est la conversion de Glycine en Serine au niveau de la mitochondrie, qui génère du pouvoir réducteur, du NH_3 et du CO_2. (Wingler *et al.,* 2000).

II. Les plantes et la sécheresse

II.1. État hydrique de la plante

II.1.1. Potentiel hydrique et ses composants

En 1960, Slatyer et Taylor ont introduit le concept de potentiel hydrique. Ce paramètre est désigné par Ψ (Slatyer et Taylor, 1960). Il est devenu alors, le paramètre thermodynamique le plus communément utilisé pour étudier et prédire l'état énergétique de l'eau dans la cellule (Slatyer, 1967 ; Passioura, 1982). On définit le potentiel hydrique d'une solution aqueuse comme étant la différence entre le potentiel chimique de l'eau dans la solution et celui de l'eau pure divisé par le volume molaire partiel de l'eau :

$$\Psi = (\mu_w - \mu^*_w)/V_w \quad (2)$$

où μ_w est le potentiel chimique de l'eau. Elle est exprimée en joule $mole^{-1}$. Le potentiel chimique d'une substance est maximum lorsqu'elle est à l'état pur et il diminue lorsqu'elle se trouve dans un mélange. μ^*_w est le potentiel chimique de l'eau pure et V_w est le volume d'une mole d'eau liquide. Comme on a $\mu^*_w > \mu_w$, cependant Ψ est habituellement négatif. Or l'eau se déplace d'une région ou le potentiel hydrique est élevé vers une région ou le potentiel hydrique est faible cela signifie que l'eau se déplace d'une région de potentiel hydrique négatif vers une région de potentiel hydrique encore plus négatif. Dans l'équation (2) $\mu_w - \mu^*_w$ représente la quantité de travail que peut fournir l'eau en un endroit donné (par exemple une cellule ou une vacuole) comparé à celle fournie par l'eau pure à la pression atmosphérique et à la même température (Koide *et al,.*1989). Le potentiel hydrique a les dimensions d'une pression dont l'unité commune est le MPa (mégapascal).

Dans une cellule végétale, Ψ peut-être exprimé comme étant la somme de trois composantes :

$$\Psi = P + \Pi + \tau \quad (3)$$

Où P, π et τ sont respectivement la pression hydrostatique (pression de turgescence), le potentiel osmotique (potentiel de soluté) et le potentiel de matricielle (Tyree and Jarvis, 1982).

Le potentiel matriciel rend compte de l'adsorption de l'eau aux surfaces solides. Dans la cellule sa contribution au potentiel hydrique est relativement négligeable comparée à celle de potentiel osmotique. Par conséquent, la pression hydrostatique et le potentiel osmotique sont les principaux facteurs représentant le potentiel hydrique d'où :

$$\Psi = P + \Pi \quad (4)$$

Le potentiel osmotique de la plupart des plantes est dû d'abord aux contenus en soluté de la vacuole. Les vacuoles contiennent de l'ordre de 50 à 80% de l'eau cellulaire totale en plus d'une grande variété de soluté (Hopkins *et al.,* 2003). Ceux-ci peuvent consister entre autres des glucides, des sels minéraux et des acides organiques. L'eau cellulaire qui n'est pas dans la vacuole se trouve majoritairement dans les espaces pariétaux, le cytoplasme n'en renferme que de 5 à 10% (Hopkins *et al.,* 2003). Les méthodes utilisées pour mesurer le potentiel osmotique des cellules et des tissus ne permettent généralement pas de distinguer les contributions relatives du cytoplasme et de la vacuole, le résultat représente la moyenne des deux (Roger et al, 1989). En pratique et dans des conditions naturelles, les valeurs de Π se trouvent entre -1 et -2.5 MPa chez les mésophytes, mais peut-être le double chez certaines xérophytes (Larcher, 1975).

Dans les cellules, la pression hydrostatique trouve son origine dans la pression dirigée vers l'extérieur qu'exerce le protoplaste sur la paroi : cette pression est dite pression de turgescence. Une cellule qui développe une pression de turgescence (*P*) est dite turgescente. Une cellule qui a perdu suffisamment d'eau pour annuler la pression de turgescence est en plasmolyse limite. Des instruments peuvent mesurer *P* directement dans de grandes cellules algales, mais chez les plantes supérieures, *P* est déterminé en calculant la différence entre le potentiel hydrique et le potentiel osmotique (Hopkins *et al ,* 2003). La productivité de la plante à court terme dépend du maintien d'un statut hydrique élevé des cellules photosynthétiques tout en gardant les stomates ouverts. On dit qu'elle maintient une turgescence positive. En dépendant des valeurs de potentiel osmotique symplasmique, une turgescence positive peut être associée à une large gamme de potentiel hydrique (Passioura, 1982). Dans les plantes herbacées non lignifiées, la pression de turgescence est seule responsable du maintien du port dressé. En effet le premier signe visible d'un déficit hydrique est le flétrissement des feuilles du à une perte de turgescence des cellules foliaires.

On peut fait intervenir également l'expression de potentiel gravitationnel Ψ_g comme l'a souligné Passioura (1982), qui n'est prise en compte que dans le cas des plantes de grande taille.

Pour maintenir un flux d'eau du sol vers les racines, la plante doit maintenir le potentiel hydrique des racines inférieur à celui du sol. Dans le cas contraire, il y aura une perte de turgescence et la plante perdra de l'eau. En situation de stress hydrique, le potentiel hydrique

du sol s'abaisse, la plante doit alors répondre en abaissant également le potentiel hydrique des racines en modulant la pression osmotique par l'augmention de l'osmolarité de la solution cellulaire en accumulant les solutés : osmorégulation.

II.1.2. Le contenu en eau

Le contenu en eau des tissus peut être exprimé par plusieurs façons : la quantité d'eau peut être déterminée soit par unité de poids sec, de poids frais ou par rapport au poids de l'eau à saturation. La dernière expression correspond au contenu relatif en au (Relative water content : RWC). Elle est la plus satisfaisante pour quantifier le déficit hydrique des tissus (Roger *et al,* 1989).

II.1.3. Les mouvements d'eau dans la cellule

Le potentiel hydrique (Ψ) de l'eau d'une cellule donnée d'une plante varie en fonction de la teneur en eau, selon le diagramme de Höfler (***figure 11***). Au fur et à mesure que Ψ diminue, la pression de turgescence (*P)* diminue jusqu'au point de plasmolyse limite, ou le protoplaste occupe le volume cellulaire sans exercer de pression de turgescence, mais il n'est pas détaché de la paroi. Par conséquent la pression de turgescence est égale à zéro et le potentiel hydrique de la cellule est égal à son potentiel osmotique (Π). La diminution de *P* crée une légère augmentation de la concentration de solutés. Ainsi Π augmente lorsque *P* diminue.

II.2. conductance hydraulique foliaire

II.2.1. Généralités

La conductance hydraulique de la plante est définie comme la conductance équivalente à la somme des conductances en phase liquide du système sol-plante. Dans certains cas, il est plus commode d'utiliser son inverse qui est appelé résistance. Elle est décrite par analogie à la loi d'Ohm qui décrit les mouvements de charges électriques dans un circuit électrique. Ces analogies électriques/hydrauliques permettent de construire une représentation électrique du système hydraulique étudié, tant à l'échelle cellulaire qu'à celle de la plante entière (Roger *et al.,* 1989, Broribb et Holbrook 2003 et 2006, Hubbard 2001, Nardini *et al.,* 2008).

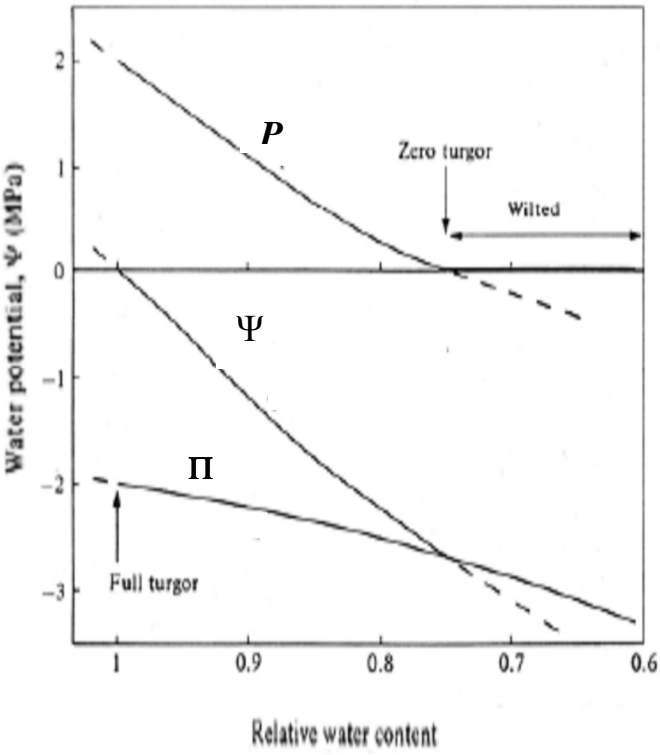


Figure 11 **:** Diagramme de Höfler illustrant les relations qui existent entre le potentiel hydrique (Ψ), le potentiel de pression (P), le potentiel osmotique (Π) et la teneur relative en eau (RWC) d'une cellule ou d'un tissu.

A l'état stationnaire, une relation peut-être établie entre g_s (la conductance stomatique), Ψ (potentiel hydrique) et K (Conductance hydraulique) comme suit :

$$g_s = K * \Delta\Psi / D \quad (5)$$

$\Delta\Psi$ étant le gradient de potentiel hydrique entre la feuille et le sol (Ψ_{sol}-$\Psi_{feuille}$) et D correspondant au déficit de pression de vapeur.

Depuis la surface des racines jusqu'aux vaisseaux du cylindre central, l'eau circule par voie symplasmique ou par voie apoplasmique. Ensuite elle circule dans les conduits du xylème. Au niveau de la feuille, un cheminement extravasculaire commence. Les flux d'eau dans le xylème sont appelés flux axiaux et leur conductance s'appelle conductance axiale. Par contre les flux d'eau extravasculaires sont appelés flux radiaux et leur conductance s'appelle conductance radiale.

Le transport d'eau au niveau des racines est mieux compris que celui des feuilles bien que cet organe soit largement étudié au niveau des échanges gazeux et du statut hydrique (Nadrino and salleo, 2005). Plusieurs études (Steudle, 1992; Steudle and Peterson, 1998) ont établi une approche biophysique et moléculaire solide du transport d'eau racinaire. Au sein de la feuille, pendant la voie vasculaire, le mouvement de l'eau dans les veines principales est majoritairement axial. L'eau quitte le xylème principalement par l'extrémité des veines mineures déclenchant la voie extravasculaire. La complexité des études de la conductivité hydraulique foliaire provient de la difficulté de discriminer entre le flux en phase liquide et phase gazeuse (Meinzer 2002) et aussi entre la contribution relative de chacune des voies vasculaires et extravasculaires dans la résistance hydraulique totale de la feuille.

Les recherches visant à déterminer les zones de plus forte résistance (ou de plus faible conductance) au sein de la feuille ont amené à des résultats controverses. Certaines études ont montré que le trajet vasculaire (du pétiole aux veines mineures) opposait la plus grande résistance au trajet de l'eau, jusqu'à 80% de la résistance foliaire totale (Tyree et Cheung, 1977). Cependant Cochard et al. (2004) ont montré que la résistance hydraulique principale de la feuille se trouve dans les compartiments extra vasculaires.

La contribution relative des voies vasculaires et extravasculaires à la résistance hydraulique foliaire est variable selon les structures spécifiques des espèces (Nardini *et al.,* 2005; Sack *et al.,* 2005) et selon les réponses aux facteurs environnementaux (Tyree *et al,*. 2005). Chacune de ces voies foliaires possède ses propriétés hydrauliques. En particulier, la résistance hydraulique de la voie vasculaire est principalement influencée par ses caractéristiques structurales telles que la densité des veines et le diamètre des conduits du xylème (Canny, 1990; Cochard *et al.,* 2004 ; Nardini et Salleo, 2005) tandis que la voie extravasculaire du mouvement de l'eau dépend de la perméabilité des membranes et du métabolisme cellulaire (Morillon and Chrispeels, 2001). Dans ce sens, Chochard *et al.* (2007) démontrent que le flux extravasculaire de l'eau peut être modulé via l'expression et /ou l'activation des aquaporines (les protéines canal à eau) suggérant ainsi un rôle important à ces protéines dans la détermination de la conductance hydraulique foliaire.

II .2.2. Les aquaporines

L'existence de protéines ayant une telle activité a été mis en évidence chez les plantes pour la première fois par Maurel *et al.* (1993). Elles facilitent et permettent la régulation du passage passive de l'eau à travers les membranes et appartiennent à une famille de protéines membranaire MIP (major intrinsic protéine) (Maurel, 1997). Chez les plantes, les aquaporines sont présents dans la membrane plasmique et dans le tonoplaste ou elles sont très abondantes (Lian *et al.,* 2004). Il existe plusieurs isoenzymes d'aquaporines. En effet, plus que 30 gènes d'aquaporines sont identifiés chez *Arabidopsis,* riz et maïs. Les aquaporines des tissus végétaux sont classées en quatre groupes :

- Plasma-membrane intrinsec protein (PIP)
- Tonoplaste intrinsec protein (TIP)
- Nod26-like intrinsec protein (NIP)
- Small basic intrinsec protein (SIP)

Dans la plupart des cellules végétales, la perméabilité à l'eau (Lp) des cellules vivantes est 10 fois supérieure que celle de la diffusion de l'eau (Ld) à travers la membrane plasmique (bicouche lipidique). Une fois les aquaporines sont inhibées par le mercure ou si leur expression est réduite (Clarkson *et al.,* 2000), Lp diminue et atteint le niveau de Ld. Ces résultats suggèrent que le majeur parti de la perméabilité à l'eau (Lp) des cellules vivantes est sous le contrôle des aquaporines. En effet elles jouent obligatoirement un rôle majeur dans l'absorption de l'eau (Maurel et Chrispeels, 2001). Les aquaporines permet aux cellules végétales de réguler leur perméabilité à l'eau par le niveau d'expression des gènes et/ou par la modification moléculaire de protéines, comme par exemple, phosphorylation/déphosphorylation pour activer/désactiver les aquaporines. Cette régulation constitue un avantage pour que les plantes puissent survivre et s'adapter aux différentes conditions environnementales (Katsuhara, 2007). Malgré que la découverte des aquaporines a créé un changement dans la compréhension de la circulation de l'eau chez les plantes, les variations d'expression des gènes en réponse aux facteurs environnementaux dont le stress hydrique, restent encore peu connues (Maurel et Chrispeels, 2001 ; Aharon *et al .,* 2003). De plus les aquaporines peuvent jouer un rôle dans de nombreux processus physiologiques, comme la diffusion de CO_2 dans le mésophylle (Flexas *et al.,* 2006c ; Uehlein *et al.,* 2008).

II.2.3. La cavitation

Un phénomène de cavitation peut s'établir lorsqu'une phase gazeuse apparaît dans la sève des vaisseaux. Lorsque l'air envahit tout le vaisseau et qu'il n'ya pas aucun flux de sève, le vaisseau est embolisé (Sperry et Tyree, 1988 ; Tyree et Sperry, 1989). L'embolie ne se développe dans les conduits de xylème que lorsque le potentiel hydrique de la sève diminue au dessous d'une valeur seuil, qui est très variable selon les espèces étudiées et au sein d'une même espèce suivant les organes (Tyree et Sperry, 1989 ; Nadrini *et al.,* 2001). En conditions naturelles, même en conditions hydriques non limitantes (à la mi-journée par exemple), le potentiel hydrique au cours de la journée peut être inférieure au potentiel seuil de cavitation (Chaves *et al.,* 2003). L'embolie diminue le nombre de vaisseaux fonctionnels et conduit à une perte de la conductivité hydraulique (Tyree et Sperry, 1989). La régulation stomatique contrecarre l'embolie chez certaines espèces (Holbrook et Brodribb, 2003 ; Salleo *et al.,* 2000).

Grâce à la grande contribution de la feuille à la conductance hydraulique totale de la plante, la vulnérabilité à une cavitation de la feuille peut révéler la façon dont les plantes réagissent à un stress hydrique. Généralement la conductance hydraulique foliaire diminue en réponse à la diminution du potentiel hydrique.

Le mécanisme exact de cette dépression de la conductivité reste mal connu, la cavitation étant le phénomène le plus plausible. En fait l'embolie bloque la circulation de la sève dans un certains nombre de vaisseaux et diminue donc la conductance hydraulique du tissu conducteur. La mesure de la perte de la conductance hydraulique permet de quantifier le degré de cette embolie

II.3. Impacts et réponses des plantes au stress hydrique

II.3.1. La réponse des stomates à la contrainte hydrique : contrôle hormonale *vs*. contrôle hydraulique

Les stomates assurent les échanges gazeux (CO_2 et vapeur d'eau) entre l'atmosphère et la plante. Ceci confère aux stomates une importance majeure dans le contrôle de l'état hydrique de la plante ainsi que de son activité d'assimilation du carbone (Hetherington et Woodward, 2003). En présence d'une cuticule quasi-imperméable à la diffusion des gaz entre l'intérieur et l'extérieur de la feuille, les échanges gazeux sont alors régulés majoritairement par les

mouvements des pores stomatiques. L'ouverture et la fermeture des stomates dépendent de la différence de pression de turgescence entre les cellules de garde et les cellules voisines. Les stomates répondent à plusieurs facteurs qui affectent directement la photosynthèse comme la lumière et la teneur en CO_2 atmosphérique, mais aussi à ceux qui affectent le fonctionnement hydrique, dont les plus importants sont la différence de pression entre la feuille et l'air (VPD) et le potentiel hydrique foliaire. Les plantes utilisent de nombreux signaux pour détecter le déficit en eau du sol (Wilkinson et Davies, 2010). Deux types de mécanismes de signalisation à longue distance d'une cellule ou d'un organe à un autre ont été décrit : (1) des signaux hydrauliques qui peuvent se propager d'une cellule ou d'un organe à un autre comme par exemple des racines aux feuilles dans un sol sec et (2) des signaux chimiques qui correspondent aux changements du transport des hormones ou autres espèces chimiques comme par exemple le dessèchement du sol augmente la synthèse et/ou la disponibilité de l'acide abscissique (ABA), un signal de stress produit par les racines en contact avec le sol sec et transporté aux feuilles (Hartung *et al.,* 2002 ; Jiang et Hartung, 2008).

L'effet du potentiel hydrique sur la conductance stomatique a été largement étudié (Radin et Ackerson, 1981; Trejo et Davies, 1991 ; Medrano *et al.,* 2002; Brodribb et Holbrook, 2003). Ces études montrent que la fermeture des stomates est parmi les premières réponses des plantes à la sécheresse. Elles assurent la réduction des pertes d'eau par transpiration (Chaves *et al.,* 2003). Le contrôle stomatique permet de maintenir l'état hydrique foliaire mais elle diminue la photosynthèse, et donc la productivité des plantes (Ridolfi et al., 1996 ; Lawlor, 2002). Brodribb et Holbrook (2003) ont montré que la conductance stomatique diminue de façon brutale quand le potentiel hydrique foliaire atteint une gamme relativement étroite de valeurs négatives et que cette plage de valeurs critiques varie entre les espèces.

Il a été suggéré que la fermeture des stomates en réponse à la sécheresse est initialement régulée par l'ABA. Ceci est confirmé lorsque les stomates se ferment en réponse à la déshydratation du sol malgré que le statut hydrique de la partie aérienne ne soit pas encore affecté (Bates and Hall, 1981). Ceci prouve l'existence d'un signal chimique transmis des racines déshydratées aux parties aériennes. Cette hypothèse est validé par l'augmentation du contenu en ABA endogène en réponse au stress hydrique et la capacité de l'ABA exogène à induire la fermeture stomatique (Ridolfi *et al.,* 1996). Après accumulation en grandes quantités dans les racines durant un stress hydrique, l'ABA atteint le xylème et circule ensuite jusqu'aux feuilles où il modifie les flux d'ions K^+ et Cl^- de la vacuole vers le cytoplasme des

cellules de garde (Sauter *et al.,* 2001). Les stomates se ferment alors et la conductance stomatique baisse. L'ABA est également synthétisé dans les feuilles (Sauter *et al.,* 2001) lorsque leur potentiel hydrique n'assure plus la turgescence mais l'ABA présent dans la sève peut diffuser jusqu'aux stomates avant d'atteindre ce point critique. Le transport de l'ABA par voie xylémique suit le courant de la transpiration. Ce transport est modulé en fonction du pH du milieu cellulaire qui dépend des conditions physiologiques des plantes (stressé ou non) (Winkson et Davies 2002 ; Chaves *et al.,* 2003). En conditions normales, le pH de la solution xylémique qui est de l'ordre de 6 favorise le passage de l'ABA dans les cellules ce qui baisserait sa concentration dans le xylème. Durant la sécheresse le pH de la sève peut monter jusqu'à 7,2 et il aurait un captage moindre, une concentration supérieure dans le xylème et l'apoplasme ce qui favoriserait l'accès de l'ABA aux stomates (Sauter *et al.,* 2001 ; Winkson et Davies, 2002) .

Une hypothèse formulée par Sperry et Tyree (1988) considère la régulation stomatique comme un mécanisme de protection contre la cavitation. Plusieurs études (Sperry et Tyree 1988 ; Buckley et Mott, 2002 ; Brodribb *et al.,* 2005 ; Brodribb et Holbrook, 2006) ont montré que la fermeture stomatique se produit avant le potentiel hydrique auquel apparaît l'embolisme du xylème. La différence de conductance stomatique maximale entre espèces peut être due non seulement à la taille et à la fréquence des stomates (index stomatique sur la face supérieure et inférieure), mais aussi à la conductance hydraulique maximale du xylème (Brodribb *et al.,* 2005) qui est à son tour dépendante de l'anatomie du xylème (Nardini *et al.,* 2008 ; Chaves *et al.,* 2003).

Plusieurs études ont montré que la diminution de g_s coïncide avec une diminution du potentiel hydrique, une diminution de la conductivité hydraulique (foliaire ou totale) et l'apparition de l'embolie (Brodribb *et al.,* 2002 ; Brodribb et Holbrook, 2003 et 2006 ; Hubbard et al., 2001) avec une bonne corrélation positive entre la conductance stomatique et hydraulique.
L'ensemble de ces données montre que les stomates sont soumis à des contrôles d'origine hormonale et hydraulique. Ces deux types de contrôles coexistent au sein de la plante et sont intimement liés. Les signaux hydrauliques expliquent la réponse rapide des stomates après la mise en place du déficit hydrique du sol, alors que les signaux hormonaux racinaires s'expriment sur le plus long terme. Les signaux hydrauliques pourraient aussi entraîner une redistribution d'ABA foliaire (pour Revue Comstock, 2002)

II.3.2. Les limitations imposées par la contrainte hydrique sur la photosynthèse

La limitation stomatique de l'entrée de CO_2 à l'intérieur de la feuille est considéré comme la première cause de l'inhibition de la photosynthèse chez les plantes soumises à un stress hydrique modéré (Lal *et al.,* 1996 ; Kaiser, 1987 ; Cornic *et al.,* 1989 ; Cornic, 2000). Un débat existe encore sur l'existence et l'importance de facteurs autres que la fermeture des stomates pouvant limiter la photosynthèse en période de sécheresse (Bunce, 2008). À partir des mesures des échanges gazeux, il est évident que la sécheresse induit une réduction de la photosynthèse (A_n) parallèle à celle de la conductance stomatique (g_s). Lorsqu'on compare A_n à un *Ci* (concentration de CO_2 intercellulaire) donné chez une plante soumise à la contrainte hydrique à son contrôle non stressé on remarque que la sécheresse réduit souvent A_n. Cela semblait une preuve de l'existence de limitation non stomatique de la photosynthèse (Farquhar et Sharkey, 1982).

En analysant leurs résultats et ceux trouvés dans la littérature Flexas *et al.* (2004 ; 2006a) montrent que la réponse de la photosynthèse au manque d'eau peut être divisée en deux phases distinctes : Durant la première phase, au cours de laquelle la conductance stomatique maximale est maintenue au-delà d'un seuil compris entre 0,5 et 0,1 mol H_2O m^{-2} s^{-1}, la photosynthèse est majoritairement inhibée par une limitation de la diffusion de CO_2 qui résulte de la fermeture stomatique. Durant la deuxième phase, caractérisée par une conductance stomatique au-dessous du seuil indiqué plus haut, une altération métabolique (des processus photochimiques et biochimiques) se produit. Ceci montre que la régulation stomatique, le mécanisme majeur intervenant à court terme pour limiter les pertes d'eau, est le facteur dominant qui inhibe la photosynthèse en réponse à un stress hydrique modéré. Lorsque le stress s'intensifie ou se poursuit, le métabolisme de la photosynthèse peut être altéré (Grassi et Magnani, 2005). Ces limitations biochimiques sont probablement associées à une régénération limitante du RuBP, substrat du cycle de Calvin (Gimnez *et al.,* 1992) en relation avec la baisse du contenu en ATP pouvant résulter entre autres de l'inhibition de l'ATP synthase chloroplastique (Tezera et al., 1996).

La conductance mésophyllienne (g_m), défini comme la conductance à la diffusion de CO_2 des espaces intercellulaires aux sites de carboxylation est initialement considérée comme facteur suffisamment négligeable pour limiter la photosynthèse (Farquhar et *al.,* 1980). Des

recherches plus récentes ont montré que g_m peut réduire C_c relativement à C_i et limiter ainsi la photosynthèse (Loreto *et al.,* 1992 ; Evans *et* von Caemmerer, 1996 ; Von Caemmerer, 2000). D'autres études ont également montré l'existence d'une très forte corrélation entre *An* et *gm* chez des plantes herbacées (von Caemmerer et Evans 1991, Evans *et al.,* 1994). Chez différentes espèces il a été montré que g_m change en fonction des facteurs de l'environnement, dont la contrainte hydrique (Bunce 2008 ; Galmes et al, 2007 ; Bernacchi et al, 2002 ; Singsaas *et al.,* 2003). Par conséquent, le débat de limitations stomatiques versus les limitations non stomatiques est remplacé par celui de limitations diffusives (stomatiques et mésophylliennes) versus limitations métaboliques (ou biochimiques) (Grassi et Magnani, 2005).

Les limitations d'origine mésophylliennes apparaissent en léger décalage par rapport aux limitations stomatiques (Perez-Martin *et al.,* 2009). Par exemple chez le soja, g_m a été beaucoup moins sensible que g_s au stress hydrique ou aucun changement de g_m n'a été observé que lorsque le déficit hydrique a réduit g_s d'environ 80%. Par contre une réduction plus élevée du potentiel hydrique et de g_s (90%) ont été accompagnés d'une réduction de g_m de l'ordre de 50% lorsque la vitesse maximale de carboxylation (V_{cmax}) est réduite de 64% (Bunce, 2009). De même, Warren (2008) n'observe pas de réduction de g_m sous un stress hydrique léger qui abaisse g_s de 60% chez la tomate mais g_m impose une forte limitation de la photosynthèse lorsque le stress hydrique devient plus sévère. Chez d'autres espèces méditerranéennes tout changement de g_s durant la sécheresse est accompagné par des changements de g_m (Galmes *et al.,* 2007). La diminution de g_m correspond plus à la diminution de V_{cmax} qu'à la diminution de g_s (Bunce, 2009).

Flexas *et al.,* (2006 b) ont évalué séparément l'effet de la diminution de g_s et du RWC, qui changent souvent parallèlement lors d'un stress hydrique, sur l'activité de Rubisco. Ils ont observé que la baisse de l'activité Rubisco ne dépend pas de RWC mais il s'est produit à un certain seuil de gs (<0,05 mol m^{-2} s^{-1}) et C_c (<100 µmol mol^{-1}), même s'il n'est pas clair que la fermeture des stomates agisse sur la régulation du Rubisco par ses effets sur C_c. Bota *et al.,* (2004) ont montré précédemment que le mécanisme de la diminution de l'activité Rubisco (diminution de la quantité d'enzyme *vs* réduction de son état d'activation) diffère entre les espèces. Ce mécanisme peut varier même au sein d'une même espèce selon la vitesse de fermeture des stomates (Flexas et al., 2006 b). Une autre hypothèse est récemment proposée (Galmés *et al.,* 2011) est que les faibles concentrations de CO_2 chloroplastiques résultantes d'un déficit hydrique peuvent désactiver les sites d'activation de Rubisco. Leur étude montre

que l'activation de la Rubisco abaisse lorsque C_c diminue au-dessous de 120 µmol mol^{-1}. À ce faible C_c, l'équilibre entre rubisco carbamylé et décarbamylé se déplace vers la dernière forme.

II.3.3. Effets de la contrainte hydrique sur la respiration

Les études examinant les effets du stress hydrique sur la respiration sont rares comparativement à celles concernant son effet sur la photosynthèse. Le stress hydrique inhibe toujours la respiration des racines et des plantes entières. Chez les feuilles matures la réponse de la respiration est plus variable (Flexas *et al.,* 2006a). Selon Atkin et Macherel (2009), la majorité des études effectuées sur les feuilles matures montrent que la sécheresse réduit la respiration ou ne provoque aucune modification. Seules quelques études ont rapporté une augmentation de la respiration des feuilles en conditions de stress hydrique sévère. Que la respiration foliaire ne soit pas affectée par un déficit hydrique, n'implique pas que le métabolisme mitochondrial ne puisse être affecté (Atkin et Macherel, 2009). Par exemple dans une étude de la respiration foliaire de soja, Ribas-Carbo *et al.* (2005) ont constaté que bien que la respiration à l'obscurité (mesuré par la consommation d'O_2) ne soit pas globalement affectée par le stress hydrique, l'activité de COX est diminuée tandis que l'activité de l'AOX est augmentée (Ribas-Carbo *et al.,* 2005).

L'effet du stress hydrique sur le bilan du carbone de la plante dépend de la mesure dans laquelle la photosynthèse et la respiration sont affectées par le manque d'eau. Le changement proportionnel de la photosynthèse durant un stress hydrique est presque toujours supérieur à la variation de la respiration (Lawlor and Fock, 1977 ; Nogues *et al.,* 2001 ; Galmes *et al.,* 2006). Pour cette raison, l'arrêt de l'arrosage se traduit par une augmentation du rapport respiration/photosynthèse chez les plantes stressées en comparaison de leurs contrôles bien hydratés indépendamment du fait que la respiration diminue, augmente ou demeure inchangé en réponse à un stress hydrique (Atkins et Macherel, 2009).

Contrairement au grand nombre d'études portant sur les effets du stress hydrique sur la respiration foliaire mesurée à l'obscurité R_{dark}, son impact sur la respiration mitochondrial à la lumière R_{light} a été relativement peu étudié. Galmes *et al*. (2006) ont trouvé que R_{ligh} (mesuré par la méthode de Laisk, 1977) a été sensiblement réduite dans des feuilles de tabac connaissant des niveaux croissants de stress hydrique. De même, Haupt-Herting *et al.* (2001) ont montré que R_{ligh} est plus faible chez des plantes de tomate stressées par comparaison avec leurs contrôles bien hydratés. Dans la même expérience R_{dark} a également diminué en réponse

au stress hydrique. Dans la plupart des études réalisées en utilisant des plantes bien hydratées, le taux de R_{ligh} sont inférieurs à R_{dark} (Brook an Farquhar, 1985 ; Atkin *et al.,* 1998 ; Hoefnagel et al., 1998). Chez le WT et le mutant CMSII de *Nicotiana sylvesrtris* la respiration à la lumière a été calculée (Priault, 2006b) en se basant sur la méthode de Laisk (1977). Chez les deux génotypes et sous deux intensités lumineuses différentes, la respiration à la lumière a été toujours inférieure à la respiration à l'obscurité. Il a été suggéré que l'inhibition de la respiration foliaire par la lumière est un résultat de la réduction de l'activité de pyruvate décarboxylase (Tcherkez *et al.,* 2005).

Les changements des processus respiratoires sous contrainte hydrique sont en interaction avec ceux des processus photosynthétiques.

II.3.4. interactions mitochondrie-chloroplaste durant le stress hydrique

Atkin et Macherel (2009) ont étudié les interactions métaboliques majeures entre les deux organites dans une cellule photosynthétique de plante de type C3 (***figure 12***).

En conditions optimales, la majeure partie du CO_2 atmosphérique qui entre dans la feuille est convertie en triose phosphates qui peuvent soit (1) entrer dans la voie de glycolyse, soit (2) être convertie en saccharose dans le cytosol pour le stockage et l'exportation. L'ATP et le NADPH photosynthétiques peuvent être également utilisés pour l'assimilation de l'azote et du soufre. Dans ces conditions, les mitochondries fonctionnent essentiellement comme des fournisseurs de squelettes carbonés, nécessaires à l'assimilation de l'azote, et de l'ATP pour la synthèse du saccharose et pour le métabolisme cellulaire (Atkin et Macheral, 2009) (***figure 12***).

Atkin et Macheral (2009) proposent une vue schématique dans laquelle les mitochondries jouent un rôle majeur pour soutenir les fonctions des chloroplastes et finalement la survie des plantes maintenues à un stress hydrique (***figure 12***). Lorsque les plantes sont soumises à la sécheresse, l'assimilation de CO_2 diminue et la photorespiration augmente (Wingler *et al.,* 2000). Il est suggéré qu'en conditions limitantes en eau, les mitochondries vont faire face à un taux élevé de décarboxylation de glycine ce qui exige une ré-oxydation soutenu du NADH matricielle. Sous ces conditions, il y aura également moins d'exportation mitochondrial de squelettes carbonés puisque l'assimilation de l'azote est réduite en conditions de stress hydrique (Atkin et Macheral, 2009), en particulier au niveau de la nitrate réductase (Fresneau *et al.,* 2007). Toutefois, il est crucial que l'ammoniaque libérée dans les mitochondries soit recyclée, ce qui exige l'implication du cycle GS-GOGAT chloroplastique (Raghavendra AS,

Padmasree 2003). Puisque la glutamine synthétase (GS) est également localisé dans les mitochondries des feuilles, il a été proposé que l'ammoniaque photorespiratoire ne diffuse pas mais plutôt soit réassimilé par la GS mitochondriale et dirigé vers le chloroplaste soit par la navette glutamine/glutamate ou par une navette plus complexe ornithine/citrulline ce qui permet l'exportation simultanée de CO_2 libéré pendant la photorespiration dans les mitochondries. Ces hypothèses suggèrent que sous la contrainte hydrique, il s'opère une réorientation spectaculaire du métabolisme mitochondrial foliaire à la lumière, afin de faire face au flux photorespiratoire et les conséquences de l'inhibition de la fixation de CO_2 (Atkin et Macherel, 2009). En condition de stress hydrique les mitochondries contribuent également au maintien de l'état redox et de l'énergie nécessaire au métabolisme cellulaire. Le pouvoir réducteur produit par la chaîne photosynthétique peut être exporté vers la mitochondrie à travers le pont malate/OAA (***figure 12***) ou consommé par la photorespiration qui sera ensuite oxydé par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Dans leur modèle, Atkin et Macheral (2009) proposent que sous stress hydrique l'importation d'ATP par les chloroplastes se fasse grâce à des transporteurs de nucléotides et que cette importation est indispensable pour permettre au flux photorespiratoire, y compris la régénération du RuBP et l'assimilation de l'ammoniaque, d'être maintenu (Atkin et Macheral, 2009).

II.3.5. Implication de la mitochondrie dans la tolérance à la sécheresse

Les principales étapes de la photorespiration sont localisées dans les mitochondries (Douce and Heldt, 2000). En outre, les mitochondries sont impliquées dans le métabolisme de la proline qui s'accumule dans des conditions de stress osmotique. La première étape de son oxydation est catalysée par la proline déshydrogénase, un enzyme de la membrane interne mitochondriale (Kiyosue *et al.,* 1996). La mitochondrie intervient dans la synthèse de l'ascorbate, un antioxydant puissant, qui joue un rôle clé dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Noctor et Foyer, 1998).

Chez le blé dur, en plus de l'AOX, la mitochondrie possède une UCP (the uncoupling proteine) très active et des canaux potassiques sensibles à l'ATP, qui sont capables de contrôler la production de ROS. En outre, Pastore *et al.,* (2007) ont montré qu'un stress osmotique modéré peut entrainer l'activation de l'UCP et des canaux potassiques ce qui suggère une acclimatation mitochondriale au déficit hydrique (Pastore *et al.,* 2007).

La mitochondrie de blé dur possède aussi un pont malate/oxaloacétate très actif (Pastore *et al.,* 2003), ce qui conduit à la suggestion que le pont malate/oxaloacétate soit la principale voie

d’oxydation de NADH cytosolique qui s’accumule dans les conditions de stress (Pastore *et al.,* 2007). Le modèle du blé dur montre que les mitochondries sont profondément impliquées dans la réponse au stress hydrique, et que leurs systèmes de dissipation d'énergie sont cruciaux (Pastore *et al.,* 2007).

La respiration étant essentielle à la survie et à la production des plantes, le but serait d'améliorer notre vision de sa contribution à la réponse au déficit hydrique. Il est donc essentiel d'obtenir de nouveaux aperçus sur le rôle des mitochondries et la respiration dans l'orchestration de la tolérance à la sécheresse (Atkin et Machrel, 2009). Une autre étude réalisée chez le blé va également dans le sens de l’implication de la voie AOX respiratoire dans la protection de la chaîne photosynthétique contre l’effet nocif de l’excès de la lumière (Bartoli *et al.,* 2004).

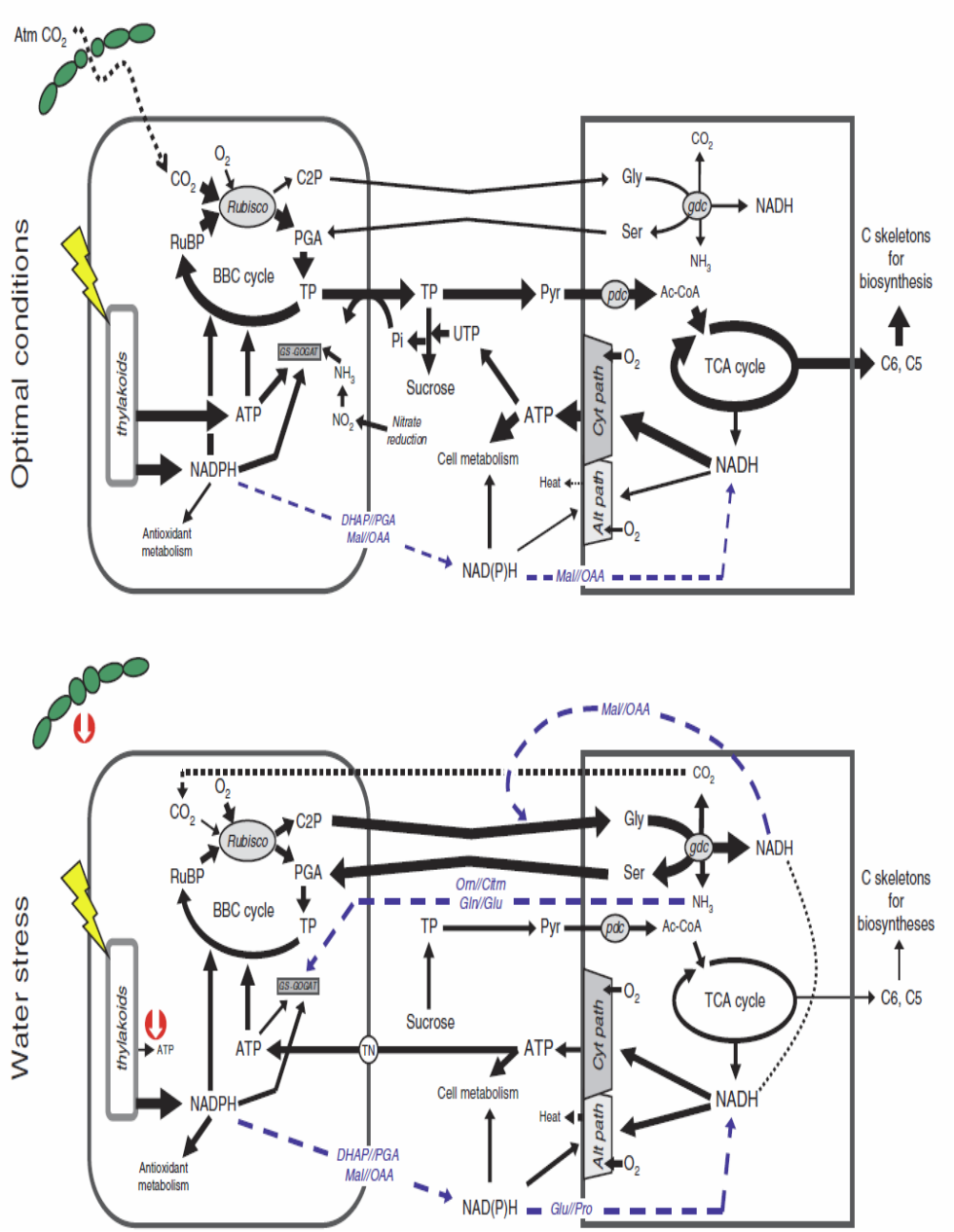


Figure 12 : Interactions du métabolisme mitochondriale et chloroplastique foliaire durant un stress hydrique (ATkin et Macherel, 2009)

III. Etude de mutants mitochondriaux : une approche indispensable pour l'obtention d'une meilleure compréhension du rôle de la mitochondrie et des interactions mitochondries/chloroplastes dans la tolérance au stress hydrique

L'étude des conséquences du stress hydrique sur le métabolisme respiratoire permet seulement de faire des relations entre différents aspects et ne permet pas d'évaluer valablement le rôle de la mitochondrie dans la tolérance au stress hydrique. La génération d'ATP par la photosynthèse et la respiration est indispensable au métabolisme d'une cellule que ce soit pour les plantes bien hydratées ou celles qui souffrent d'un déficit hydrique. Bien que ces deux processus soient bien compris individuellement, il existe peu de données relatives à leurs régulations mutuelles surtout en réponse à un stress hydrique. L'influence de la mitochondrie sur le chloroplaste (qui pourrait impliquer des réajustements de la régulation de l'appareil photosynthétique) pourrait être l'un de ses rôles centraux dans la coordination et l'amplification des réponses cellulaires aux stress. Une approche complémentaire s'est avéré indispensable pour analyser ce phénomène est l'étude des mutants mitochondriaux surtout parce que le développement de mutants stables et viables permet d'éviter des éventuels problèmes de spécificité des effets des inhibiteurs utilisés jusqu'à présent.

III.1. Les mutants mitochondriaux

La majorité des sous-unités du complexe I de la chaine respiratoire mitochondriale sont codées par le génome nucléaire tandis qu'un nombre restreint et variable de polypeptides sont encodés par les gènes *nd* du génome mitochondrial (Walker *et al.,* 1992 ; Rasmusson *et al.,* 1998). Chez les plantes supérieures neuf sous-unités du complexe I sont codées par le génome mitochondrial.

Chez les plantes supérieures, des mutants du complexe I n'ont été identifiés que chez certaines espèces :

(1) Des mutants NCS (*non chromosomal stripe*) ont été caractérisés Chez le maïs (Newton *et al.,* 1990 ; Marenfield et Newton, 1994 ; Yamato et Newton, 1999).

(2) Chez le tabac trois mutants ont été identifiés : les mutants CMSI et CMSII (cytoplasmique male sterility ; Pla *et al.,* 1995 ; Lelandais et al., 1998) et un mutant nucléaire NMS1(Nuclear Male Sterility ; Brangeon et al., 2000)

(3) un mutant nucléaire *fro1* (Lee *et al.,* 2002) a été décrit chez *Arabidopsis thaliana.*

L'ensemble de ces mutants montrent une absence ou une réduction de l'activité du complexe I.

Chez Chlamydomonas (algue verte) 5 mutants mitochondriaux ont été obtenus par des traitements mutagènes des cellules végétales sauvages (Matagane *et al.,* 1989). *In vivo* ces mutants sont insensibles à la roténone, inhibiteur du complexe I et présentent une croissance lente en conditions hétérotrophes (phénotype dark$^-$ ou dk$^-$). Des analyses génétiques ont montré que 4 mutations (*dum 5, dum 17, dum 20 et dum 25*) affectent le génome mitochondrial alors que la cinquième est d'origine nucléaire (dn 26). Ces mutations entraînent la perte de l'activité de complexe I (*dum 17, dum 20, dum 25 et* dn 26) ou une forte réduction de celle-ci (88%, *dum5*) (Remacle *et al.,* 2001 ; Cardol *et al.,* 2001).

Mon travail de thèse est basé sur l'étude du mutant mitochondrial CMSII de *Nicotiana sylvestris* dont la caractérisation aussi bien moléculaire que physiologique a beaucoup progressé ces dernières années dans le laboratoire « Mitochondrie et Métabolisme ».

III.2. Le mutant CMSII de Nicotiana sylvestris

Le mutant mitochondrial **CMSII** de *Nicotiana sylvestris* a été obtenu par régénération de cals après culture in vitro de protoplastes de feuilles de la lignée sauvage **WT** (Li *et al.,* 1988). La délétion fait suite à un évènement de recombinaison naturel au sein du génome mitochondrial et conduit à la perte du gène *nad7* présent en copie unique dans le génome mitochondrial. L'absence de NAD7, une sous unité matricielle du complexe I, a pour conséquence un défaut d'assemblage de ce complexe et une perte totale de son activité (Guttierres *et al.,* 1997, Pineau et al., 2005).

III.2.1. Caractéristiques respiratoires du mutant CMSII

Les plantes CMSII sont viables et maintiennent un niveau de respiration supérieur de l'ordre de 20 à 30% à celui du WT (Sabar *et al.,* 2000 ; Dutilleul *et al.,* 2003b ; Priault *et al.,* 2006a). La respiration du CMSII est insensible à la roténone, démontrant que le complexe I est dysfonctionnel chez le mutant, et que dans ces conditions, les NAD(P)H déshydrogénase internes assurent l'oxydation du NADH matriciel (Sabar *et al.,* 2000). Les mesures de la respiration en présence de succinate suggèrent que l'activité du complexe II est similaire à

celle du WT. La respiration est assurée par les NAD(P)H déshydrogénases alternes externes ou internes (***figure 13***) (Sabar *et al.,* 2000).

Malgré une forte augmentation des teneurs en protéines et en transcrits de l'AOX (***figure 13***) (Guttieres *et al.,* 1997 , Sabar *et al.,* 2000, Dutilleul *et al.,* 2003) l'activité de la voie alternative oxydase (AOX) n'est pas sensiblement augmentée, autorisant une synthèse d'ATP mitochondrial identique à celle du sauvage (Vidal *et al.,* 2007).

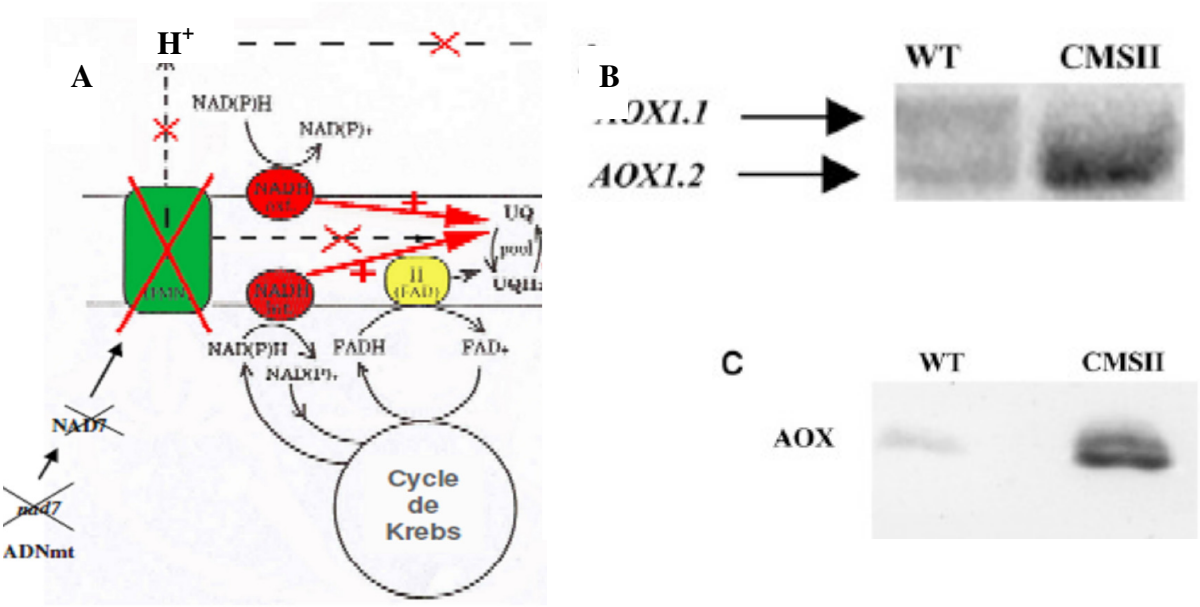


Figure 13 : (**A**) Chaîne respiratoire mitochondriale chez les plantes CMSII de Nicotiana Sylvestris: absence de complexe I éliminant un translocateur de protons. Les voies alternes de NAD(P)H déshydrogénases internes et externes sont activées (en rouge). Les croix rouges représentent les altérations rencontrées chez le mutant CMSII de *Nicotiana sylvestris* étudié. Les flèches en pointillés représentent la translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Complexe **I** : NADH ubiquinone oxydoréductase. (**B**) et (**C**) analyse comparative de l'expression de l'AOX chez le WT et le mutant CMSII de *Nicotiana sylvestris* (Vidal *et al.,* 2007). (**B**) ARN total extrait des feuilles matures des plantes WT et CMSII. (**C**) immunoblot des protéines mitochondriales des feuilles des plantes WT et CMSII.

III.2.2. Conséquences physiologiques de la mutation

La mutation entraîne de nombreuses modifications physiologiques et biochimiques à l'extérieur des mitochondries :

(1) La croissance des plantes CMSII ralentie sous différentes conditions de culture (Priault, 2006). Le CMSII présente des caractéristiques morphologiques foliaires et florales

particulières (***figure 14***). Les feuilles sont gaufrés et étroites, les fleurs sont petites avec des anthères mal formées contenant peu de pollen viable, d'où leur appellation « cytoplasmic male stérile » (CMS).

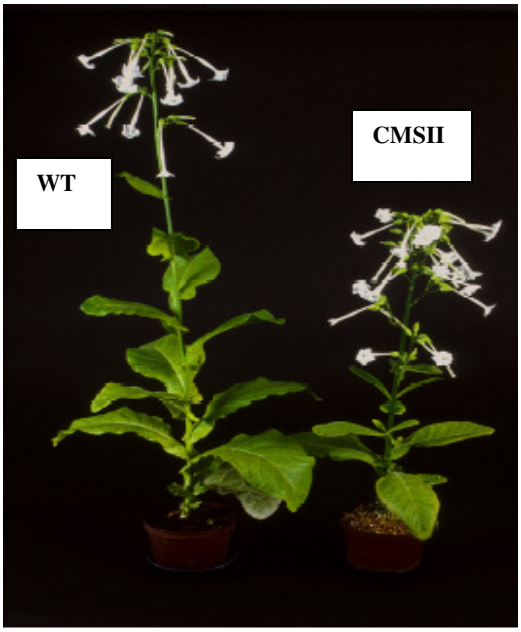


Figure 14 : Phénotype du CMSII : Taille adulte réduite, feuilles gaufrées, retard du développement et stérilité male cytoplasmique.

(2) La différence observée entre les plantes WT et CMSII met en jeu non seulement le fonctionnement mitochondrial, mais également le fonctionnement des chloroplastes. En effet, une différence d'assimilation nette de CO_2, *An*, entre les plantes WT et les plantes CMSII cultivées dans les mêmes conditions a été observé dans certains études précédentes (Sabar *et al.,* 2000; Dutilleul *et al.,* 2003a). Cette différence est clairement dépendante de l'intensité lumineuse de croissance des plantes, et n'existe plus lorsque les plantes sont cultivées sous très faible éclairement (80 µmoles PAR m^{-2} s^{-1}) (Priault, 2006).

Sabar *et al.,* (2000), Dutilleul *et al.,* (2003a) et Priault *et al.,* (2006a) ont montré que le mutant CMSII est incapable d'ajuster son assimilation nette de CO_2 et ses activités initiales Rubisco et SPS à une forte lumière de croissance.

L'interaction entre les fonctionnements mitochondriaux et chloroplastiques apparaît donc primordiale pour l'acclimatation à une plus forte intensité lumineuse de croissance chez *Nicotiana sylvestris*. Toutefois, la capacité photosynthétique du CMSII n'est pas altérée par rapport au WT. La diminution de la photosynthèse chez CMSII est plus évidente lorsque la fixation nette de CO_2 et la photorespiration sont tous deux actifs (Dutilleul *et al*., 2003b). De

plus les propriétés de la Rubisco ne sont pas affectées chez les plantes CMSII (Priault et *al.,* 2006a). Chez le CMSII, l'induction de la photosynthèse est nettement ralentie par rapport au WT, en parallèle avec un état d'activation plus important de la NADP-MDH (Dutilleul *et al.*, 2003b ; Cardol *et al.,* 2010).

Priault *et al.,* (2006b), ont montré par des mesures isotopiques par spectrométrie de masse que la conductance interne à la diffusion de CO_2 (g_m) chez les feuilles des mutant CMSII de *Nicotiana sylvestris* était la moitié de celle des feuilles du WT, ce qui diminue C_c (concentration en $C0_2$ dans les chloroplastes) et favorise la photorespiration, avec pour conséquence une activité photosynthétique plus faible que chez le WT.
La conductance stomatique chez les plantes bien hydratées était plus faible chez les feuilles du CMSII que chez le WT (Sabar et al., 2000 ; Dutilleul et al., 2003b). Toutefois, les plantes WT et CMSII cultivées sous une lumière de 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1} présentant des indices stomatiques très semblables (Priault, 2006). Il a été montré qu'à l'état stable de la photosynthèse, le rapport A_n/Transpiration est similaire entre WT et CMSII, ce qui montre que la réduction d'A_n est accompagné d'une réduction de la transpiration chez CMSII (Dutilleul *et al.,* 2003b).

(3) L'équilibre entre le métabolisme carboné et azoté est perturbé chez CMSII (Dutilleul *et al.,* 2005). Une forte accumulation d'acides aminés chez CMSII, particulièrement ceux riches en azote, est accompagnée d'une diminution marquée de la teneur en 2-oxoglutarate, squelette carboné et accepteur primaire de l'ammoniaque lors de l'assimilation de l'azote, ainsi que d'une baisse du taux des glucides.

(4) Chez le CMSII, certaines composantes du système antioxydant sont induites, comme les activités ascorbate peroxydase et glutathion réductase, en parallèle au maintien de l'homéostasie redox, comme le montre l'état fortement réduit des pools d'ascorbate et de glutathion, et le faible niveau endogène d'H_2O_2 (Dutilleul *et al.,* 2003a; Garmier, 2003). Ceci entraîne l'hypothèse qu'un signal originaire de la mitochondrie, déclenché par le dysfonctionnement de la chaîne de transfert d'électrons au niveau du complexe I, induit un ajustement du système antioxydant pour éviter un état de stress oxydatif généralisé. La nature même du signal est encore inconnue (Dutilleul *et al.,* 2003a).
En probable relation avec l'activation du système antioxydant, les plantes CMSII présentent une meilleure tolérance par rapport au type sauvage à certains stress tels que l'ozone (Dutilleul

et al., 2003 a) ainsi qu'au stress oxydatif induit par le méthylviologène qui agit sur le système photosynthétique, en acceptant les électrons issus du PSI et détourne les électrons vers l'O_2 moléculaire pour induire la formation d'ions superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) (Priault, 2006).

Des résultats obtenus sur le mutant CMSII de *Nicotiana sylvestris* ont suggéré l'implication d'une signalisation entre l'ensemble des compartiments cellulaires (mitochondries, chloroplastes, noyaux, peroxysomes et cytosol) dans la réponse à une protéine élicitrice bactérienne, la harpine (Garmier *et al.,* 2003) et au VMT (Dutilleul *et al.* 2003b). En plus des résultats préliminaires obtenus par Reda Djebbar ont montré une meilleure résistance du mutant vis-à-vis de la sécheresse en maintenant son RWC plus élevé que le WT après arrêt de l'arrosage. Plus récemment Galle *et al.* (2010) a montré que malgré le dysfonctionnement du complexe I, le mutant CMSII semble capable d'ajuster sa machinerie photosynthétique pendant et après la sécheresse lui permettant de réduire la photo-oxydation et le maintien de l'état redox cellulaire et le niveau d'ATP.

Les modèles explicatifs du rôle de la mitochondrie et des interactions mitochondries/ chloroplastes dans la réponse au déficit hydrique ont tous été construits sur la base d'expériences menées en présence de molécules inhibitrices. L'analyse de la réponse à la contrainte hydrique chez le mutant mitochondrial CMSII affecté au niveau du complexe I de la chaine respiratoire constitue une approche nouvelle et originale pour évaluer le rôle de la mitochondrie dans la tolérance à la sécheresse et les répercussions de son activité mitochondriale sur l'appareil photosynthétique durant la sécheresse.

IV. Objectifs de l'étude

Dans cette thèse, nous avons cherché à comprendre le rôle des mitochondries et des interactions mitochondries/ chloroplastes dans la réponse au déficit hydrique en comparant les réponses physiologiques et métaboliques du type sauvage et du mutant CMSII de *Nicotiana sylvestris*. Plus précisément, nous nous sommes intéressés aux caractéristiques biochimiques et physiologiques de ce mutant qui peuvent être impliquées dans sa meilleure tolérance :

● La conductance stomatique mesurée chez les deux types de plantes cultivées sous les mêmes conditions montre qu'elle est plus faible chez le CMSII que chez le WT. Les mouvements des stomates sont contrôlés par un certain nombre de facteurs environnementaux ou internes de la plante (transpiration, concentration en hormones, concentration intercellulaire en CO_2 C_i, conductance hydraulique du xylème). Or les facteurs environnementaux sont maintenus d'une façon similaire chez les deux génotypes, nous nous intéressons aux facteurs internes de la feuille (concentration de CO2 intercellulaire Ci, potentiel osmotique, conductance hydraulique) afin de savoir si cette faible conductance stomatique chez le mutant mitochondrial dépend d'une différence éventuelle entre WT et CMSII au niveau de ces paramètres.

● En plus de leur rôle dans la diffusion de CO_2 permettant l'ensemble du métabolisme carboné, les stomates sont aussi le siège des principales pertes en eau par transpiration. Ceci donne aux stomates le rôle de réguler les échanges gazeux (l'entrée de CO_2 et la sortie de H_2O) en réponse à la sécheresse. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à chercher s'il existe une relation entre la plus faible conductance stomatique qui minimise les pertes en eau et la préservation de l'état hydrique et la disponibilité d'eau du sol chez CMSII durant la déshydratation autrement on s'intéresse aux effets de la déshydration sur la régulation stomatique chez les deux génotypes. Les plantes en même stade de développement et ayant la même surface foliaire sont soumises à la déshydratation par arrêt de l'arrosage. L'étude des effets de la contrainte hydrique sur la régulation des stomates, nécessite donc de s'intéresser aussi aux effets de la contrainte hydrique sur le métabolisme du carbone chez les deux génotypes pour cela la photosynthèse, la respiration et la partition des électrons de la chaine photosynthétique entre la carboxylation et l'oxygénation sont suivies au cours de la déshydratation.

● Pour mieux comprendre l'influence de la mutation dans la réponse (tolérance) à la sécheresse, les deux génotypes sont maintenus en alimentation hydriques limitante permettant l'établissement d'un RWC de 80%. À cette intensité de contrainte hydrique, la limitation stomatique étant similaire chez les deux génotypes. Plusieurs méthodes analytiques

notamment les échanges gazeux, la fluorescence chlorophyllienne, la chromatographie et la spectrométrie de masse sont utilisées afin d'évaluer le rôle des altérations métaboliques chez le CMSII notamment sa faible conductance interne à la diffusion de CO_2 et sa forte photorespiration dans l'acclimatation de la photosynthèse à des conditions de déficit hydriques et d'examiner le rôle de l'interaction entre l'activité mitochondrial et chloroplastique ainsi que le métabolisme azoté dans la résistance au stress hydrique. Dans cette partie trois points sont abordés :

1- l'analyse de l'effet du manque d'eau sur le transport d'électrons linéaires photosynthétique chez le sauvage et le mutant mitochondrial qui constitue une approche pour évaluer l'impact de la sécheresse sur le fonctionnement de l'appareil photosynthétique.

2- l'importance de la photorespiration dans la protection de la machinerie photosynthétique sous l'effet de la contrainte hydrique. Pour cela deux méthodologies sont suivies : l'estimation de flux d'électrons vers l'oxygénation et l'analyse des métabolites du cycle photorespiratoire.

3- le rôle de la variation de g_m en conditions hydriques limitantes dans la limitation de la photosynthèse.

I. MATERIEL VEGETAL

I.1. Nicotiana sylvestris WT et CMSII

N. sylvestris (2n=24) est une dicotylédone originaire de l'Amérique du Sud appartenant à la famille des Solanacées. La lignée fertile sauvage (WT) provient de l'Institut du Tabac de Bergerac. Elle est maintenue par auto-pollinisation.

Le mutant CMSII (Cytoplasmic Male Sterile) a été régénéré à partir de cals obtenus après deux cycles de cultures in vitro de protoplastes de feuilles de la lignée sauvage (Li *et al.,* 1988). Il est maintenu par rétrocroisement avec la lignée sauvage.

I.2. Conditions de culture

Nicotiana sylvestris est une plante de jours longs (16 h de photopériode) présentant un stade végétatif en rosette. Les plantes, de la germination à leur utilisation expérimentale, ont été cultivées en compartiments dans les serres associées au laboratoire « Ecologie Systématique et Evolution » sous une intensité lumineuse incidente environ de 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1}. Les conditions de croissance y sont contrôlées, avec une photopériode de 16 h, une température et une humidité relative jour/nuit respectivement de 25°C / 20°C et 50% / 60%. Après le semis, les plantules sont repiquées une première fois dans des petits pots de 0,1 L, puis une seconde fois dans des pots plus grands d'un volume proche de 0,5 L. Avant les expériences de contrainte hydrique, les plantes sont maintenues en conditions bien hydratées avec addition d'une solution nutritive (Hoagland) une fois par semaine. Les expériences sont réalisées lorsque les plantes atteignent l'âge de 6 et 11 semaines respectivement pour le WT et CMSII. Cette différence d'âge est due à la croissance retardée des plantes CMSII et la nécessité d'avoir des plantes de même stade de développement pour démarrer les expériences. Tout au long des expériences les 2 premières feuilles matures sont utilisées pour les mesures.

La contrainte hydrique est appliquée par arrêt complèt de l'arrosage jusqu'à atteindre un stress hydrique sévère. Pour d'autres séries d'expériences, l'arrêt de l'arrosage est appliqué jusqu'à ce que la teneur relative en eau (RWC) des plantes diminue jusqu'à 80%, ensuite les plantes sont maintenues à ce niveau de RWC pendant 6 à 10 jours en ajoutant la quantité d'eau que les plantes perdent pendant la journée. Après cette période d'acclimatation à un RWC de 80%, les plantes sont utilisées pour les expériences.

II. METHODES

II.1. Mesure de l'état hydrique des plantes

II.1.1. Contenu relative en eau

Les disques foliaires prélevés sur des plantes bien hydratées ou déshydratées sont rapidement pesés (PF). Ensuite, les disques sont soumis dans l'eau à 4°C et à l'obscurité. Après 24 h, les disques sont bien séchés par des papiers filtres et le poids à saturation (PT) est déterminé. Enfin, les disques sont mis dans une étuve à 50°C pendant 48 h pour déterminer leurs poids sec (PS). Le RWC est calculé comme suit :

RWC = (PF-PS)/(PT-PS)*100 (**6**), avec PF, PS et PT sont respectivement le poids frais, le poids sec et le poids à plein turgescence

II.1.2. Détermination des courbes Pression-Volume

Dans le but de comparer les relations hydriques entre le WT et CMSII, le potentiel hydrique est mesuré en fonction de la diminution de RWC sur des disques foliaires collectés à partir des plantes des deux génotypes en utilisant le WP4 hygromoter (WP4, Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). Les courbes générées par le suivi du potentiel hydrique au cours de la diminution de RWC s'appellent des courbes de pression volume (PV).

Des disques foliaires prélevés la veille de l'expérience sont mis à saturation dans l'eau à l'obscurité pendant une nuit. Avant les mesures, le disque foliaire est percé 80 à 100 fois par une petite aiguille afin d'éliminer la cuticule pour réduire sa résistance à la diffusion de vapeur d'eau. Le disque foliaire débarrassé de sa cuticule est rapidement et soigneusement séché par des papiers filtres. Après pesage avec une balance à précision, le disque est immédiatement placé dans le récipient du WP4. Les mesures ont consisté à l'enregistrement alternatif du poids et du potentiel hydrique foliaire correspondant en déshydratant l'échantillon en étapes successives dans le laboratoire. La procédure est répétée jusqu'à atteindre des RWC faibles (30-40%). Finalement, le courbe PV qui correspond à $-1/\Psi = f(RWC)$ est généré. L'exploitation graphique des courbes permet de déterminer le potentiel osmotique à pleine saturation (Π_0), le potentiel osmotique au point de perte de turgescence (Π_{TLP}), la teneur relative en eau au point de perte de turgescence (RWC_{TLP}) et la pression de turgescence à la saturation (P_o).

II.1.3. Mesure de potentiel osmotique

En plus de l'estimation de potentiel osmotique à saturation à travers les courbes PV, des disques foliaires sont prélevé sur des plantes WT et CMSII et sont soumis dans l'eau pendant une nuit (comme dans le cas des mesures de courbes pression volume), ensuite les disques sont congelés dans l'azote liquide afin d'annuler la pression de turgescence des parois cellulaires. Après séchage, les disques sont introduits dans le récipient de WP4 et la mesure du potentiel hydrique est déclenchée. En absence de toute pression de turgescence, le potentiel hydrique mesuré correspond au potentiel osmotique.

II.1.4. Mesure de point de congélation

La mesure de point de congélation chez des disques foliaires prélevés sur des plantes bien hydratées de WT et CMSII a été effectuée comme décrit dans Baptist *et al.* (2010). Deux thermocouples (thermocouple 1 de diamètre de 0.5 mm pour la température de la feuille et thermocouple 2 de diamètre de 1 mm pour la température de l'air) sont connectés à un enregistreur de données CR800X (Campbell Scientific Inc., Logan, UT, USA) qui fait des enregistrements de température chaque 5 secondes. Les températures maximale, minimale et moyenne sont déterminées chaque 2 min. Les disques foliaires fraichement prélevés ont été mis dans une enceinte métallique fermée en contact avec le thermocouple 1. La température à l'intérieur de la chambre diminue progressivement en utilisant un bain thermostaté programmé. Cette diminution se fait avec une moyenne de 1°C chaque 5 min jusqu'à une température foliaire finale de -15°C puis elle augmente jusqu'à 25°C. Au point de congélation, la température foliaire augmente à cause de l'émission de la chaleur, qui sera détecté par le premier thermocouple (Ball *et al.,* 2002).

II.2. la conductance hydraulique

II.2.1. Principe

La conductance hydraulique des disques foliaire est mesurée en utilisant la technique de relaxation de potentiel hydrique proposé par Brodribb et Holbrook (2003) et adopté par Nadrini et al (2008) pour des disques foliaires. K_{fol} est calculé en supposant que la réhydratation d'une feuille déshydratée est équivalente au chargement d'un condensateur à travers une résistance :

$$V_f = V_0 e^{-t/RC} \quad (7)$$

Ou V_0 est le potentiel initial, V_f est le potentiel final après t secondes de réhydratation (rechargement), R est la résistance (=1/K), C est la capacitance et t est la durée de réhydratation (rechargement).

Des feuilles matures sont prélevées sur des plantes WT et CMSII. Ces feuilles sont ensuite enfermées dans un sac en plastique à l'obscurité pendant 1h afin de stopper la transpiration et homogénéiser le potentiel hydrique sur toute la feuille. Ensuite un disque est prélevé d'un des deux cotés de la nervure médiane. Le disque est utilisé immédiatement pour mesurer la valeur du potentiel hydrique initiale (Ψ_0) à l'aide de Dewpoint Potentiameter WP4. Durant les mesures, la feuille reste enfermée dans le sac plastique. Un second disque est ensuite prélevé du coté opposé de la nervure médiane et est immergé dans l'eau distillée pendant 15 ou 30s afin de permettre la réhydratation. Le disque, après avoir débarrassé de sa cuticule, est soigneusement séché et la valeur de potentiel hydrique après réhydratation (Ψ_f) est mesurée. Les disques utilisés doivent contenir une veine de deuxième ordre coupant le disque à travers le centre. La mesure de potentiel hydrique foliaire pré et post réhydratation ainsi que le temps de réhydratation nous permet de calculer K_{leaf} selon Brodribb et Holbrook (2003 et 2006) :

$$K_{fol} = C \ln (\Psi_0 / \Psi_f)/t \quad (8)$$

Ou Ψ_0 et Ψ_f sont les potentiels hydriques foliaires (Ψ_{fol}) avant et après la réhydratation de t secondes et C est la capacitance de la feuille.

Nardini *et al.,* (2008) ont montré que les valeur de la conductance hydraulique des disques foliaires estimées sur la base de l'équation **8** en utilisant le Dewpoint hygrometer étaient très proche à des valeurs obtenues pour des feuilles entières en utilisant HPFM (high pressure flow meter) chez le tabac. Ceci suggère que cette technique offre des valeurs fiables de la conductance hydraulique foliaire même si elle est appliquée sur des portions de feuilles.

II.2.2. Capacitance

La capacitance (C_{fol}) de chaque génotype est mesuré à partir de la pente de la relation entre Ψ_{fol} et le RWC (***figure 15***) (Tyree et Hammel, 1972). Due à l'élasticité de la paroi cellulaire, C_{fol} avant et après la perte de turgescence est très différente. La relation entre Ψ_{fol} et le RWC est biphasique. L'intersection entre les deux phases correspond au point de perte de turgescence. Les pentes des deux phases correspondent aux C_{fol} avant et après la perte de turgescence.

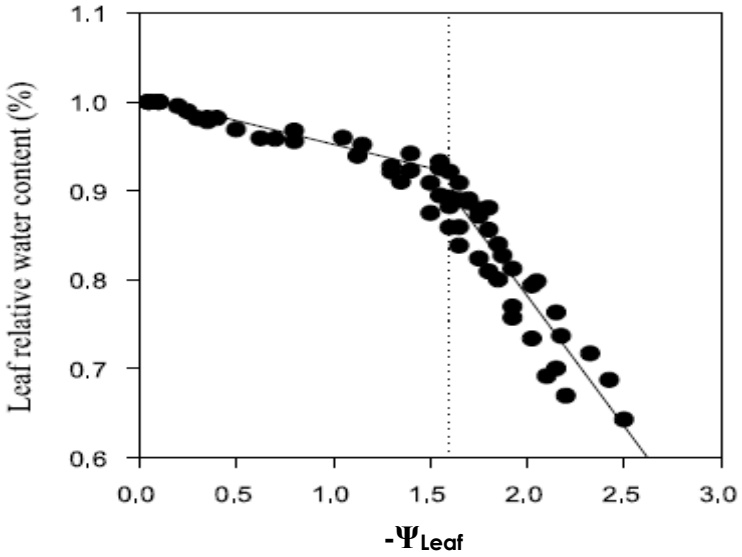


***Figure 15**:* Les deux phases de la courbe de teneur relative en eau en fonction du potentiel hydrique (Brodribb et Holbrook, 2003). La capacitance est calculée à partir de la pente des deux phases. L'intersection des deux phases correspond au point de la perte de

Le calcul de K_{fol} (mmol.m^{-2}.S^{-1} MPa^{-1}) exige que C_{fol} déterminé à partir de la courbe pression volume ($\Delta RWC/\Delta\Psi$; MPa^{-1}) soit exprimée en terme absolue et normalisée par la surface foliaire. Pour cela, la capacitance estimée à partir des courbes PV a été multipliée par la masse d'eau à saturation et ensuite divisé par la surface foliaire.

$$C_{fol} = (\Delta RWC/\Delta\,\Psi)*(PS/LA)*(WW/PS)/M \qquad (9)$$

Où PS est le poids sec du disque foliaire (g), LA est la surface du disque foliaire (m^2), WW est le poids d'eau à saturation et M est la masse molaire de l'eau (g mol^{-1}).

II.2.3. Réponse de la conductance hydraulique foliaire (K_{fol}) à la diminution de potentiel hydrique foliaire (Ψ_{fol}) : vulnérabilité à la cavitation

Les courbes de vulnérabilité (courbes potentiel hydrique foliaire – conductivité hydraulique foliaire) permettent d'estimer la perte de la conductivité hydraulique au cours de la déshydratation. Ces courbes sont déterminées par déshydratation à la paillasse (Sperry *et al.*, 1988).

Plusieurs feuilles de WT et CMSII ont été prélevés et déposés pour une durée variable sur une paillasse de laboratoire. Les feuilles ont été recouvertes d'un sac plastique, afin de maintenir les potentiels hydriques homogènes le long de limbe foliaire.

Les feuilles ont été successivement choisies en fonction de leur degré de dessèchement attendu. Sur chacun de ces feuilles, Ψ_0 et Ψ_f a été mesuré à l'aide de Dewpoint Potentiameter WP4 et K_{fol} est calculé selon l'équation **8**. Les valeurs de K_{fol} obtenues pour un même Ψ_{fol} ont été moyennées et les courbes de K_{fol} en fonction de Ψ_{fol} ont été construites.

II.3. Echanges gazeux foliaires et fluorescence chlorophyllienne

II.3.1. Principes

II.3.1.a. Le principe des mesures des échanges gazeux foliaires

Les échanges gazeux foliaires sont mesurés grâce à un système portatif d'échange gazeux (Licor 6400 ; ***figure 16***) qui repose sur un IRGA (Infra Red Gas Analysis). Le fait que la vapeur d'eau et le CO_2 absorbent dans l'infrarouge mais pour des longueurs d'ondes différentes permet d'estimer le flux sortant d'eau (transpiration) et le flux entrant de CO_2 (assimilation). La feuille est placée dans une petite chambre d'assimilation balayée par un flux d'air dont les pressions partielles en CO_2 et en vapeur d'eau, les températures foliaires et de l'air ambiant sont contrôlées. Lorsque la chambre est éclairée, l'air passant autour de la feuille et quittant la chambre s'appauvrit en CO_2 et s'enrichit en vapeur d'eau. Ce sont les mesures des pressions partielles des gaz à l'entrée et à la sortie de la chambre qui permettent d'estimer les échanges gazeux foliaires. L'assimilation nette de CO_2, la transpiration, et la conductance stomatique sont calculées en utilisant le modèle de von Caemmerer et Farquhar (1981) en considérant la surface projetée de la feuille. Toutes les mesures d'échanges gazeux sont faites sous une température de 25°C, un VPDL autour de 1 et une humidité relative de l'air autour de 60%.

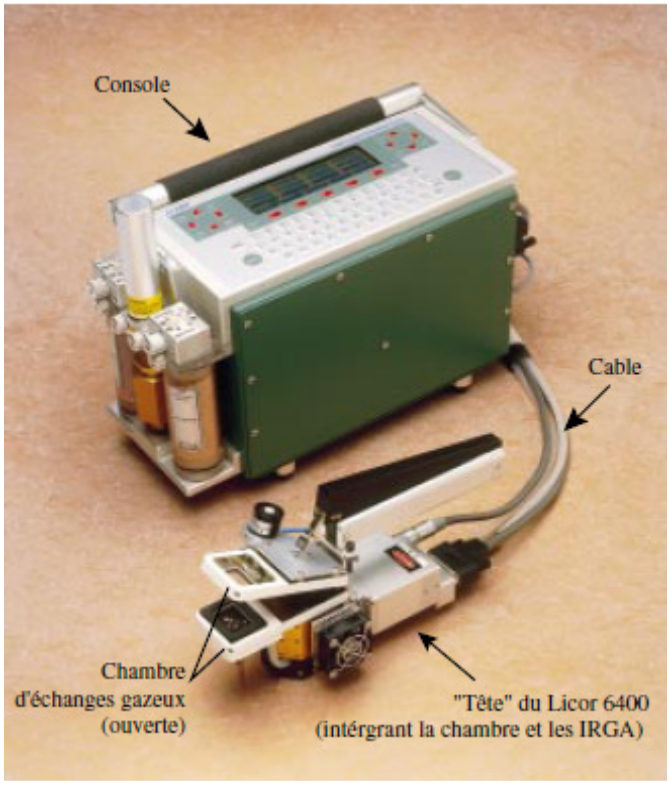


Figure 16 : Présentation du Licor 6400 et de sa chambre. Cet instrument est composé d'une console (conditionnement des gaz), et d'une tête (comprenant la chambre foliaire et les IRGA). Source : Licor, notice technique "Using the Li-

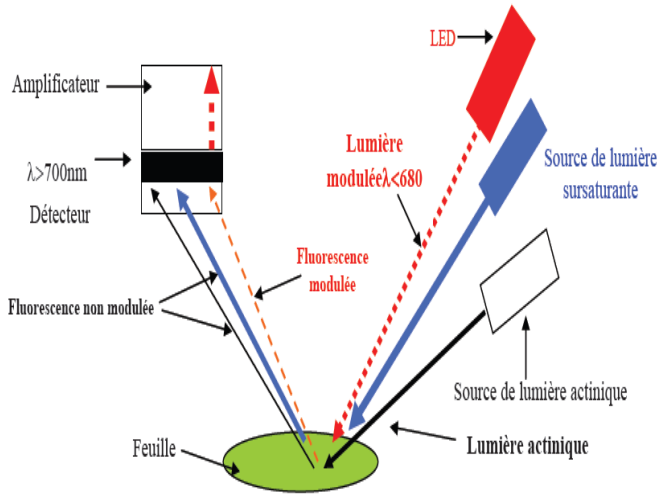
II.3.1.b. Le principe des mesures de la fluorescence chlorophyllienne

Les mesures de fluorescences sont effectuées grâce à un fluorimètre modulé (PAM 2000, Mini-PAM et Licor 6400). Elles sont effectuées sur la face supérieure d'une feuille ou d'un disque foliaire et trois types de lumière sont utilisés (***figure 17***):

(1) une lumière analytique modulée, dont l'intensité est constante et faible, réglée de telle sorte qu'elle ne produise pas de variations de la photochimie (ou une variation négligeable)

(2) une lumière actinique blanche d'intensité variable suffisamment puissante pour activer la photosynthèse

A B



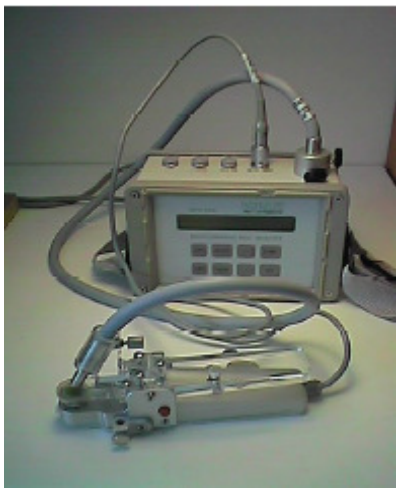


Figure 17 : (A) Schéma de la technique de mesure de l'émission de la fluorescence modulée de la chlorophylle d'une feuille. La lumière modulée émise par une LED à une longueur d'onde inférieure à 680 nm. Il lui correspond une fluorescence modulée qui, seule, est amplifiée par un amplificateur sélectif accordé sur la fréquence de modulation de la lumière modulée. La lumière actinique produit aussi une émission de fluorescence par la feuille. Cette émission n'est pas amplifiée. Une source de lumière sursaturante non modulée ferme tous les centres et produit aussi de la fluorescence non modulée qui n'est donc pas amplifiée. La lumière sursaturante est aussi une lumière actinique (www.ese.u-psud.fr/IMG/pdf/Effet_de_la_contrainte_hydrique.pdf). (B) Un exemple

(3) un éclairement actinique de lumière blanche de très forte intensité qui sature la photochimie (le rendement quantique de la photochimie tend alors vers zéro).

Cette technique de mesure permet de caractériser les niveaux de l'emission de fluorescence :

Fo représente le rendement de la fluorescence émise quand tous les centres réactionnels sont ouverts c'est à dire lorsque tous les accepteurs primaires des électrons émis par le PS II excité sont oxydés. Fo est mesuré sur une feuille pré-adaptée à l'obscuritéau au moins 30 minutes, soumise uniquement à la lumière analytique modulée. Dans ces conditions, la photochimie représente la voie majeure d'utilisation de l'énergie du PSII (le rendement quantique de la photochimie tend vers sa valeur maximale).

Fm représente le rendement de la fluorescence émise lorsque tous les centres réactionnels du PSII sont fermés c'est à dire lorsque tous les accepteurs primaires sont réduits (donc incapables de réaliser la stabilisation de charge). Fm est mesuré sur une feuille préadaptée à

l'obscurité soumise à un éclairement de lumière actinique saturante. Dans ces conditions, la probabilité pour que l'énergie d'un photon absorbée par l'antenne collectrice du PS II soit utilisée par la photochimie est nulle.

D'une façon symétrique, **F'o** et **F'm** correspondent aux quantités équivalentes mesurées sur des feuilles (pré)adaptées à la lumière.

Fs représente le rendement de la fluorescence émise quand la feuille préalablement adaptée à la lumière est soumise à un éclairement actinique d'intensité variable. Seule une partie des centres réactionnels est alors susceptible de réaliser la stabilisation de charge.

II.3.1.c. Paramètres de fluorescence chlorophyllienne

Les mesures de signal de fluorescence déjà décrit plus haut permet le calcul de :

- Rendement quantique maximum des centres réactionnels des PSII ou F_v/F_m : il estime la probabilité qu'une excitation soit désactivée via la photochimie:

$$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m \quad (10)$$

- Rendement quantique des centres ouverts du PSII ou F'_v/F'_m : ce paramètre est obtenu lorsque les mesures de fluorescence (F_o' et F_m') sont faite sur une feuille préadaptée à la lumière :

$$F'_v/F'_m = (F'_m - F'_o)/F'_m \quad (11)$$

- Rendement quantique opérationnel du PSII : Φ_{PSII}

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s)/F'_m \quad (12)$$

A partir de l'assimilation brute de CO_2 (A_n+Rd), de l'intensité de la lumière incidente (I) et le coefficient de l'absoprption des feuilles (α), le rendement quantique de l'assimilation de CO_2 (Φ_{CO2}) peut être calculé:

$$\Phi_{CO2} = (A_n+Rd)/(I.\alpha) \qquad (13)$$

Une excitation provoquée par un photon peut être désactivée selon plusieurs voies. Une partie de la lumière absorbée par l'appareil photosynthétique est utilisée pour la photochimie. L'autre partie est perdue sous forme de chaleur et de fluorescence. Toutes les voies de dé-excitation de la chlorophylle sont en compétition. On appelle quenching tout processus atténuant le rendement de la fluorescence chlorophyllienne. Deux types de quenching sont définis :

- Le quenching photochimique : c'est une estimation de la capacité du PSII à atténuer la fluorescence, il est lié à la concentration des centres ouverts qui sont susceptibles d'accepter l'excitation.

$$qP = (F'_m - F_s)/ (F'_m - F'_o) \qquad (14)$$

- Le quenching non photochimique : correspond à la dissipation de l'excitation sous forme de chaleur.

$$NPQ = (F_m - F'_m)/F'_m \qquad (15)$$

II.3.2. Courbes de réponses de la photosynthèse à la concentration de CO_2

L'assimilation carbonée ainsi que la fluorescence chlorophyllienne ont été mesurée sur des feuilles non détachées de la plante via le Licor 6400 couplé à un fluorimètre dans différentes conditions d'apport en CO_2 et O_2. Ces expériences sont réalisées à une température foliaire maintenue à 25°C. La feuille placée sous la pince est adaptée à l'obscurité pendant une heure environ afin de mesurer F_0, F_m et la respiration à l'obscurité (**Rn**).

Une intensité lumineuse incidente qui a été définie comme non saturante pour l'assimilation en CO_2 des plantes étudiées (à l'aide des courbes de réponse de la photosynthèse à la lumière; Priault, 2006) est utilisée pour l'induction de la photosynthèse. La stabilisation de la photosynthèse nécessite 30 minutes à une heure environ selon les génotypes (Dutilleul *et al.* 2003b). Des que l'état stationnaire de la photosynthèse est atteint, un programme est élaboré afin de varier la fraction molaire de CO_2 de l'air arrivant dans la pince (C_a). Les concentrations de CO_2 appliquées sont d'abord décroissantes puis augmentent jusqu'à 2000 ppm. La séquence est la suivante: 380, 300, 200, 100, 50, 380, 500, 750, 1500, 2000 ppm.

Tout au long de l'expérience, la fraction molaire en O_2 de l'air arrivant dans la pince et l'intensité lumineuse incidente sont maintenues respectivement à 210000 ppm et 350 µmoles PAR m^{-2} s^{-1}. Les paramètres de fluorescence chlorophyllienne F_o et F_m (pour les mesures à l'obscurité) et F'_o, F_s et F'_m (mesures à la lumière) sont déterminés à chaque mesure comme décrit plus haut. Classiquement, les résultats sont représentés sous forme d'une courbe An=f(C_i), C_i représentant la fraction molaire de CO_2 dans les espaces intercellulaires. Les courbes $A_n=f(C_a)$, ne sont pas facilement interprétées due aux étapes de limitation à la diffusion du CO_2 par la cuticule et les stomates. C_i est un paramètre calculé au cours de la mesure des échanges gazeux comme suit :

$$C_i = C_a - A_n/gs \qquad (16)$$

Cette courbe a été aussi réalisée sous très faible concentration en O_2 (environ 0,5%) avec une étape supplémentaire d'acclimatation aux conditions de très faibles O_2 avant de lancer le programme.

II.3.3. Calculs basés sur le couplage des échanges gazeux et de la fluorescence chlorophyllienne

II.3.3.a. Estimation de la conductance interne

Cette méthode repose sur une mesure simultanée des échanges gazeux photosynthétiques foliaires et du rendement de fluorescence de la chlorophylle *in vivo*. La conductance mésophyllienne à la diffusion de CO_2 (g_m) est estimée selon Long *et al.* (2003) :

$$g_m = \frac{A}{C_i - \frac{\Gamma^*(J+8(A+R_d))}{J-4(A+R_d)}} \qquad (17)$$

An et *Ci* sont obtenus à partir des données des échanges gazeux, Γ***** correspond à la concentration pour laquelle les pertes de dioxyde de carbone dues à la photorespiration sont compensées exactement par la vitesse de carboxylation. Γ***** est mesuré chez les plantes WT et CMS par Priault *et al.* (2006a).

J étant le flux total d'électrons transporté par la chaîne photosynthétique, il est calculé comme suit : ***J*** (µmol électrons m^{-2} s^{-1}) = Φ_{PSII}*PPFD*0.5*α. Le rendement quantique opérationnel de la photochimie du PSII (Φ_{PSII}) est multiplié par la moitié du flux quantique arrivant sur la feuille : PPFD x 0,5. En effet on pense que seule la moitié de la lumière est absorbée par le PSII, l'autre moitié est absorbée par le PSI. Le tout est multiplié par α qui représente coefficient de l'absorption des feuilles.

II.3.3.b. Réactions de carboxylation et d'oxygénation de la Rubisco : flux d'électrons

En supposant que le flux linéaire d'électrons est uniquement dévolu aux réactions de carboxylation et d'oxygénation de Rubisco (Valentini et al, 1995), la partition des électrons dirigés vers la photosynthèse, J_c et à la photorespiration, J_o peut être déterminé comme suit :

$$J_t = J_c + J_o \quad (18)$$

Comme quatre électrons sont nécessaires à la réalisation d'un cycle de carboxylation et d'oxygénation, et qu'une molécule de CO_2 est dégagée tous les deux cycles d'oxygénation par la décarboxylation de deux molécules de glycine au cours de la photorespiration (Harley et Sharkey, 1991), le flux d'électrons dirigé vers les réactions de carboxylation de la Rubisco peut s'exprimer sous la forme:

$$J_c = 4\ (A_n + 0.5\ J_o + \mathrm{Rd}) \quad (19)$$

En combinant les équations (**18**) et (**19**), les flux d'électrons dirigés vers l'une ou l'autre des réactions de la Rubisco sont calculés à partir du flux total d'électrons (*Jt*), de l'assimilation nette de CO2 et de la respiration à la lumière *Rd:*

$$J_c = 1/3\ [Jt + 8\ (A_n + \mathrm{Rd})] \quad (20)$$

$$J_o = 2/3\ [J_t - 4\ (A_n + \mathrm{Rd})] \quad (21)$$

II.3.3.c. Vitesse maximale de carboxylation de la Rubisco (V_{cmax})

Pour déterminer V_{cmax} , les courbes *An*/*ci* pour des *Ci* limitantes sont retracées sous la forme de relations de type Lineweaver-Burke $1/An = f(1/ci - \Gamma)$. V_{cmax} est alors déterminée comme l'inverse du point d'intersection de la courbe obtenue avec l'axe des ordonnées.

II.3.4.. Calcul de la limitation stomatique

La limitation imposée par la résistance stomatique sur l'assimilation nette de CO_2 par les feuilles est calculée par une méthode dite d'élimination (Jones *et al.,* 1985; Epron *et al.,* 1995), pour laquelle:

$$\mathbf{Ls= 1- (A_o/A_{max})} \qquad (\mathbf{22})$$

Où

Ao représente l'assimilation nette de CO_2 sous CO_2 ambiant (sous lequel la plante a été cultivée) et A_{max}, l'assimilation nette de CO_2 mais pour laquelle la concentration en CO_2 dans les espaces intercellulaires (*Ci*) est égale à la concentration atmosphérique (*Ca*), c'est à dire à 380 ppm, éliminant ainsi la limitation due à la diffusion en phase gazeuse (passages de la couche limite et des stomates).

II.4. application d'un stress hydrique couplé à différente intensité lumineuse

Dans cette partie des feuilles entières détachées de la plante ou des disques foliaires sont utilisés. Plusieurs intensités lumineuses sont utilisées au cours de cette étude : l'obscurité, 100 µmoles PAR m^{-2} s^{-1}, la lumière de croissance et une lumière de 1000 µmoles PAR m^{-2} s^{-1}. Pour les traitements à forte lumière (1000 PAR µmol m^{-2} s^{-1}) un dispositif spécial est utilisé. Il consiste à associer un bac inox balayé par un circuit d'eau provenant d'un bain thermostaté, à un système d'ampoules halogènes réglable en hauteur permettant d'obtenir un éclairement homogène de 1000 µmoles PAR m^{-2} s^{-1} sur une surface de 200 cm² environ.

Les paramètres suivis au cours de cette étude sont le RWC et la fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m). La durée de l'application de la contrainte hydrique associée à différentes intensités lumineuse quelque soit pour les feuilles entière et les disques est de 4 heures. Le RWC est mesuré après chaque heure pour les feuilles entières et les disques. Par contre le rapport F_v/F_m est mesuré chaque heure pour les disques foliaires et seulement aux temps to et après 4 heures pour les feuilles entières.

II.5. Dosage des pigments et des protéines solubles totales

II.5.1. Chlorophylles et caroténoïdes

Des disques foliaires sont broyés dans un mortier contenant 5 ml de tampon phosphate KH_2PO_4/K2HPO_4 50 mM, pH 7,5. Dans un tube en verre et sous la hotte, 4 mL d'acétone sont ajoutés à 1 mL du broyat. Le tout est agité au vortex et placé à l'obscurité pendant minimum

30 min. Il est ensuite centrifugé 10 min à 3000 *g*. Le surnageant est prélevé, et l'absorption (A) est mesuré au spectrophotomètre à différentes longueurs d'onde. La mesure est réalisée contre une solution (blanc) de 80% d'acétone. Les résultats sont exprimés en concentration de chlorophylle ou caroténoides : en mg/unité de surface (m^2) ou en mg/poids de matière fraiche (g) et ont été obtenus à partir des formules suivantes (Porra et al., 1989 et Röbbelen, 1957)

Chlorophylle a (mg/L)=11.78*(A664-A750)-2.29*(A646- A750)
Chlorophylle b (mg/L)=20.05*(A646- A750)-4.77*(A664- A750)
Chlorophylles totales (mg/L)= Chlorophylle a + Chlorophylle b
Caroténoïdes (mg/mL)=4.76*(A453-A750)-0.226(Chla + chl b)

Les valeurs des longueurs d'ondes auxquelles se font les mesures sont déterminées en fonction des spectres d'absorption respectifs de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et des caroténoïdes.
1 ml de l'extrait obtenu est conservé à -20°C jusqu'à dosage ultérieur des protéines totales solubles.

II.5.2. Protéines solubles totales

Le dosage des protéines soluble a été réalisé comme décrit par Gerhardt et Beevers (1968). A 1 ml de l'extrait conservé à -20°C, 10 ml de 20% d'acide trichloracétique est ajouté (pour précipiter les protéines : structure tertiaire) et le mélange est laissé pendant une journée à 4°C. Après centrifugation pendant 15 min à 5000 *g*, le culot est récupéré à lequel 1ml de 5% d'acide trichloracétique est ajouté. Après agitation, une deuxième centrifugation (5000 *g* pendant 15 min) est faite. Le culot est récupéré et est resolubilisé dans 0,5 ml 0,1 N NaOH avant l'addition de 0,5 ml de H2O. Ensuite 1 ml de CuSO4+ KNa-tartrate+ Na2CO3 (pour attaquer le groupement phénol des acides aminés) est ajouté. Le CuSO4+ KNa-tartrate+ Na2CO3 est préparé de la façon suivante : 1 ml de 2% CuSO4+ 1ml de 2% KNa-tartrate + 20 ml 10% Na2CO3 dans 0,5 NaOH. Après 5 min 3 ml de folin (10 ml folin + 100 ml H2O) sont ajoutés. Il faut attendre 60 min pour mesurer l'absorption à 540 nm. Une courbe d'étalonnage est déterminée avec le BSA à partir de laquelle la quantité de protéines est déterminée par gramme de poids frais ou par unité de surface.

II.6. Dosage des métabolites avec GC-MS

L'analyse des métabolites a été réalisée par GC-TOF-MS. Le matériel congelé a été broyé dans l'azote liquide, ensuite homogénéisé dans 1 mL de 0.8 méthanol / 0.2 H2O (v/v). 75 µL de 2 mM ribitol (Sigma A5502 ; CAS 488-81-3; FM=152.15) sont ajoutés comme standard interne. L'extrait est transféré ensuite dans des tubes eppendorf et centrifugé à 14000 rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré et est transféré dans des nouveaux tubes. Le culot, après avoir resuspendu dans 1 ml de 0,8 méthanol /0,2 H2O (v/v), il est vortexé et centrifugé à 14000 rpm à 4°C. Le surnageant récupéré a été divisé en aliquotes (2 x 0,1 mL; 3 x 0,2 mL et 2 x 0,4 mL) qui ont été ensuite séchés pendant une nuit dans un speed-vac sans chauffage. Les aliquotes secs ont ensuite été stockés à -80°C. Avant la dérivatisation des extraits secs, une solution composée de 8 alcanes dont les longueurs de chaînes sont comprises entre C8 et C36 a été préparée. Tout d'abord des solutions distinctes des alcanes (SO, ***Tableau I***) ont été préparées aux concentrations indiquées dans le ***tableau I***. Ensuite le mélange final a été produit en ajoutant les volumes nécessaires des solutions SO comme indiqué dans le ***tableau I***. le mélange d'alcanes a été ajouté aux échantillons afin de permettre une identification facile des pics en fonction de leur indice de rétention.

La dérivatisation : le but de cette étape est de faire à partir des molécules non volatiles ou faiblement volatiles des molécules volatilisées (par chauffage). Pour cela, les échantillons secs sont d'abord remis en suspensions dans 50 µL d'une solution de methoxyamine (20 mg (methoxyamine) / mL (pyridine)), ensuite vortexés et incubés pendant 90 min à 30°C avec agitation. Ensuite 80 µL d'un réactif MSTA (Sigma M7891; CAS 24589-78-4 ; FM=199.25) est ajouté aux échantillons qui sont ensuite vortexés et incubés pendant 30 min à 37°C avec agitation. Par la suite, les échantillons sont incubés pendant 120 min à la température ambiante. Quelques minutes avant l'injection dans le GC-MS, 10µl de la solution contenant le mélange d'alcanes sont ajoutés aux échantillons et qui sont ensuite transférés dans des flacons d'injection.

Tableau I : Préparation du mélange d'alcanes

Alkanes	**Molecular Formula**	**S0 (mM)**	**mg / 1mL**	**V (µL) from S0**	**Final mixture**
Decane	$C_{10}H_{22}$	100	14.2	70	7
Pentadecane	$C_{15}H_{32}$	100	21.2	14	1.4
Octadecane	$C_{18}H_{38}$	100	25.5	14	1.4
Nonadecane	$C_{19}H_{40}$	100	26.8	14	1.4
Docosane	$C_{22}H_{46}$	100	31.1	14	1.4
Octacosane	$C_{28}H_{58}$	100	39.5	14	1.4
Dotriacontane	$C_{32}H_{66}$	20	9.0	70	1.4
Hexatriacontane	$C_{36}H_{74}$	20	10.1	70	1.4

La phase de chromatographie en phase gazeuse consiste en une augmentation progressive de la température du four par 15°C / min, à partir de 80°C jusqu'à 330°C. Les molécules volatilisées qui ont été séparées pendant l'étape de GC sont ionisées par impact d'électrons et par les patterns de fragmentation déterminé par la spectrométrie de masse (TOF-MS : time-of-flight mass Spectrometry).

Les profiles de GC-MS obtenus ont ensuite été traités en utilisant le logiciel Leco. Les pics ont été identifiés automatiquement et le spectre de masse de chaque pic a été comparé avec les spectres de masse disponibles dans notre base de données. Ensuite, l'utilisation d'une liste de référence de métabolites, dont les indices de rétention et les spectres de masse sont établies de manière fiable, nous permet de vérifier et de corriger manuellement (basée sur les indices de rétention et les spectres de masse) l'identification des métabolites obtenus (représentés par les pics). L'intégration de chaque pic a été faite en utilisant un fragment caractéristique de masse qui est approprié pour le métabolite correspondant.

II.7. Analyse des acides aminés par HPLC quantitative

Les acides aminés ont été quantifiés par HPLC en utilisant des aliquotes séchés obtenues pendant les analyses GC-MS, basée sur la dérivatisation des groupements amines primaires par l'*o* -pthaldialdehyde (OPA) selon la méthode décrite par Noctor *et al.,* (2007b). Le réactif OPA a été préparé au moins 24 h avant l'injection, en dissolvant 11 mg d'OPA dans 0,2 mL de méthanol et 1,8 mL 0,5 M de sodium de borate (pH 9.5) à laquelle 40 µL de 2-mercaptoéthanol sont ajoutés. Le réactif a été filtré dans un flacon et conservé à température ambiante pendant 24h avant de l'utiliser. Les aliquotes secs ont été redissous dans 1,3 ml d'eau, vortexés, filtrés et transférés dans des flacons. La dérivatisation a été fait automatiquement dans l'injecteur en mélangeant 10 µl de l'extrait et 10 µL d'OPA suivi d'une incubation de 2 min avant l'injection. Le temps d'exécution par injection était de 40 à 50 min. Les acides aminés sont séparés par gradient d'élution en utilisant deux tampons : Un tampon A (20% méthanol, 80% acétate de sodium et 1% THF) et un tampon B (80% méthanol, 20% acétate de sodium). Les dérivés d'amines ont été détectés par fluorescence et identifiés par comparaison aux temps d'élution des standards injectés dans le même échantillon. L'intégration et les traitements des donnés ont été effectués en utilisant Empower Pro Software.

III. Analyses staististiques

Lorsque cela n'est pas mentionné de façon spécifique, chaque expérimentation a été réalisée au minimum trois fois et les erreurs standards sont données. Le niveau de significativité des différences a été déterminée en utilisant le test de Student à $p<0,05$.

I. Comparaison des paramètres hydriques entre des plantes WT et des mutants CMS

I.1. Croissance et caractéristique des plantes

Les plantes CMS montrent un retard de croissance pour l'intensité lumineuse de croissance appliqué (350 PAR µmol m^{-2} s^{-1}) comparativement aux plantes WT cultivées dans les mêmes conditions. Les deux génotypes doivent avoir la même surface foliaire totale (surface évaporative) et donc un âge différent (***tableau II***). Pour cela le semis chez les CMS est avancé par rapport aux WT afin d'avoir le même stade de développement chez les deux génotypes en même temps. Le ***tableau II*** démontre certaines caractéristiques des plantes WT et CMS au stade à laquelle on applique le stress hydrique.

Tableau II : Un exemple de quelques valeurs de base de la croissance et de structure des plantes WT et CMS de *Nicotiana sylvestris* avant toutes expériences de déshydratation. Ils montrent la similitude de WT et du CMS. Les plantes ont été cultivées sous 350 µmoles PAR m^{-2} s^{-1} et 25 °C. Les paramètres ont été déterminés sur les premières feuilles matures de plantes avant le début de montaison (Age). La surface foliaire (Surface), le contenu total en protéines soluble (Prot. Solubles) et en chlorophylles a et b (Chl totales) et le rapport chlorophylle a/chlorophylle b (Chl a/b) ont été mesurés. L'assimilation nette de CO_2 et la conductance stomatique (respectivement A_n et g_s) ont été déterminés par le système de mesure des échanges gazeux. Deux paramètres issus des courbes de réponses de l'assimilation nette de CO_2 à la concentration interne de CO_2 ont été utilisés : le point de compensation pour le CO_2 (Γ) et la pente initiale de la courbe, équivalente à l'efficacité de carboxylation (*EC*). Les valeurs marquées par des lettres (a, b) différentes sont significativement différentes ($p< 0,05$).

	WT	**CMS**
Age (semaines)	6-9	10-12
Nombre de feuille	5-7	6-8
Surface (cm^2)	1271 ± 53^{a}	1264 ± 37^{a}
Prot. Solubles (g m^{-2})	$1,53 \pm 0,042^{a}$	$1,60 \pm 0,085^{a}$
Chl totales (g m^{-2})	$0,34 \pm 0,0029^{a}$	$0,37 \pm 0,01^{a}$
Chl a/b	$3,6 \pm 0,047^{a}$	$3,86 \pm 0,11^{a}$
Γ (µmol m^{-2} s^{-1})	$56,16 \pm 1,60^{a}$	$62 \pm 1,15^{b}$
EC (µmol.m-2.s-1)	$0,06 \pm 0,02^{a}$	$0,051 \pm 0,02^{b}$
A_n (µmol m^{-2} s^{-1})	$14,29 \pm 0,45^{a}$	$12,09 \pm 0,41^{b}$
g_s (mol m^{-2} s^{-1})	$0,32 \pm 0,052^{a}$	$0,21 \pm 0,028^{a}$

Le contenu en protéines solubles totales, exprimé par unité de surface foliaire, est égal chez les plantes WT et CMS (***tableau II***). Le contenu en pigments chlorophylliens exprimé par unité de surface, ainsi que le rapport chlorophylles a/b présentés dans le ***tableau II*** sont identiques chez les deux génotypes. Par contre, la photosynthèse (A_n) sous conditions de croissance étant plus élevée chez les plantes WT que chez CMS. À partir des courbes de réponse de l'assimilation nette de CO_2 en fonction de la concentration interne de CO_2 (courbe

A_n/Ci), on a montré que le point de compensation (Γ) est légèrement plus élevé chez les plantes CMS comparativement aux plantes WT. La pente à l'origine de la courbe A_n/Ci (efficacité de carboxylation : *EC*) est inférieure chez les plantes CMS (***Tableau II***). La conductance stomatique (g_s) est aussi inférieure chez les feuilles des plantes CMS.

I.2. Les stomates sont plus fermés chez les plantes CMS

Nous avons suivi l'ouverture des stomates chez les plantes WT et CMS bien hydratées lors du passage de l'obscurité à la lumière. Pour cela une courbe d'induction de l'ouverture des stomates est élaborée pour les plantes WT et CMS (***figure 18***). Tout d'abord les feuilles sont pré-adaptées à l'obscurité. Après stabilisation, des mesures de la conductance stomatique sont effectuées à intervalle de 3 minutes.

La ***figure 18A*** montre qu'à l'obscurité, la conductance stomatique est plus élevée chez le WT que chez le CMS. Lors du passage de l'obscurité à la lumière (350 µmol m^{-2} s^{-1}), la cinétique d'augmentation de g_s est plus rapide chez le WT par comparaison aux CMS, et la différence est plus importante à la lumière qu'à l'obscurité. Dans des conditions atmosphériques de CO_2 et d'oxygène, la période nécessaire pour stabiliser g_s est plus longue chez CMS. Ce décalage par rapport au WT au niveau de l'ouverture des stomates retarde aussi l'induction de la photosynthèse par rapport au WT (***figure 18B***). Chez le WT, cette phase d'induction est plus courte et atteint l'état stable en 25 min.

Des études antérieurs (Priault, 2006) ont montré que les plantes WT et CMS cultivées sous une lumière de croissance de 350 µmol m^{-2} s^{-1} présentent des indices stomatiques très semblables et par conséquent, la différence de g_s entre WT et CMS ne dépend pas de la densité des stomates. La conductance stomatique plus faible montre donc que les stomates sont plus fermés chez le CMS dans les conditions bien hydratées.

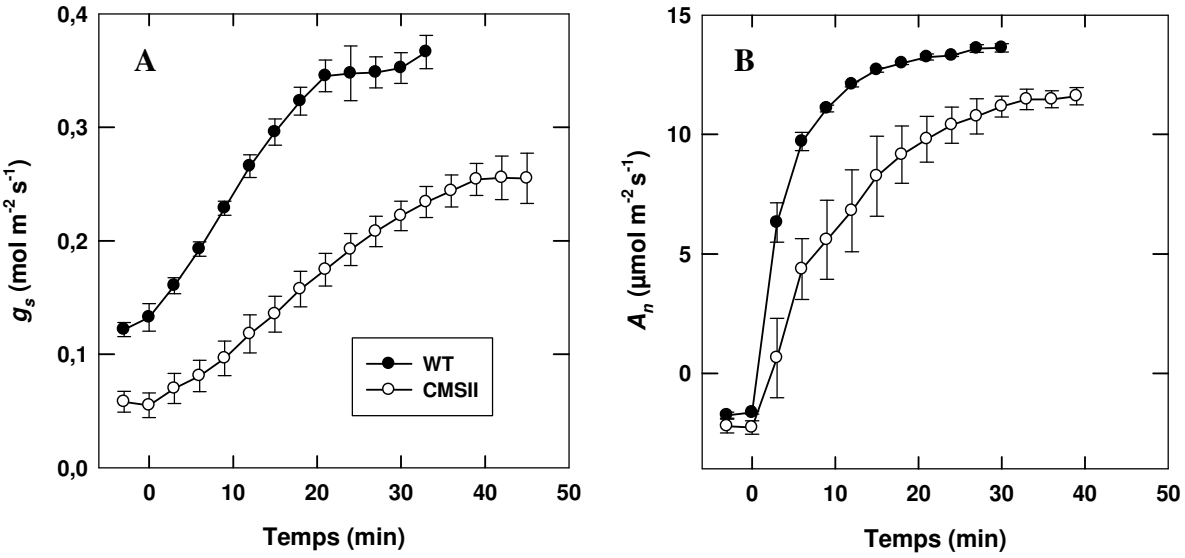


Figure 18 : Courbes d'induction de la conductance stomatique (**A**) et de la photosynthèse (**B**) lors de la transition obscurité/lumière. Les mesures sont réalisées à une lumière incidente de 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1}, une température de 25°C et un VPDL de 1. Chaque point est la moyenne ± SE de 4 répétitions indépendantes. Où non apparentes, les barres d'erreur sont cachées par le symbole.

I.3 Les facteurs qui influencent les mouvements des stomates

Les mouvements des stomates sont extrêmement modulés par les facteurs physiologiques internes de la plante et de l'environnement tel que la concentration intercellulaire de CO_2, le potentiel osmotique et la conductance hydraulique.

I.3.1 Réponse des stomates à la fraction molaire intercellulaire de CO_2

La réponse de g_s à la fraction molaire intercellulaire de CO_2 (C_i) (***figure 19A***) montre que la conductance stomatique est plus faible chez les plantes CMS à toutes les différentes fractions molaires de CO_2 intercellulaire. Par contre, l'ouverture des stomates est modulée de façon similaire chez les deux génotypes par la pression partielle de CO_2 des espaces intercellulaires du mésophylle : une faible pression partielle de CO_2 stimule l'ouverture, tandis qu'une forte pression partielle induit la fermeture. De même que pour la conductance stomatique, la transpiration est plus importante chez WT par rapport aux CMS quel que soit la fraction molaire de CO_2 (***figure 19B***).

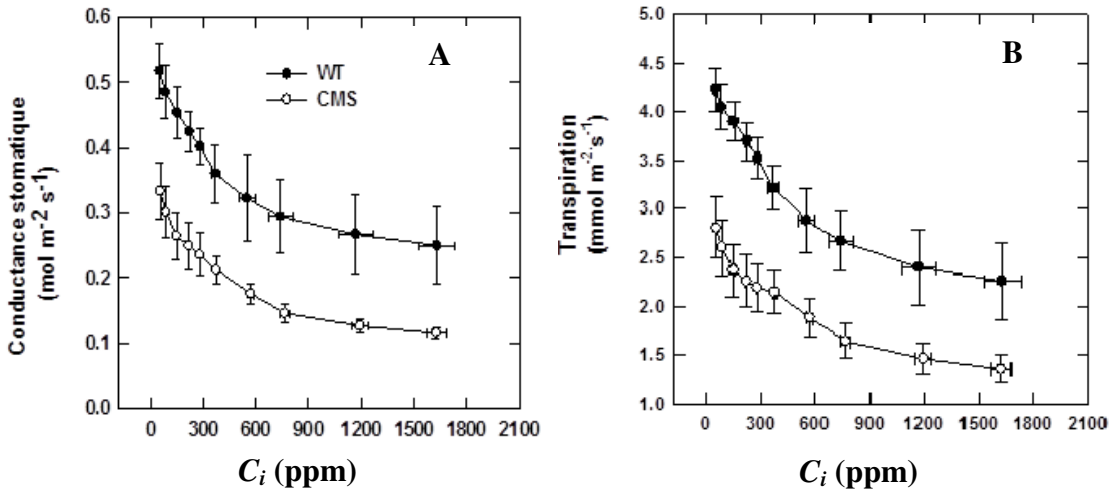


Figure 19 : La conductance stomatique (**A**) et la transpiration (**B**) en fonction de la fraction molaire de CO_2 intercellulaire (*Ci*). Les mesures sont faites sous une intensité lumineuse de 350 µmol.m^{-2}.s^{-1}, une température de 25°C et un VPDL de 1. La fraction molaire de l'oxygène est égale aux valeurs atmosphériques (21% 0_2). Chaque point est la moyenne ± SE de 4 répétitions indépendantes. Où non apparentes, les barres d'erreur sont cachées par le symbole.

I.3.2. Statut hydrique des plantes

Un autre élément régulateur de l'ouverture des stomates est le potentiel osmotique. En réponse à la lumière, plusieurs mécanismes contribuent à diminuer le potentiel osmotique de la cellule de garde et ainsi à ouvrir les stomates.

I.3.2.a les composés osmotiques

Plusieurs composés osmotiques participent à la détermination du potentiel osmotique et donc participent à la régulation des mouvements stomatiques. Afin de comparer le taux de ces composés osmotiques chez les feuilles des plantes des deux génotypes, les acides aminés, les sucres et les sucres alcools sont dosés (***figure 20***).

Les contenus en acides aminés totaux, en saccharose, en myoinositol, en mannitol et en pentoses sont plus élevés chez les feuilles de CMS par rapport aux feuilles de WT. Par contre le contenu en hexoses est plus élevé chez le WT. À partir de cette différence en contenu des métabolites on peut se demander si le potentiel osmotique soit aussi différent entre les deux génotypes.

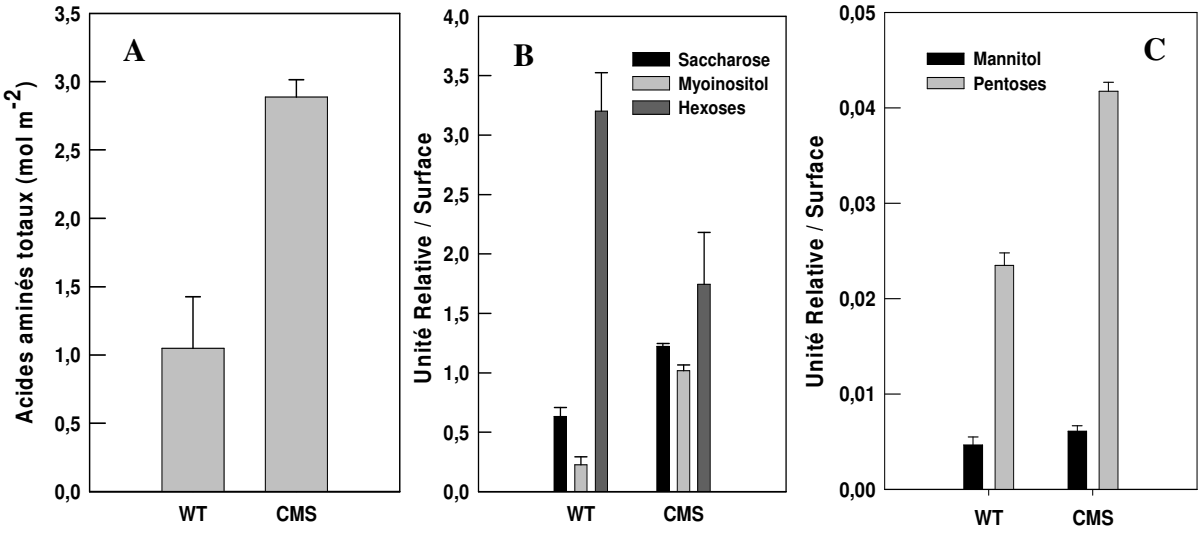


Figure 20 : **A** : Contenu en acides aminés, **B** : Contenu en saccharose, myoinositol et hexoses, **C** : Contenu en mannitol et en pentoses dans les feuilles des plantes WT et CMS. Les acides aminés sont dosés par HPLC et les autres métabolites sont dosés par GC-TOF-MS. Les valeurs sont les moyennes ± SE de 3 mesures.

I.3.2.b le potentiel osmotique

La ***figure 21***, représente les deux courbes de pression volume établies sur les feuilles des plantes WT et CMS. L'extrapolation de la partie linéaire sur l'axe des ordonnées permet d'obtenir l'inverse du potentiel osmotique à pleine turgescence ($1/\Pi_0$). De même, la projection des coordonnées du point de départ de la partie linéaire permet d'obtenir, sur l'axe des ordonnées, l'inverse du potentiel osmotique à turgescence nulle ($1/\Pi_{TLP}$) et, sur l'axe des abscisses, la teneur relative en eau pour laquelle la turgescence s'annule (RWC_{TLP}). Les deux courbes permettent d'estimer le potentiel osmotique à pleine turgescence à des valeurs de l'ordre de -0.81± 0.06 et -0.88 ± 0.06 MPa respectivement chez les feuilles des plantes WT et CMS. La perte de turgescence est observée à des valeurs de RWC proche de 0,8 chez les deux génotypes qui correspondait à des potentiels osmotiques de l'ordre de -1,12 et -1,29 MPa respectivement chez WT et CMS (***tableau II***).

À partir de la relation établie entre $-1/\Psi$ et RWC et de la relation calculée entre $-1/\Pi$ et RWC, il est possible de calculer la relation entre la pression de turgescence (*P*) et RWC à partir de

l'équation ($P = \Psi - \Pi$). Le ***tableau III***, montre que les plantes WT et CMS possèdent la même pression de turgescence à saturation (*Po*).

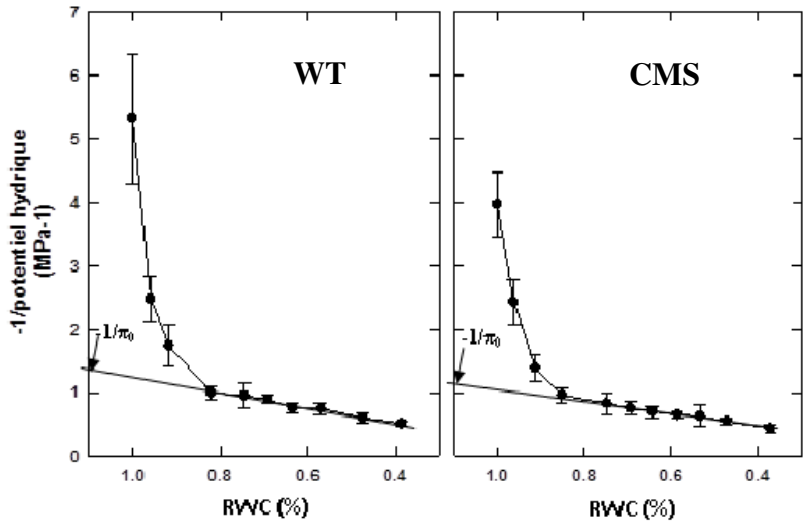


Figure 21: Courbes de variation de -1/Ψ en fonction de RWC obtenues sur des disques foliaires des plantes WT et CMS bien hydratées. Les droites de régression linéaires donnent la variation de $1/\Pi$ en fonction de RWC. La courbe décrivant la variation non linéaire de 1/Ψ avec RWC correspond à la zone de turgescence.

Tableau III **:** potentiel osmotique à saturation (Π_0), potentiel osmotique à la perte de turgescence (Π_{TLP}), teneur relative en eau à la perte de turgescence (RWC_{TLP}) et pression de turgescence à saturation (P_0). Tous ces paramètres sont déduits des courbes Pression-Volume de la ***figure 21.***

	WT	**CMS**
Π_0 (MPa)	-0.87 ± 0.08 [a]	-0.99 ± 0.08 [a]
Π_{TLP} (MPa)	-1,12 ± 0,06 [a]	-1,29 ± 0,12 [a]
RWC_{TLP} (%)	0,7 7 ± 0,03 [a]	0,75 ± 0,03 [a]
P_0 (Mpa)	0,51 ± 0,72 [a]	0,49 ± 0,68 [a]

Le potentiel osmotique chez les plantes WT et CMS est mesuré aussi directement en congelant des disques foliaires dans l'azote liquide afin de rompre les membranes. Dans ce cas, le potentiel hydrique mesuré correspond à la valeur de la pression osmotique. Cette expérience confirme qu'il n'y avait pas de différence de potentiel osmotique entre les deux génotypes. Le potentiel osmotique mesuré directement étant de -1,12 ± 0,042 et -1,077 ± 0,065 Mpa respectivement chez WT et CMS.

Une différence éventuelle de potentiel osmotique peut affecter la température de congélation des feuilles. Ce paramètre est mesuré chez des disques foliaires des deux génotypes étudiés. Les disques foliaires des plantes WT et CMS gèlent respectivement à -6,087 ± 0,213 et -6,35 ± 0,149 °C. Ceci confirme l'absence de différence significative de potentiel osmotique entre les deux génotypes.

Ces différentes façons de détermination de potentiel osmotique montre que malgré la différence des taux en métabolites solubles (***Figure 20***) le potentiel osmotique est similaire chez les deux génotypes.

Il n'ya pas de différences enregistrés entre les feuilles des plantes WT et CMS en terme de potentiel osmotique à la perte de turgescence (Π_{tlp}), potentiel osmotique à saturation (Π_0) et pression de turgescence à saturation (P_0). Ceci suggère que les feuilles des plantes WT et CMS possèdent le même statut hydrique et les mêmes propriétés mécaniques de la paroi cellulaire et que la différence de g_s enregistrée entre les deux génotypes n'est pas due à une différence de ces relations hydriques.

I.3.3. La conductance hydraulique

Les stomates par leurs mouvements aboutissent aussi à maintenir l'homéostasie relative du potentiel hydrique qui est habituellement conservée au-dessus d'un potentiel seuil critique déclenchant la cavitation des veines (Delzon et al. 2005 ; Salleo et al. 2000; Nardini 2008). Les potentiels hydriques foliaires des plantes hydratées sont de 0,52±0,04 et 0,58±0,032 MPa respectivement chez les plantes WT et CMS. La capacitance des feuilles calculée à partir des analyses pression volume dans la gamme de potentiel hydrique correspondant ne présente pas de différence significative entre WT et CMS. Elle est respectivement de 3,61 ± 0,31 et 3,92 ± 0,28 mol m^{-2} MPa^{-1} chez CMS et WT.

Le calcul de K_{fol} à partir de l'équation **8** montre qu'elle est plus élevée chez les plantes WT comparativement aux plantes CMS (***figure 22***).

Cette différence significative de la conductance hydraulique foliaire entre les plantes WT et CMS bien hydratées peut être probablement l'un des facteurs responsables de la différence de la conductance stomatique entre les deux génotypes.

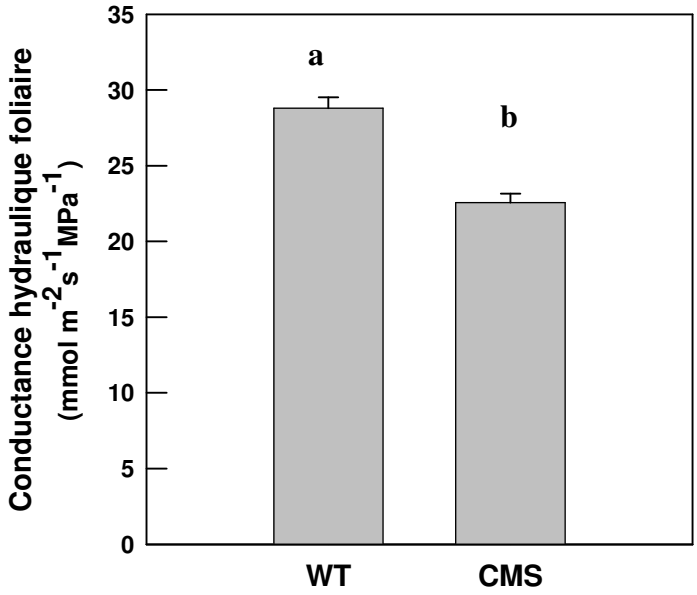


Figure 22 : Conductance hydraulique foliaire mesurée sur des disques prélevés à partir des feuilles des plantes WT et CMS bien hydratées. Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 6 mesures. La différence entre les deux génotypes est significative avec p <

II. Comparaison des plantes WT et CMS de *Nicotian sylvestris* au cours de la déshydratation

II.1 Contexte

Chez les plantes bien hydratées, la conductance stomatique était plus faible chez les CMS en comparaison avec les WT. Nous avons testé si cette différence de g_s induit une différence de réponse vis à vis de la sécheresse entre les deux génotypes. Pour cela nous avons comparé la réponse des plantes WT et CMS à une déshydratation par arrêt de l'arrosage. Le RWC, la conductance stomatique et la photosynthèse sont suivis au cours de cette déshydratation. La comparaison entre les deux génotypes pour leur réponse à la déshydratation est faite aussi à l'échelle de la feuille détachée.

II.2. Changement du contenu relatif en eau au cours de la déshydratation

Lorsque les plantes des deux génotypes atteignent le même stade de développement, une contrainte hydrique par arrêt de l'arrosage est appliquée. Le suivi du contenu relatif en eau (RWC) des plantes au cours de la déshydratation montre une différence de comportement chez les plantes WT et CMS. L'arrêt de l'arrosage induit une diminution de RWC chez les deux génotypes. Cette diminution est plus rapide chez les plantes WT. Après 6 jours de l'arrêt de l'arrosage, le RWC est réduit de 16% et 33% respectivement chez CMS et WT (***figure 23***). Ceci montre que les plantes CMS maintiennent plus longtemps leur statut hydrique.

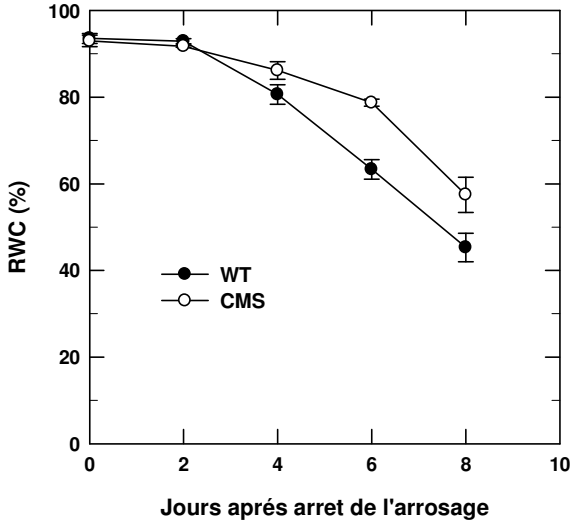


Figure 23 : Variation de RWC au cours de la déshydratation chez WT et CMS. Les plantes sont cultivées sous une lumière de 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1}, une température de 25°C et une photopériode de 16h. Chaque point est la moyenne ± SE de 4 répétitions indépendantes. Où non apparentes, les barres d'erreur sont cachées par le symbole.

II.3. Fermeture stomatique au cours de la déshydratation

II.3.1. Estimation de la perte d'eau au cours de la déshydratation

La conductance stomatique et la transpiration ont été suivies durant la déshydratation chaque deux jours après l'arrêt de l'arrosage. Ces mesures montrent que la transpiration à l'obscurité et à la lumière pour une surface donnée de la feuille est plus élevée chez le WT que chez le CMS durant les deux premiers jours. Connaissant la surface foliaire totale des plantes WT et CMS, on peut estimer la quantité d'eau perdue par transpiration chez les plantes entières au cours des deux premiers jours de l'arrêt de l'arrosage. À partir de ce calcul on a montré qu'après 24 heures d'arrêt de l'arrosage les plantes WT et CMS perdent respectivement 486±5 ml et 348±17 ml d'eau. Ceci montre que les plantes WT perdent environ 300 ml d'eau plus que les CMS durant les deux premiers jours d'arrêt de l'arrosage. Ainsi l'eau devient plus disponible dans les pots des plantes CMS durant la déshydratation. Une plus faible disponibilité d'eau dans les pots des plantes WT peut expliquer la diminution plus rapide de RWC chez ces plantes.

Cette estimation de la transpiration à l'échelle de la plante entière est confirmée par le suivi du poids des pots des deux types de plantes durant la déshydratation (***figure 24***). À partir du deuxième jour d'arrêt de l'arrosage l'eau devient plus disponible dans les pots des plantes CMS comparativement aux pots des plantes WT.

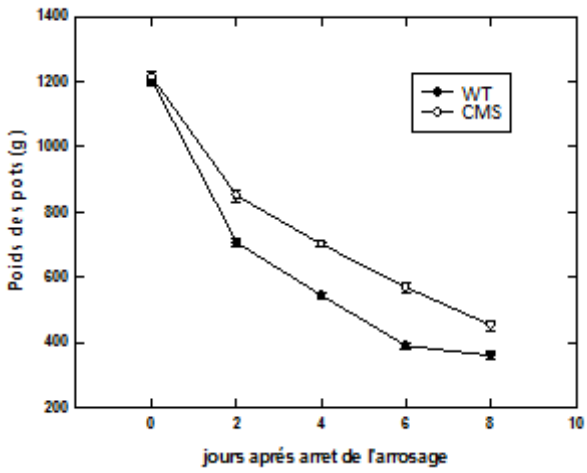


Figure 24 : suivi des poids des pots au cours de la déshydratation. Les plantes sont cultivées sous une lumière de 350 µmol.m^{-2}.s^{-1}. La photopériode est de 16h et la température est de 25/20°C (jour/nuit)

II.3.2. la régulation des stomates au cours de la déshydratation

La ***figure 25.A*** montre qu'au début de la déshydratation g_s est plus élevée chez les plantes WT que chez les plantes CMS. Après 4 jours de déshydratation, g_s est identique chez les deux génotypes et est même légèrement supérieur chez le CMS à la fin de déshydratation. Ceci montre que g_s décroît plus rapidement chez le type sauvage (WT) après l'arrêt de l'arrosage. Lorsqu'on représente g_s en fonction de RWC (***figure 25.B***), elle reste inférieure chez le CMS jusqu'à un RWC de 65 % puis elle est identique entre les deux génotypes. Cette courbe (***figure 25B***) peut être divisé en deux phases : la première phase s'étale jusqu'à un RWC de 80% pendant laquelle la régulation est similaire chez les deux génotypes ou la différence de g_s de départ est préservé. La deuxième phase, au-dessous d'un RWC de 80%, la différence de g_s entre les deux génotypes commence à diminuer jusqu'à s'annuler complètement autour d'un RWC de 65%.

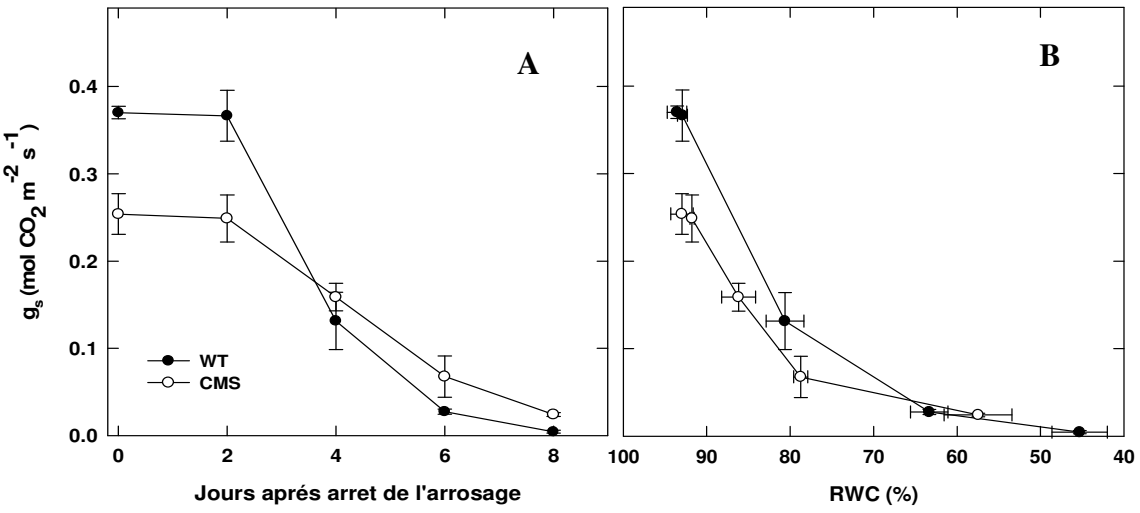


Figure 25 : Evolution de la conductance stomatique (g_s) en fonction du temps d'arrêt de l'arrosage (**A**) et en fonction de RWC des feuilles (**B**). Les mesures de g_s sont réalisées sous une lumière de 350 PAR µmol.m^{-2} s^{-1} et une température de 25°C. Les concentrations de CO_2 et de l'oxygène sont respectivement 380 ppm et 21%O_2. Chaque point est la moyenne ± SE de 4 répétitions indépendantes. Où non apparentes, les barres d'erreur sont cachées par le symbole.

II.3.3 Analyse de la déshydratation des disques foliaires et des feuilles détachés

La diminution plus lente de RWC durant la déshydratation chez le CMS dépend de sa plus faible conductance stomatique (et donc la transpiration) en conditions bien hydratées et aux premiers jours de la déshydratation. Pour étudier l'importance de la faible transpiration dans le maintien d'un RWC élevé chez les CMS, nous avons comparé la diminution de RWC chez des rondelles et des feuilles entières détachées des deux génotypes soumis à déshydratation sous plusieurs conditions.

Des disques foliaires de diamètre de 9 cm^2 sont prélevés sur des plantes WT et CMS. Après saturation dans l'eau, les disques sont déshydratés soit à l'obscurité soit sous deux intensités lumineuses : 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1} et 1000 PAR µmol m^{-2} s^{-1} (***figure 26***).

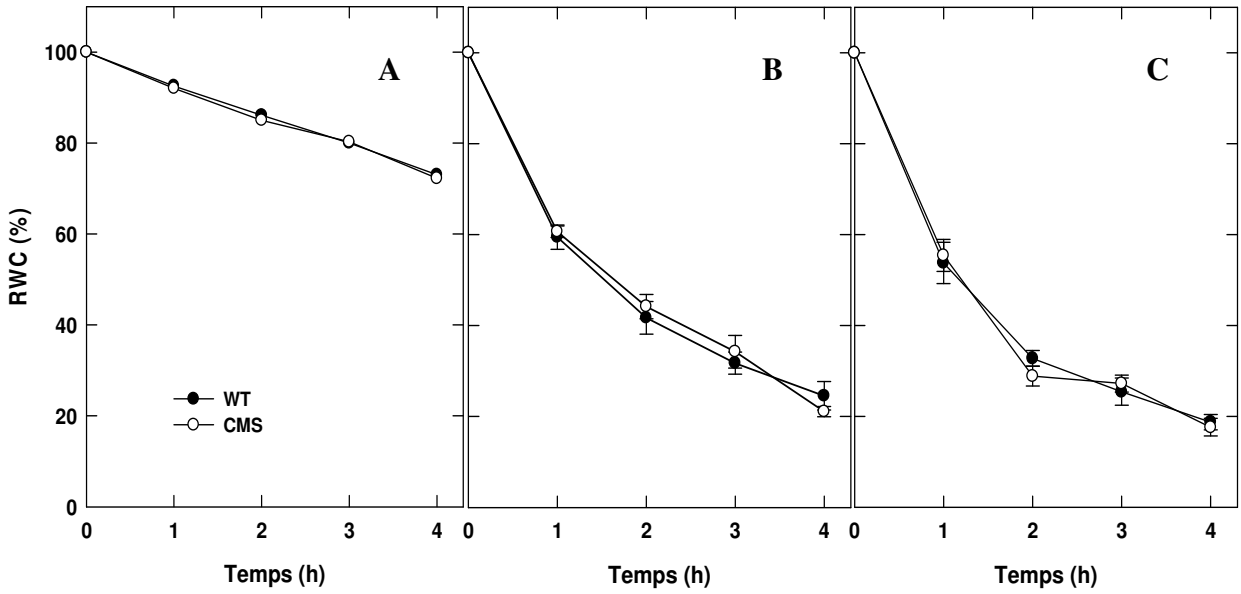


Figure 26 : l'évolution de RWC (%) des disques foliaires au cours de la déshydratation à l'obscurité et à 20°C (**A**), à la lumière de croissance et à 25°C (**B**) et à forte lumière et à 20°C (**C**). Chaque point est la moyenne ± SE d'au moins 6 mesures. Où non apparentes, les barres d'erreur sont cachées par le symbole.

La diminution de RWC dans les disques foliaires dépend de la lumière : elle est de plus en plus rapide lorsque la lumière est plus forte ce qui confirme la stimulation de l'ouverture des stomates par la lumière en comparaison avec l'obscurité mais cette diminution est égale chez les deux génotypes quelque soit les conditions. La différence de la diminution de RWC entre la lumière de croissance (350 PAR µmol. $m^{-2}.s^{-1}$) et la forte lumière (1000 PAR µmol. $m^{-2}.s^{-1}$) est importante seulement pendant les deux premières heures de déshydratation. Au delà de

deux heures cette diminution est similaire sous les deux intensités lumineuses. Ceci est du à la température plus forte lorsque la déshydratation est faite sous la lumière de croissance.
L'absence de différence dans la diminution de RWC chez les disques foliaire entre les deux génotypes ne correspond aux résultats trouvés à l'échelle de la plante entière et ne confirme pas la différence de transpiration mesurée entre les deux génotypes. Ceci peut être expliqué par le fait que dans une faible surface de la feuille ce n'est pas seulement l'ouverture stomatique qui contrôle la perte de RWC. Cependant, étant donné leur petite surface, une évaporation par les bords des disques pourrait être le facteur prédominant de la baisse de RWC sur les disques.

Pour diminuer l'effet possible des pertes d'eau par les bords des disques, des feuilles entières ont été soumises à déshydratation (***figure 27***). Sous les conditions de croissance (***figure 27 A***), on observe une différence de diminution de RWC entre les deux génotypes ce qui n'est pas observé avec les disques. Ceci revient probablement à une différence d'ouverture des stomates qui est plus élevé chez le WT lorsque mesurée sur les feuilles des plantes entières. Pour tester l'effet de la lumière sur l'ouverture stomatique, les feuilles sont soumises à une déshydratation à 20°C sous deux intensités lumineuses différentes : une lumière faible de 100 µmol m^{-2} s^{-1} (***figure 27B***) et une lumière forte de 1000 PAR µmol m^{-2} s^{-1} (***figure 27C***).
Sous la lumière faible, le RWC diminue de la même manière durant la déshydratation chez les deux génotypes. Alors que sous la lumière forte (1000 PAR µmol.m^{-2}.s^{-1}), la diminution de RWC est plus lente chez les CMS suggérant une ouverture stomatique plus élevé chez WT en fonction de la lumière. Ces résultats suggèrent que le RWC plus forte chez les feuilles de CMS durant la déshydratation des plantes entières résulte d'une plus faible transpiration. Dans cette expérience on remarque que la diminution de RWC est plus forte sous la lumière de croissance que sous la lumière forte. Ceci est dû à la température plus élevée dans les conditions de croissance (25°C) et peut être aussi d'une ventilation plus forte.

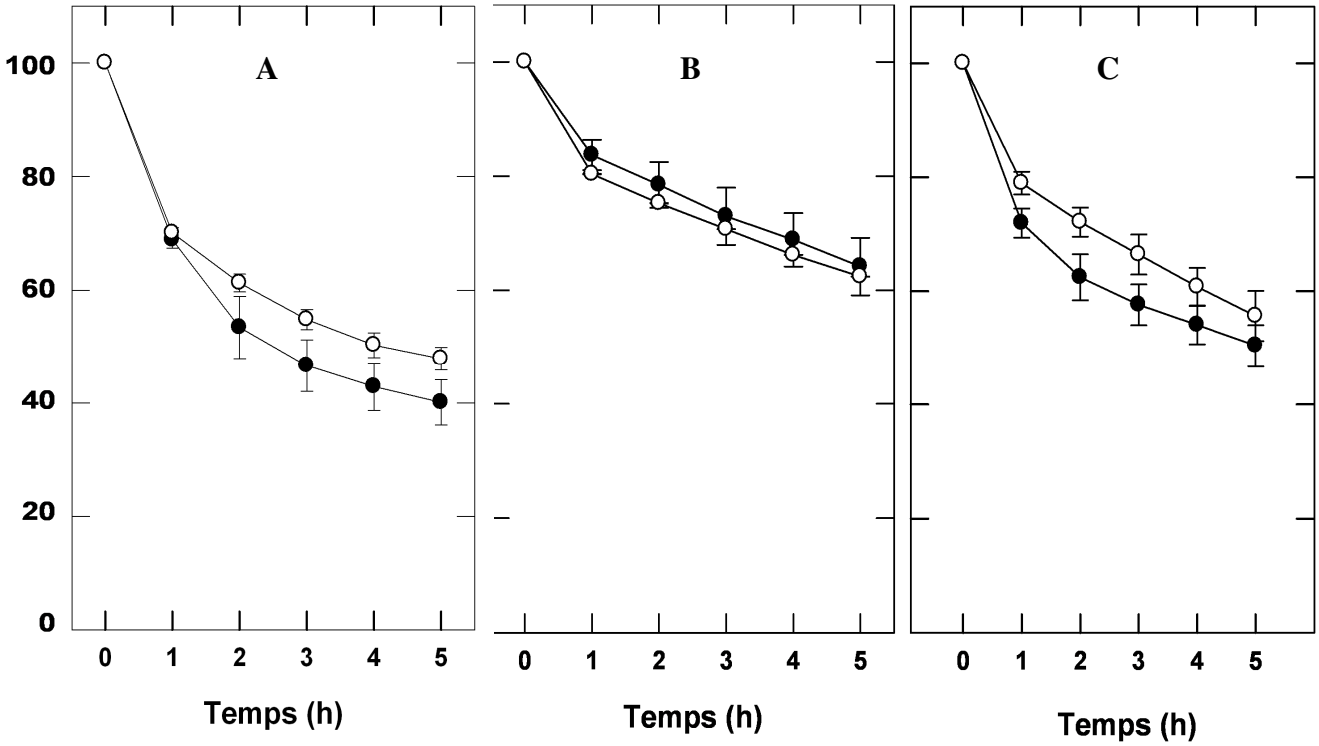


Figure 27: L'évolution de RWC (%) des feuilles entières détachées au cours de la déshydratation sous une lumière de croissance (350 µmol m^{-2} s^{-1}) à 25°C (**A**), une faible lumière à 20°C (100 µmol m^{-2} s^{-1}) (**B**) et une forte lumière (1000 µmol m^{-2} s^{-1}) à 20°C (**C**). Chaque point est la moyenne ± SE d'au moins 6 mesures.

II.4. Inhibition de la photosynthèse au cours de la déshydratation

La diminution d'A_n en fonction du temps de déshydratation est plus rapide chez WT par rapport aux CMS (***Figure 28A***). Par contre pour un même RWC, la photosynthèse des plantes CMS est inférieure à celle des plantes WT (***Figure 28B***), en bon accord avec la diminution de g_s. Lorsque RWC est inférieure à 70%, A_n, comme g_s, devient similaire entre les deux génotypes. La relation entre A_n et g_s est identique entre les plantes WT et CMS (***figure 29***), montrant une bonne corrélation entre les deux paramètres. Cette relation montre que c'est la fermeture des stomates qui induit la baisse de la photosynthèse au cours de la déshydratation chez les deux génotypes. Ceci dit que les mouvements des stomates modulaient la photosynthèse, en contrôlant l'apport en CO_2 dans le mésophylle.

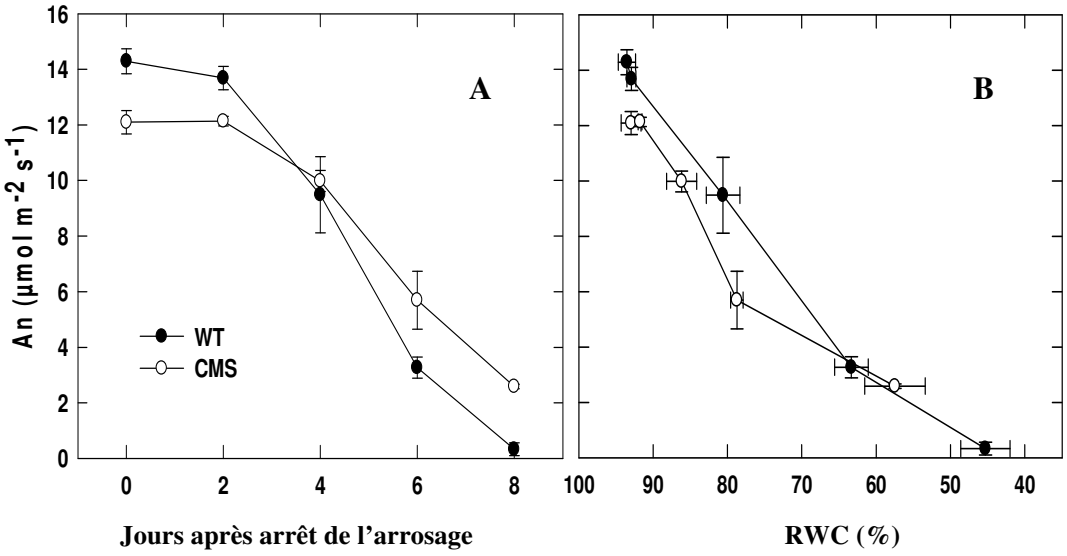


Figure 28 : Variation de la photosynthèse A_n en fonction du temps de déshydratation (**A**) et en fonction de RWC (**B**). Les mesures de A_n sont réalisées sous une lumière de 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1} et une température de 25°C. Les concentrations de CO_2 et de l'oxygène sont respectivement 380 ppm et 21%O_2. Chaque point est la moyenne ± SE de 4 répétitions indépendantes. Où non apparentes, les barres d'erreur sont cachées par le symbole.

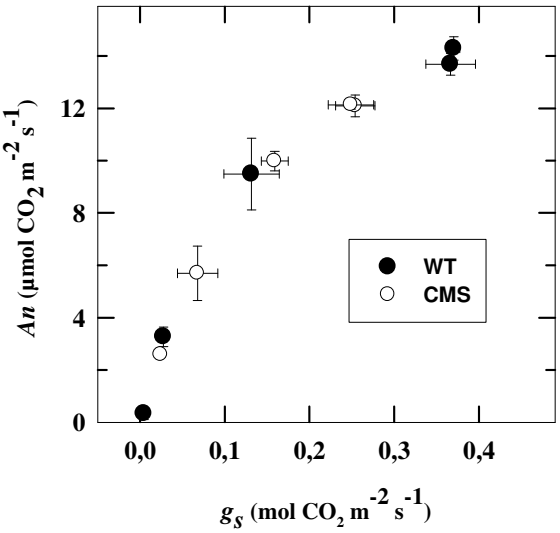
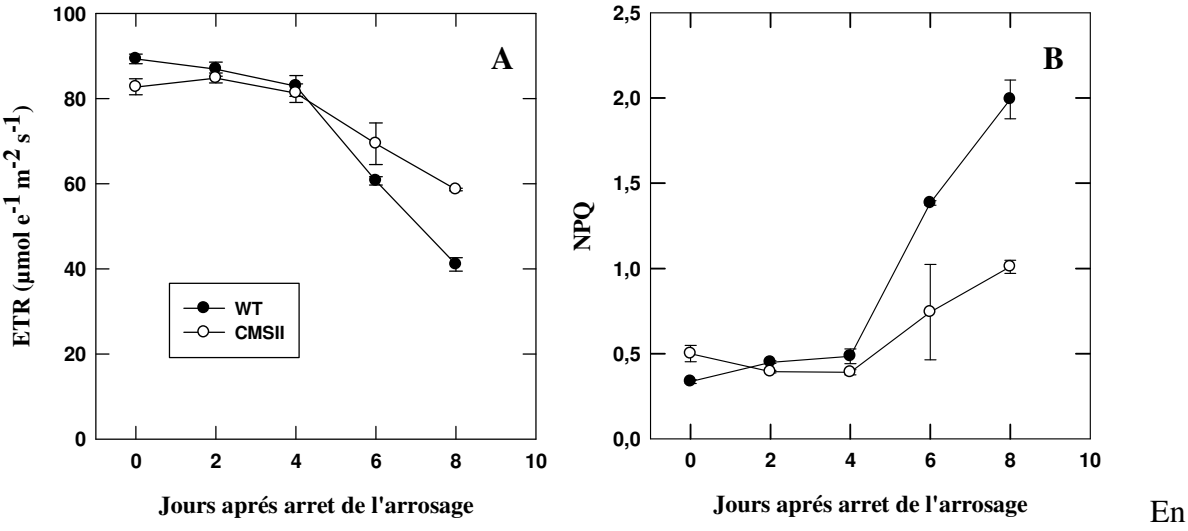


Figure 29: La relation entre A_n et g_s durant la déshydratation. A_n et g_s sont mesurés sous les conditions de croissance : 380 ppm de CO_2, 21%O_2 et une température de 25°C.

II.5. Variation de flux d'électrons au cours de la déshydratation

Nous avons étudié si la diminution d'A_n chez les deux génotypes durant la déshydratation est associée à un changement des réactions primaires de la photosynthèse.

Si on compare la variation de flux d'électrons linéaire (ETR) (***figure 30A***) à celle de A_n (***figure 28A***) au cours de la déshydratation on remarque que : (i) ETR n'est pas diminué après 4 jours de déshydratation chez WT et CMS alors que A_n est déjà affecté (ii) au 8ème jour ETR est réduit seulement de 30% et 50% chez CMS et WT alors que A_n est inhibé à 80% chez le CMS et à 96% chez le WT. La diminution de l'ETR est accompagnée d'une augmentation de quenching non photochimique (NPQ, ***figure 30b***) qui est plus importante chez le WT à partir de 6 jours de l'arrêt d'arrosage. Le rapport Fv/Fm, indicateur de la photoinhibtion, n'étant pas diminué chez les deux génotypes même au 8ème jour d'arrêt de l'arrosage.



En

Figure 30 : (**A**) Flux linéaire d'électrons (ETR) et (**B**) de quenching non photochimique (NPQ) en fonction du temps de déshydratation. Les conditions de mesures sont : 380 ppm de CO_2, 21% O_2, 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1}, 25°C et un VPD autour de 1. Chaque point correspond à la moyenne ± SE de 4 répétitions. Où non apparentes, les barres d'erreur sont cachées par le symbole.

En assumant que la photorespiration et l'assimilation de CO_2 sont les deux seules réactions en compétition pour les électrons de la chaîne chloroplastique ($Jt = Jc + Jo$), on peut estimer le flux d'électrons dirigé soit vers les réactions de carboxylation (*Jc*) soit vers les réactions d'oxygénation (*Jo*) de la Rubisco. *Jc*, diminue après 4 jours de déshydratation tandis que *Jo* augmente légèrement (***figure 31***). À la fin de la déshydratation *Jo* est plus élevé chez les plantes CMS en comparaison de WT.

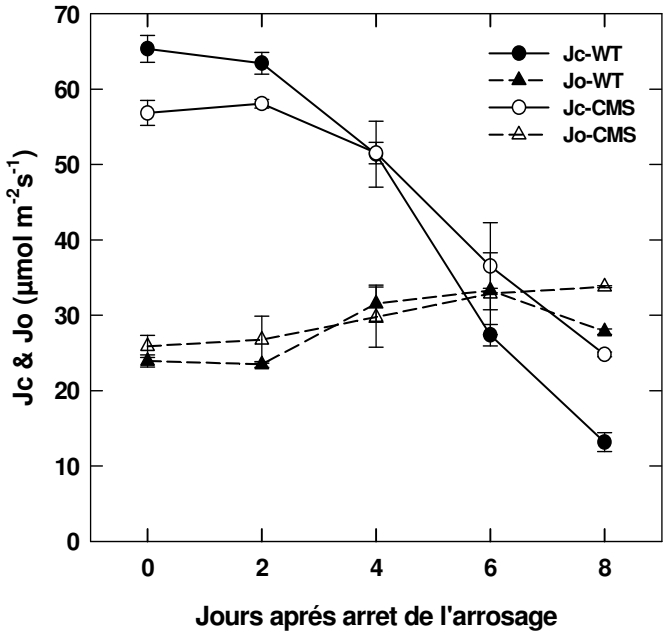


Figure 31: Variation de flux d'électrons dirigé vers la carboxylation de la Rubisco (*Jc*) et de flux d'électrons dirigé vers l'oxygénation de la Rubisco (*Jo*) au cours de la déshydratation. Les conditions de mesures sont : 380 ppm de CO_2, 21% O_2, 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1}, 25°C et un VPD autour de 1. Chaque point correspond à la moyenne ± SE de 4 répétitions. $J_c = 1/3 \left(J_t + 8(An+Rd)\right)$ et $J_o = 2/3 \left(J_t - 4\ (An+Rd)\right)$

II.6. Disponibilité du CO_2 au niveau de chloroplaste sous stress hydrique

La valeur de J_c/J_o peut être utilisée comme une estimation relative de la concentration en CO_2 dans les chloroplastes (C_c) (Cornic et Massacci, 1996) car sa mesure, uniquement basée sur les mesures d'assimilation carbonée et de fluorescence chlorophyllienne, est indépendante de la conductance interne. Pour voir si la diminution de la photosynthèse au cours de la déshydratation est due principalement à la diminution de la disponibilité en CO_2 dans les chloroplastes, la relation d'A_n en fonction de J_c/J_o est comparée chez les deux génotypes au cours de la déshydratation sous une concentration de CO_2 ambiante (C_a) constante, et chez des plantes bien hydratées en variant le C_a.

Comme le montre ***la figure 32***, la relation d'A_n et J_c/J_o est identique chez WT et CMS au cours de la déshydratation et elle est similaire à celle obtenu sur des plantes bien hydratées lorsqu'A_n est mesurée à différente C_a. Cette observation montre que la diminution de l'assimilation au cours de la déshydratation est due principalement à la limitation de la

concentration en CO_2 au niveau des chloroplastes. Ceci est en accord avec la ***figure 29*** qui montre que la diminution de la photosynthèse est corrélée à la fermeture des stomates

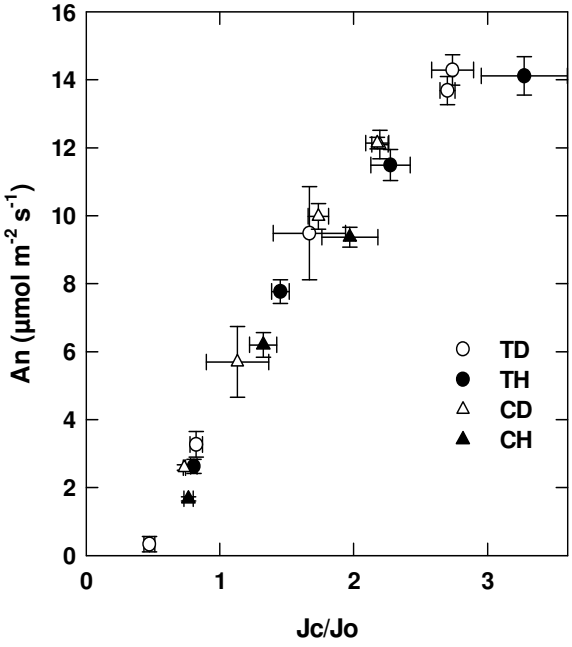


Figure 32 : Relation entre A_n et *Jc/Jo*. *Jc*: flux d'électrons dirigés vers la carboxylation et *Jo*: flux d'électrons vers l'oxygénation. Le rapport *Jc/Jo* est proportionnel à la concentration de CO_2 dans le chloroplaste C_c. Les mesures sont réalisées sous une lumière de 350 µmol m^{-2} s^{-1} sur des plantes bien hydratées (TH : WT et CH : CMS) à différentes C_a ou sur des plantes au cours de la déshydratation (TD : WT et CD : CMS) à Ca constant.

II.7. La respiration au cours de la déshydratation

Au cours de la déshydratation, la respiration à l'obscurité (Rn) diminue chez les deux génotypes pour atteindre une valeur autour de -1 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} à la fin de la déshydratation (***figure 33***). Rn diminue chez les deux génotypes avec la diminution de RWC (médaillon) et elle est plus élevée chez les CMS jusqu'à un RWC de 70% ensuite elle est similaire entre les deux génotypes. Il a été montré que la réduction de la respiration au cours de la sécheresse est principalement attribué à la réduction de la voie COX, tandis que la voie AOX reste inchangé chez les deux génotypes Galle *et al.,* 2010).

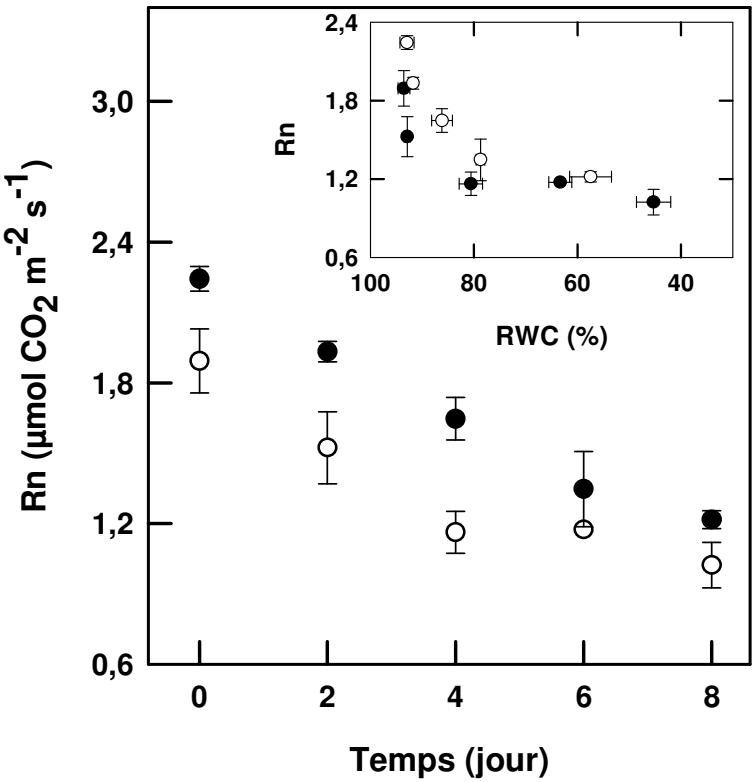


Figure 33 : Variation de la respiration à l'obscurité au cours de la déshydratation. Les conditions de mesures sont les suivant : 380 ppm $C0_2$, 21% O_2, 25°C et VPDL=1. Les mesures sont précédées d'une longue période d'obscurité. Le médaillon montre Rd en fonction du RWC. Chaque point correspond à la moyenne ± SE de 4 répétitions

II.8. Vulnérabilité de la feuille à la cavitation

Grâce à la large contribution de la feuille à la conductance hydraulique totale de la plante, la vulnérabilité de la feuille à la cavitation peut révéler la façon dont les plantes réagissent à un stress hydrique. Les courbes de vulnérabilité sont construites par déshydratation à la paillasse (Sperry *et al.*, 1988) sur des feuilles détachées en suivant K_{fol} en fonction de la diminution du potentiel hydrique foliaire (Ψ_{fol}). On trouve deux réponses caractéristiques de K_{fol} à la diminution de Ψ_{fol} (***figure 34***). Les plantes CMS maintiennent leur K_{fol} maximal tant que Ψ_{fol} est supérieur à -1,5 MPa, bien qu'une diminution de K_{fol} en résulte lorsque les feuilles sont déshydratées au-dessous de ce point. Par contre, chez les WT, toute diminution de Ψ_{fol} entraîne une perte de K_{fol}. Donc chez le CMS, il existe une zone de diminution de Ψ_{fol} pendant laquelle K_{fol} ne varie pas. Selon ces courbes de vulnérabilité, le potentiel de cavitation (Ψcav : le potentiel hydrique à laquelle K_{fol} diminue) des feuilles de WT a été moins négatif que celui des feuilles de CMS.

Pour comparer les comportements hydraulique et stomatique, on a utilisé les valeurs de g_s mesurés sur les feuilles attachées au cours des expériences de déshydratation par arrêt de l'arrosage des plantes entières. g_s a diminué très rapidement et brusquement chez les deux génotypes lorsque Ψ_{fol} a diminué, jusqu'à atteindre des valeurs presque nulles pour WT vers Ψ_{fol} = -1.7 MPa et 10 % de sa valeur initiale à ψ_{fol} = -1,5 MPa chez le CMS.

La comparaison de la réponse de g_s à la diminution du Ψ_{fol} à celle de K_{fol} montre que chez les plantes CMS, le déclenchement de la diminution de K_{fol} (flèche rouge) coïncide avec la fermeture presque complète des stomates (flèche bleue). Par contre chez les WT, cette diminution commence avant la fermeture totale des stomates.

Chez les plantes WT, le Ψ_{fol} à laquelle K_{fol} diminue correspond bien au Ψ_{fol} à la perte de turgescence (Ψ_{TLP} : ligne verticale en pointillé). Chez les CMS, K_{fol} est maintenu à sa valeur maximale au Ψ_{TLP}.

La ***figure 34*** montre que chez les CMS les stomates sont complètement fermés (la transpiration est réduite à des valeurs cuticulaires) avant que des niveaux appréciables d'embolie été atteints dans le xylème. Ceci montre que, l'étendue de l'embolie semble plus limitée chez les CMS que chez les WT. Une forte demande évaporative chez les feuilles des WT augmente les risques de cavitation.

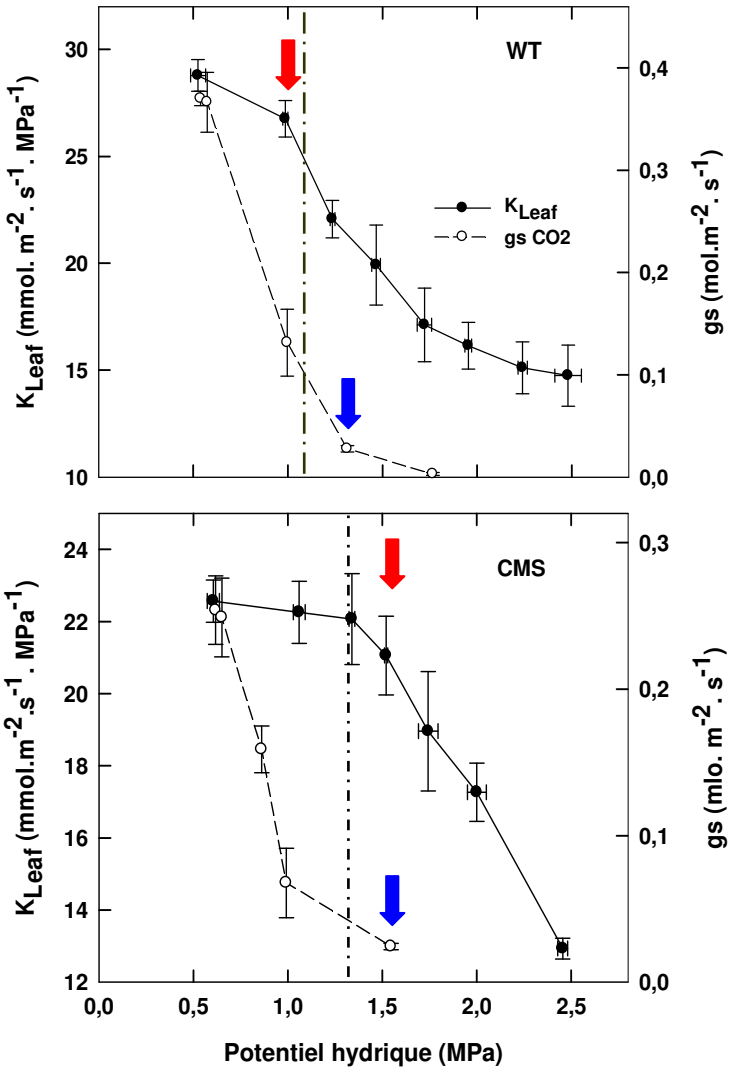


Figure 34 : Courbes de vulnérabilité des tissus conducteurs foliaires chez les plantes WT et CMS (traits continus) construites par déshydratation des feuilles à la paillasse. Cette méthode nécessite des échantillons différents pour chaque observation. Chaque point est la moyenne ± SE de 6 à 15 mesures. Les courbes en traits interrompus correspondent à la conductance stomatique (g_s) des feuilles attachées de WT et CMS au cours de la déshydratation. Les lignes verticales en pointillé correspondent aux potentiels hydriques à la perte de turgescence (Ψ_{TLP}) déterminée à partir des analyses des courbes PV.

III. Limitations physiologiques et métaboliques de la photosynthèse chez les plantes WT et CMS de *Nicotian sylvestris* maintenues à un RWC de 80%

III.1. Contexte

Dans le chapitre précédent nous avons montré que les CMS résistent mieux à l'arrêt de l'arrosage parce que leur conductance stomatique, plus faible que celle des WT lorsqu'elles sont bien hydratées, freine la transpiration lors de l'application de la contrainte. Nous avons voulu connaître les capacités d'acclimatations de ces deux génotypes maintenus en alimentations hydriques limitantes permettant l'établissement d'un RWC de 80%. La période d'acclimatation est de 6 à 10 jours. Le CMS et le WT maintenues à un RWC de 80% sont respectivement désignés ci-dessous par CMS80 et WT80. CMS et WT désigne leur contrepartie maintenue en condition hydrique non limitante.

III.2. Photosynthèse en conditions ambiantes de CO2 et d'oxygène

Le CMS et le WT (plantes bien hydratées) présentent les différences habituelles déjà décrites précédemment avec g_s et A_n les plus élevés chez les WT (***tableau IV***). Le maintien des plantes à un RWC de 80% induit une réduction d'A_n qui est de 48,6% chez les WT et de 21,6% chez les CMS. L'assimilation nette de CO_2 est donc plus élevée chez les CMS80 que chez les WT80. La conductance stomatique est cependant similaire chez les deux génotypes lorsqu'ils sont maintenus à un RWC de 80%. Par conséquent, la différence d'assimilation entre les plantes maintenues à un RWC de 80% ne dépend pas d'une différence de g_s mais d'autres facteurs doivent être impliqués. Les contenus en chlorophylle totale et en caroténoïdes (***Tableau IV***) ne sont pas modifiés durant l'acclimation.

Tableau IV : l'assimilation nette de carbone (A_n), la conductance stomatique (g_s) et le contenu en pigments mesurés chez les plantes hydratées et les plantes maintenues à un RWC de 80%. Les mesures des échanges gazeux sont réalisées sous les conditions suivantes : 380ppm de CO_2, 21% O_2 et une température de 25°C. Les valeurs marquées par des lettres (a, b, c et d) différentes sont significativement différentes ($p< 0,05$).

	WT	WT80%	CMS	CMS80%
g_s (mol m^{-2} s^{-1})	0,32±0,052 [a]	0,104±0,01 [b]	0,21±0,028 [c]	0,11±0,01 [b]
A_n (µmol m^{-2} s^{-1})	13,65±0,39 [a]	7,018±0,18 [b]	11,16±0,67 [c]	8,75±0,4 [d]
Chl a+b (g m^{-2})	0,34±0,029	0,39±0,042	0,37±0,01	0,36±0,019
Chl a/b	3,6±0,047	3,35±0,025	3,86±0,11	3,55±0,08
Car (mg m^{-2})	45,7±0,89	53,26±0,14	48,83±1,95	50,27±2,85

III.3. les limitations de la photosynthèse chez les deux génotypes en conditions hydriques limitantes

III.3.1. Réponse de l'assimilation nette de CO_2 par une feuille au CO_2

Les courbes *An/Ci* établies dans l'oxygène sont représentées dans les ***figures 35 A et B*** avant et après acclimatation à un RWC de 80%. Le point de compensation pour le CO_2 (Γ) est très voisin pour les deux génotypes bien hydratés. Il est augmenté chez WT80, tandis que celui de CMS80 reste identique à celui du CMS bien arrosé (***tableau V***).

La pente à l'origine de la relation A_n/C_i est proportionnelle à la quantité de Rubisco active (Long et Bernacchi, 2003); elle est appelée efficacité de carboxylation (*EC*). *EC* est similaire chez WT et CMS. Le déficit hydrique ne la modifie pas chez le CMS80 tandis qu'elle entraine son inhibition chez WT80. Ceci suggère une diminution de quantité de Rubisco active chez les plantes WT80 (***tableau V***).

La vitesse maximale de la photosynthèse (V_{cmax}) est estimée en utilisant une relation de type michaélienne (modèle de Farquhar) lorsque le CO_2 est limitant. Elle est comparable chez WT et CMS, (25,57 ± 1.47 et 26,26 ± 0,37 µmol m^{-2} s^{-1} respectivement chez WT et CMS). Ces valeurs sont conformes à l'activité maximale de la Rubisco mesurée par Priault (2006) sur les CMS et WT cultivées en conditions similaires. La V_{cmax} du CMS80 (=24,25 ± 1,07 µmol m^{-2} s^{-1}) est très voisine de celle du CMS alors que sa valeur n'est que de 18,84 ± 1,76 µmol m^{-2} s^{-1} chez WT80 montrant que le maintien des plantes aux conditions hydriques limitantes a produit une inhibition de V_{cmax} de 30% environ.

Tableau V : Estimation du point de compensation (**Γ**) et de l'efficacité de carboxylation (EC) à partir des courbes A/Ci. Chaque point correspond à la moyenne de 4 répétitions indépendantes. Les valeurs marquées par des lettres (a, b et c) différentes sont significativement différentes ($p< 0,05$).

	WT	WT80	CMS	CMS80
Γ (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1})	56,16±1,60 **a**	74±1,68 **b**	62±1,15 **c**	67±1,52 **bc**
EC (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1})	0,06±0,02 **a**	0,04±0,01 **b**	0,051±0,02 **c**	0,051±0,05 **c**

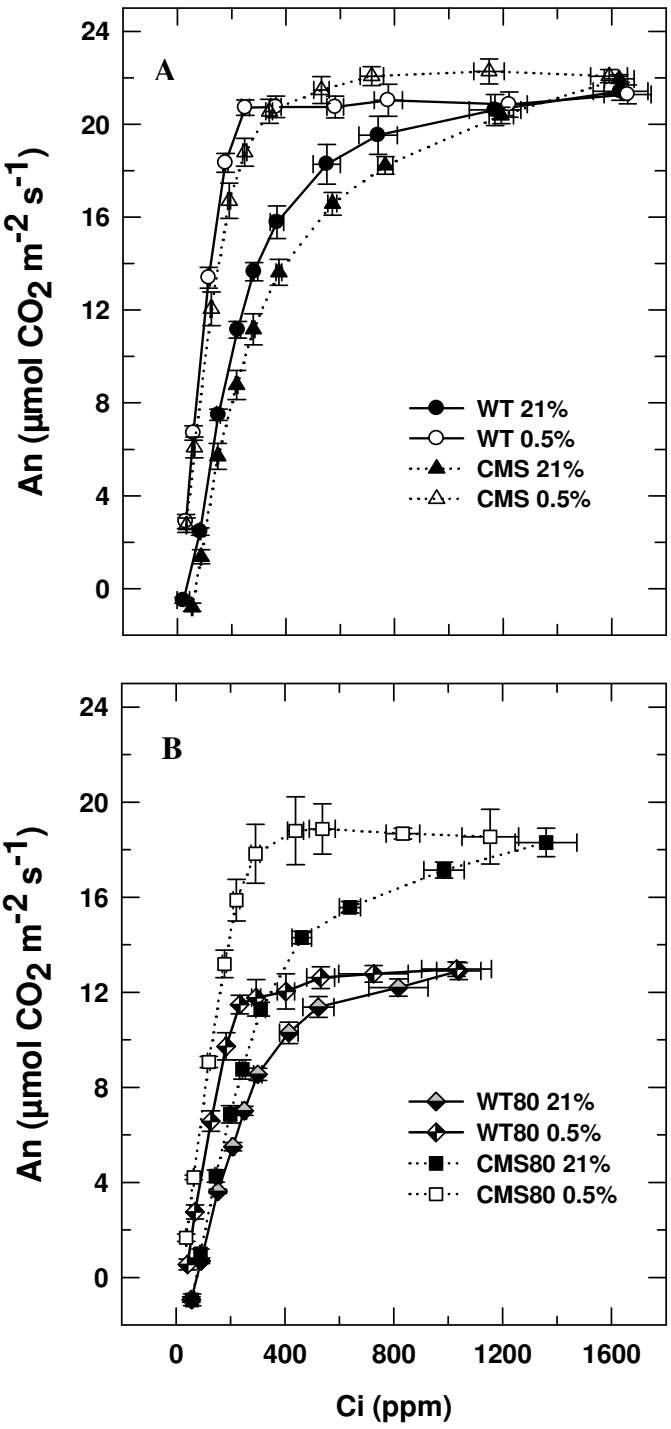


Figure 35 : Courbes de réponse de l'assimilation nette de CO_2 (A_n) de WT et CMS cultivés en condition bien hydratée (**A**) et en condition limitant en eau (80% RWC) (**B**). L'ensemble de ces courbes est réalisé à 25 °C sous 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1} et 21% O_2 (traits continus). Les mesures faites dans un air contenant 0,5% d'O_2 sont aussi représentées (traits pointillés). Les erreurs standards des moyennes, calculées à partir d'au moins trois répétitions indépendantes, sont présentées sur les graphiques et masquées dans certains cas par les symboles.

Aux forts C_i (ou la réponse d'A_n à C_i atteint un plateau), la photosynthèse est limitée par la vitesse renouvellement de RuBP (Long et Bernacchi, 2003). Le renouvellement de RuBP dépend de l'activité de cycle de Calvin. Ce cycle est à son tour dépendant de la vitesse à laquelle l'ATP et le NADPH sont produits par les réactions primaires. Dans cette région on remarque qu'A_n est plus faible chez WT80 que chez CMS 80.

Pris globalement les résultats ci-dessus suggèrent que la baisse de l'assimilation nette de CO_2 des WT80 implique des modifications du métabolisme photosynthétique, avec une baisse de la capacité photosynthétique, indiquée par la baisse de V_{cmax} et de l'efficacité de la carboxylation et par l'augmentation du point de compensation pour le CO_2.

Cependant, compte tenu de l'inhibition de la photorespiration en absence d'oxygène, les mesures faites dans une atmosphère contenant 0,5% d'O_2 montre que le plateau de saturation d'A_n est atteint pour des C_i de 500 à 600 ppm.

III.3.2. Variations et régulation du flux d'électrons photosynthétiques (ETR)

Le transport d'électrons dans les thylacoïdes des feuilles (ETR) maintenues dans l'air est estimé comme indiqué dans la section « matériel et méthode » à partir de la mesure de ΦPSII. La relation entre Φ_{PSII} et Φ_{CO2} établie dans une atmosphère contenant 0,5% de O_2 est d'abord nécessaire (Cornic et Briantais, 1991). Cette relation est bien la même chez les deux génotypes avant et après l'acclimation à un RWC de 80% (***figure 36***). Cela montre que l'on peut utiliser les mesures de ΦPSII pour comparer les flux d'électrons dans les différents cas étudiés. Cela montre aussi que le fonctionnement et la régulation du fonctionnement du PSII ne sont pas changés qualitativement par la sécheresse.

La variation d'ETR (***figure 37***) en fonction de C_i chez les WT, les CMS et les CMS80 est similaire avec des valeurs très voisines pour toutes les conditions. Les valeurs d'ETR chez WT80 sont par contre plus faibles à tous les C_i que celles de CMS80. La forme de la variation en fonction de C_i reste cependant la même dans les deux cas avec un « plateau » atteint lorsque C_i = 450 ppm environ.

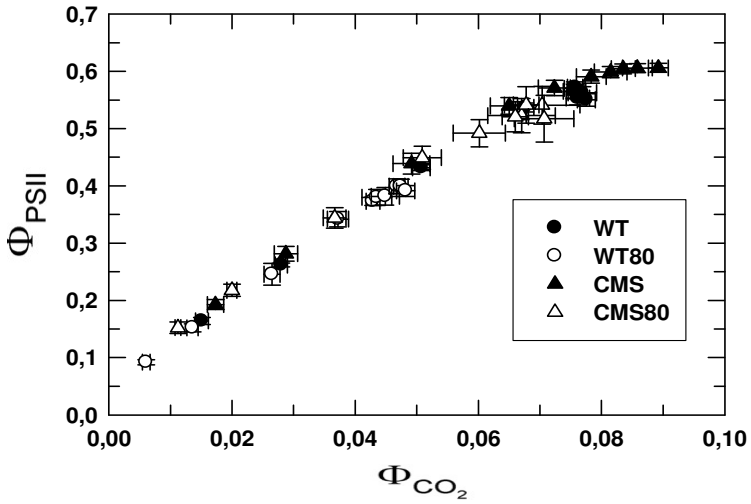


Figure 36: Relation entre rendement quantique de l'assimilation de CO_2 (Φ_{CO2}) et le rendement quantique du photosystème II (Φ_{PSII}) obtenues à partir des courbes A_n/C_i réalisées 0,5% O_2. Les erreurs standards des moyennes, calculées à partir d'au moins trois répétitions indépendantes, sont présentées sur les graphiques et masquées dans certains cas par les symboles.

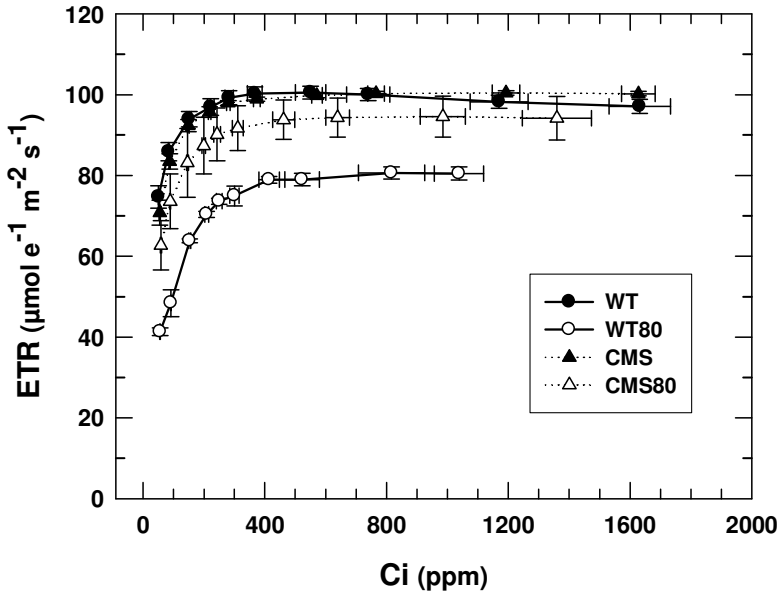


Figure 37: Courbes de réponse de transport électronique linéaire total de la chaîne photosynthétique (ETR) au CO_2 intercellulaire. Les mesures sont réalisées à 25°C sous 350 PAR µmol m^{-2} s^{-1} et 21% O_2. Les erreurs standards des moyennes, calculées à partir d'au moins trois répétitions indépendantes, sont présentées sur les graphiques et masquées dans certains cas par les symboles.

ETR est proportionnel à Φ_{PSII} à partir duquel il est calculé. La relation : Φ_{PSII} = qP x Fv'/Fm'. Dans laquelle qP est le quenching photochimique, mesure relative de la concentration des centres PSII ouverts et Fv'/Fm' le rendement quantique des centres PSII ouverts, offre un moyen pour aborder ce qui limite ETR dans nos conditions de mesure.

.

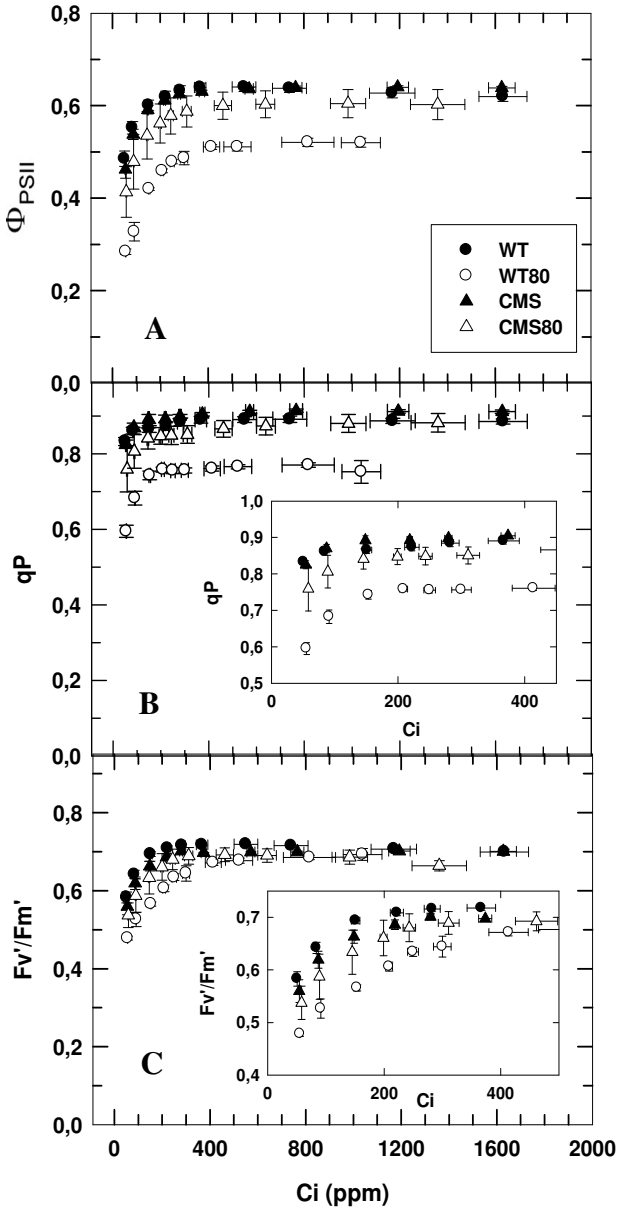


Figure 38 : Courbes de réponse du rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) (**A**), du quenching photochimique (qP) (**B**) et du rendement quantique des centres PSII ouverts (Fv'/Fm') (**C**) au CO_2 intercellulaire. Les mesures sont réalisées sous les mêmes conditions indiquées dans la ***figure 37***. Les médaillons montrent les variations de qP et F'v/F'm pour les faibles C_i.

Le quenching photochimique (***figure 38B***) atteint ses valeurs les plus faibles chez les WT80. Ses valeurs chez les CMS, CMS80 et WT sont par contre très voisines à tous les C_i. Les valeurs de Fv'/Fm' (***figure 38C***) sont les mêmes dans tous les cas pour des C_i supérieures à 400 ppm. Il atteint les plus faibles valeurs chez WT80 lorsque la C_i est inférieur à 400 ppm. Les variations de Φ_{PSII} sont aussi indiquées sur la ***figure 38A***. Elles sont montrées pour mémoire ; elles sont évidemment identiques à celle d'ETR

On conclut donc que les faibles valeurs d'ETR chez WT80 sont le résultat d'un faible qP, témoignant d'une réduction plus élevée du Q_A, accepteur primaire des électrons produits par le PSII. Cette réduction élevée de Q_A est elle-même le résultat d'un manque d'accepteurs en aval, conforme à la baisse de l'estimation de V_{cmax} mentionné plus haut.
Pour des C_i inférieures à 400 ppm la diminution du rendement quantique des centres ouverts (Fv'/Fm') intervient aussi de façon substantielle dans la baisse d'ETR chez les WT80. La baisse du rendement quantique des centres ouverts du PSII est liée à une augmentation de la dissipation thermique de l'énergie absorbée par ces derniers. Cette régulation est comprise comme un mécanisme de régulation protégeant les centres réactionnels contre la lumière « excédentaire » (en excédant de celle nécessaire aux réductions photosynthétiques).

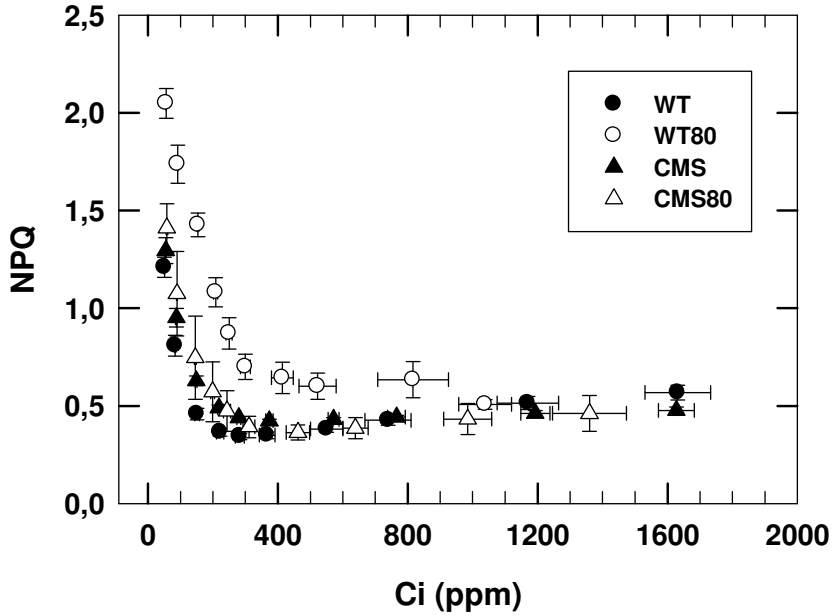


Figure 39 : Courbes de réponse de quenching non photochimique (NPQ) au CO2 intercellulaire. Les mesures sont réalisées sous les mêmes conditions indiquées dans la ***figure 37***.

Ce mécanisme de protection est souvent étudié en mesurant le quenching non-photochimique, NPQ, représenté dans la ***figure 39***. NPQ est souvent pris comme une mesure relative de l'acidification du lumen, acidification responsable de la mise en route de la dissipation thermique (Muller *et al.,* 2001)

Clairement NPQ chez WT80 est le plus grand, montrant probablement que les protons dans le lumen sont moins utilisés que chez WT, CMS et CMS80.

III.3.3. Estimation des vitesses d'oxygénation (J_o) et de carboxylation (J_c)

Les vitesses d'oxygénation et de carboxylation sont estimées en utilisant le modèle de Valentini *et al.* (1995). Elles sont illustrées dans la ***figure 40***. J_c suit les variations d'A_n. Les différences entre WT, CMS, WT80 et CMS80 étant très semblables à celles décrites pour A_n. J_o diminue avec l'augmentation du C_i. On note que J_o est très voisin pour toutes les C_i chez WT, CMS et CMS80. J_o est le plus faible chez les WT80 aux faibles Ci (***figure 40C***), mais le plus élevée aux forts Ci (***figure 40D***).

Ce calcul présenté dans ***la figure 40*** nous permet de montrer que J_o (et probablement la photorespiration) est presque identique dans les conditions de croissance chez les plantes hydratées (flèches en trait plein) et maintenues en conditions hydriques limitantes (flèches en tiretés) bien que J_o soit toujours légèrement supérieur chez les plantes maintenues à un RWC de 80% (WT80 et CMS80). Par contre J_o est plus élevé chez CMS et CMS80 que chez WT et WT80 (Voir ***tableau VI***).

.

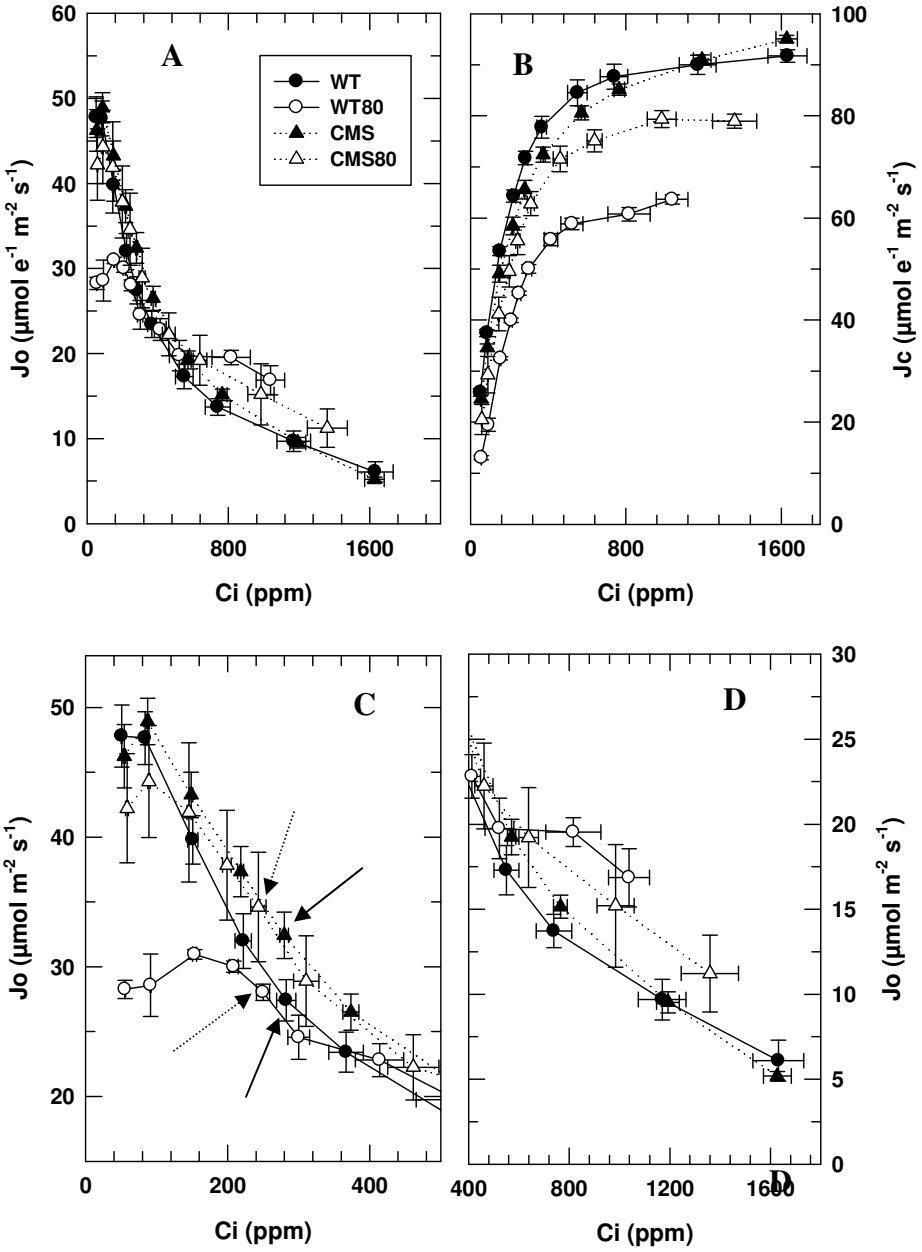


Figure 40 : Flux d'électrons vers l'oxygénation (J_o) (**A**) et vers la carboxylation (J_c) (**B**) en fonctions de la concentration intercellulaire de $C0_2$. **C** et **D** représentent respectivement les variations de J_o aux faibles et aux forts C_i. Flèche en trait plein : J_o dans les conditions de croissance chez les plantes bien hydratées ; flèche en tiretés : J_o dans les conditions de croissance chez les plantes maintenues à un RWC de 80%.

Tableau VI **:**Estimation de flux d'électrons (µmol m^{-2} s^{-1}) vers l'oxygénation en conditions ambiantes de CO_2 (C_a=380 ppm) et d'oxygène (21% O_2) chez les plantes bien hydratées (WT et CMS) et les plantes acclimatées (WT80 et CMS80).

WT	WT80	CMS	CMS80
27.4±1.7	28.1±0.6	32.4±1.8	34.6±0.6

III.3.4. La diffusion du CO_2

L'inhibition plus forte de la photosynthèse chez WT80 en comparaison avec CMS80 pourrait être due à une limitation plus élevée de la diffusion de CO_2 jusqu'aux sites actifs de Rubisco. La disponibilité du CO_2 dans le chloroplaste est contrôlée par la valeur de la conductance stomatique (g_s) et celle de la conductance du mésophylle (g_m).

Comme déjà vu plus haut, l'application de la contrainte hydrique diminue la conductance stomatique à un niveau similaire chez les deux génotypes. La limitation stomatique calculée selon Farquhar et Sharkey (1982) est identique pour les plantes WT et CMS cultivées dans les mêmes conditions (***Tableau VII***).

L'utilisation des données des échanges gazeux et de fluorescences chlorophylliennes, comme indiqué dans la section « matériels et méthodes », a permis de déterminer la conductance interne (g_m). Les résultats sont présentés dans le ***tableau VII***. g_m est plus élevée chez les plantes WT comparativement aux plantes CMS lorsqu'ils sont bien hydratés. Ceci est en accord avec les résultats de Priault *et al*. (2006 b) qui ont monté, en déterminant la conductance interne par l'utilisation des isotopes stables du carbone, que la conductance interne est deux fois plus faible chez les plantes CMS que chez les plantes WT lorsqu'elles sont cultivées sous une lumière de 350 PAR µmol $m^{-2}s^{-1}$. Chez les plantes maintenues à un RWC 80%, la conductance interne diminue chez les WT80 par rapport aux plantes WT bien hydratées par contre elle ne change pas chez les CMS.

Ces résultats suggèrent que les faibles niveaux d'assimilation de CO_2 observés chez les WT80 en comparaison avec ceux de CMS80, sont au moins partiellement dus à des limitations d'origine mésophyllienne, de l'entrée de CO_2 dans les chloroplastes. Ces limitations s'additionnent aux limitations d'origine stomatique.

Tableau VII **:** Estimation de la limitation stomatique (L_s), la conductance de mésophylle (g_m) estimée à partir des données des échanges gazeux et de fluorescences chlorophyllienne mesurés en conditions ambiante de CO_2 et d'oxygène et la fraction molaire de CO_2 dans les chloroplastes (C_c). La température de la feuille est de 25°C et la lumière incidente est de 350 PAR µmol.m^{-2} s^{-1}. Chaque valeur correspond à une moyenne de 4 répétitions indépendantes.

	WT	**WT80**	**CMS**	**CMS80**
$\mathbf{L_s}$ (%)	15 ± 2 [a]	28 ± 2,83 [b]	16,1 ± 2,2 [a]	26,7 ± 2,1 [b]
$\mathbf{g_m}$ (mol CO2 m^{-2} s^{-1})	0,21 ± 0,02	0,066 ± 0,004	0,10 ± 0,01	0,1 ± 0,01
$\boldsymbol{C_c}$ (ppm)	218	107	164	158

Le changement de g_m chez les WT80 peut avoir plusieurs origines : Il peut être dû à la diminution des espaces intercellulaires avec comme résultante une augmentation de la résistance à la diffusion ; il peut être aussi causé par une diminution de la quantité d'aquaporines sur le plasmalesme ou encore par une modification de l'activité des anhydrase carbonique. Les mécanismes possibles responsable de la valeur de g_m ont été revus récemment (Flexas *et al*., 2008)

On peut calculer la fraction molaire de CO_2 dans les chloroplastes (C_c) qui prévaut lorsque la plante se trouve dans un air normal (21% d'O_2 avec 380 ppm de CO_2) en considérant la relation :

$$A_n = g_m (C_i - C_c)$$

où A_n et Ci sont respectivement, l'assimilation nette de CO_2 et le Ci correspondant. Le ***Tableau VII*** montre qu'effectivement C_c est le plus faible chez WT80. Il est le plus élevé chez WT. Ce résultat indique que les résistances à la diffusion du CO_2 de l'air ambiant vers les sites de carboxylation sont les plus limitant chez WT80.

Les valeurs de C_c sont cohérentes avec celles de J_o. WT, où la valeur de C_c est supérieure à celle de CMS et CMS 80, présente une valeur de J_o dans un air normal (***figure 40***) qui est plus faible que celles dans ces deux cas.

Chez WT80, où l'on a calculé la C_c la plus faible, J_o dans un air normal reste voisin de J_o estimé chez WT dans les mêmes conditions. On est amené à faire l'hypothèse d'une inhibition de la photorespiration. Cette inhibition peut avoir plusieurs origines :

- Une concentration non saturante de RuBP dans ces contions de « faibles CO_2 ».
- Une désactivation des sites de Rubisco qui pourrait être induite par des faibles C_c (Galmés *et al.,* 2011).
- le flux de photorespiration est largement dépendant de l'activité de l'enzyme glycine décarboxylase. Cette enzyme est connectée au complexe I mitochondriale. L'activité mitochondriale diminue en conditions limitantes en eau. Ceci pourrait limiter l'évacuation de NADH générer par la décarboxylation de la glycine chez les WT80. Chez les CMS, la

décarboxylation du Gly n'est pas reliée au complexe I puisque le CMS doit utiliser une voie différente à celle de WT qui n'est pas probablement limité par la contrainte hydrique.

III.4. Contenu en métabolites

III.4 .1 Métabolites dérivés du cycle photorespiratoire

Pour valider une limitation possible de la photorespiration chez WT80 en comparaison avec CMS80 nous avons analysé certains métabolites impliqués dans la photorespiration.
Le glycolate, un métabolite d'entrée dans le cycle photorespiratoire, ne montre pas de changement suite au maintien en conditions hydriques limitantes et il est le même chez tous les plantes quel que soit leurs conditions. Ceci montre que la formation et l'utilisation de glycolate ne limite pas la photorespiration (***figure 41***).

En condition bien hydratée, le glycérate (qui après phosporylation, il intègre le cycle de Calvin) est très élevé chez le CMS par rapport au WT (***figure 41***). Ce contenu de glycérate plus élevé chez le CMS est en accord avec un flux photorespiratoire plus élevé en comparaison avec WT. On observe aussi une accumulation de glycérate par rapport au glycolate (rapport glycerate/glycolate) plus élevé chez les plantes CMS (***figure 41***). Lorsque les plantes sont cultivées à un RWC de 80%, le cycle de Calvin est limité ce qui engendre une accumulation de glycérate chez les deux génotypes. Le rapport glycérate/Glycolate augmente chez les deux génotypes mais reste toujours plus élevé chez les CMS80. La plus forte accumulation de glycérate chez CMS80 correlle avec une plus forte activité photorespiratoire par rapport au WT80 indiqué par un plus fort J_o (***figure 40***).

Dans le péroxysome, plusieurs acides aminés peuvent être impliqués dans l'amination du glyoxylate tels que Ser et Glu. Comme tous les acides aminés, le contenu en Glu (***figure 42***) est beaucoup plus élevé chez le CMS que chez le WT bien hydraté. Sous l'effet de la contrainte hydrique le contenu de cet acide aminé diminue chez le CMS80 et augmente chez le WT80 en comparaison des plantes CMS et WT bien hydradtées respectivement. Malgré la diminution du contenu du Glu chez CMS80, il reste à un niveau similaire de celui de WT80.

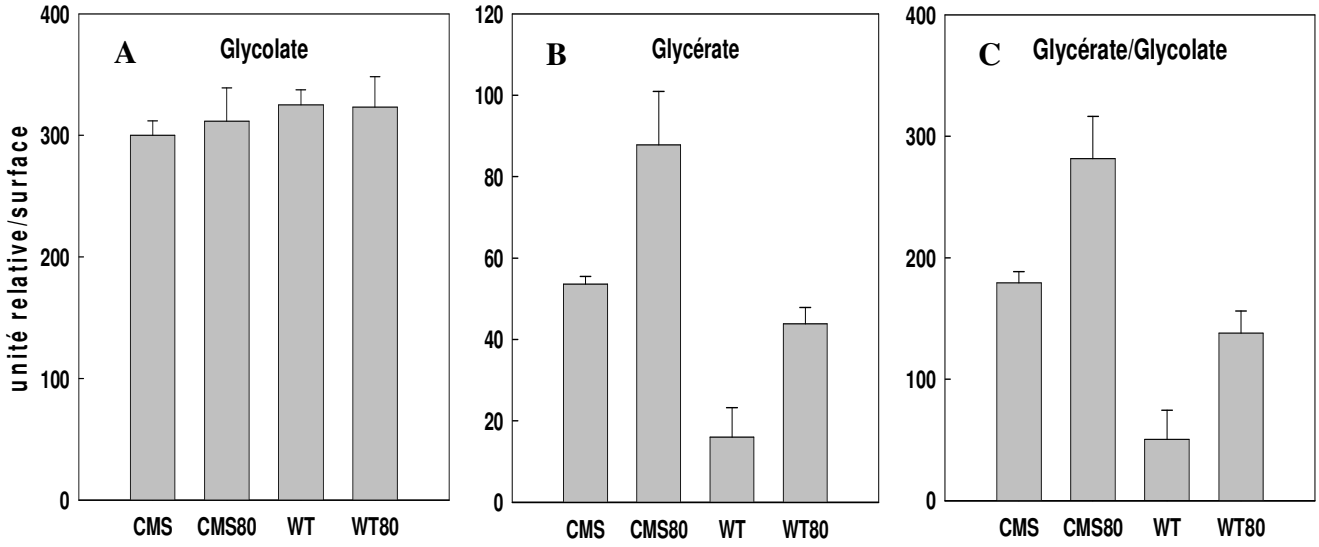


Figure 41 : Contenus en glycolate (**A**) et en glycérate (**B**) déterminés par GC-TOF-MS ainsi que le rapport glycérate/glycolate (**C**). CMS et WT correspondent aux plantes bien hydratées et CMS80 et WT 80 correspondent aux plantes maintenues pendant 6 jours à un RWC de 80%. Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 3 mesures.

D'autre part, en ce qui concerne la régénération du Glu dans le chloroplaste (cycle GS/GOGAT) on remarque que le contenu en Gln (***figure 42***) est fortement plus élevé chez les plantes CMS que chez les plantes WT lorsqu'elles sont bien hydratées mais sous l'effet de la contrainte hydrique le contenu de cet acide aminé diminue à un niveau similaire chez les deux génotypes. La réduction du rapport Gln/Glu (***figure 42***) est une indication d'un faible statut azoté des deux plantes lorsqu'elles sont maintenues à un RWC de 80%.
Il est probable que sous la contrainte hydrique le nitrate est mal absorbé par les racines ou encore mal exporté jusqu'aux feuilles (Mattsson *et al*. 1997).

La glycine et la sérine sont des métabolites intermédiaires du cycle photorespiratoire et qui dépendaient de l'activité de glycine décarboxylase (GDC), un enzyme mitochondrial. Les contenus en glycine et en sérine sont plus forts chez les CMS que chez les WT lorsqu'elles sont bien hydratées. Le rapport Ser/Gly est aussi beaucoup plus fort chez les CMS (***figure 42***). Ceci prouve que le dysfonctionnement du complexe I chez le CMS n'engendre pas un blocage au niveau de l'activité GDC.

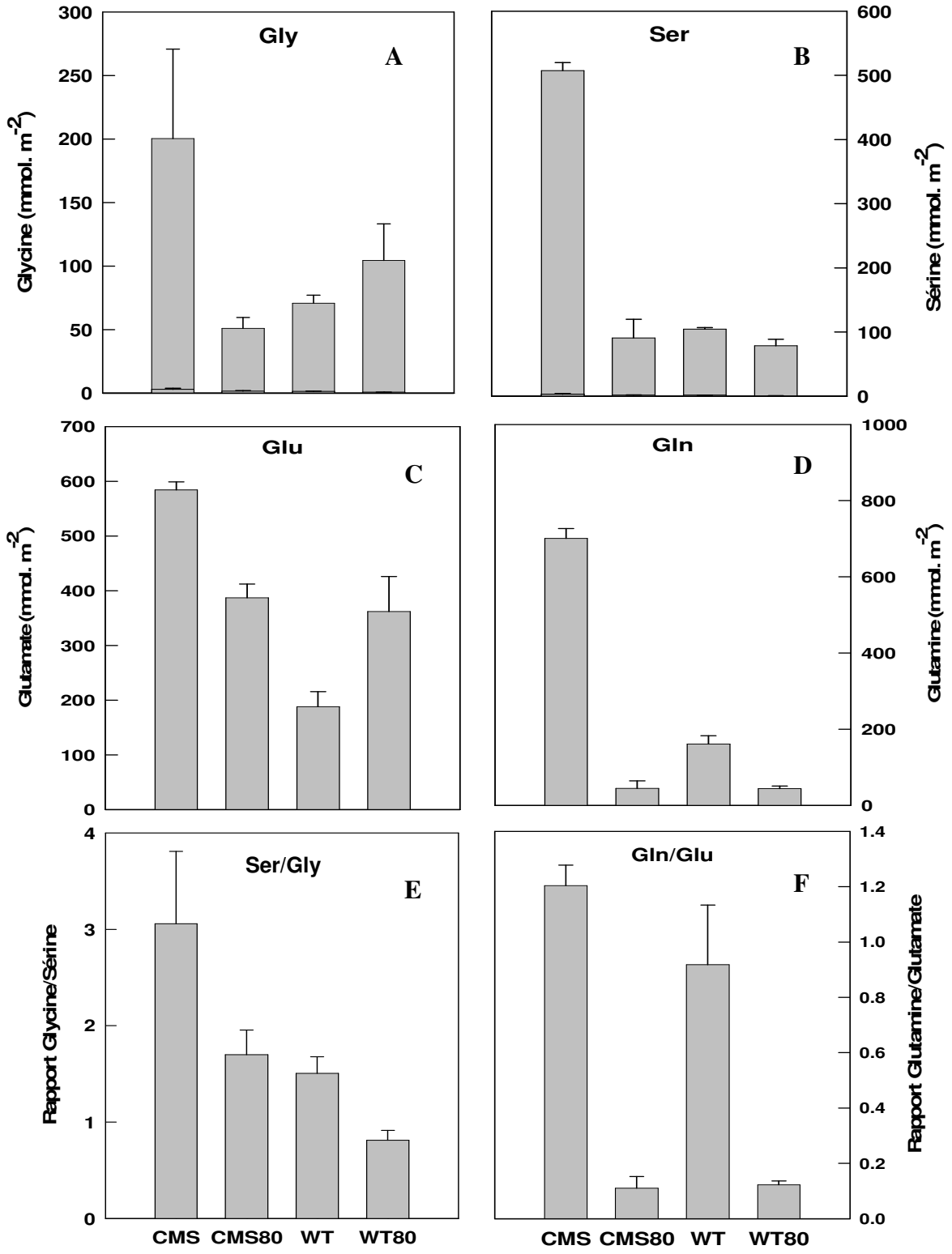


Figure 42: contenus en (**A**) glycine (Gly), (**B**) sérine (Ser), (**C**) glutamate (Glu), (**D**) glutamine (Gln) et (**E**) rapports glycine/sérine et (**F**) glutamine/glutamate chez les plantes hydratées (WT et CMS) et les plantes maintenues pendant 6 jours à un RWC de 80% (WT80 et CMS80). Le contenues de ces acides aminés sont déterminés par HPLC Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 3 mesures

Lorsque les plantes sont maintenues à un RWC 80%, le contenu en glycine, sérine ainsi que le rapport Ser/Gly diminuent chez le CMS80. Chez le WT80, le contenu en glycine augmente par contre celui de sérine diminue légèrement ce qui induit une diminution du rapport Ser/Gly en comparaison des WT bien hydratées et des CMS80 (***figure 42***). Ceci est corrélé avec une diminution de la respiration à l'obscurité chez les plantes maintenues à un RWC de 80% qui est plus accentuée chez les WT80. Cette diminution de la respiration est associée chez les deux génotypes à une diminution remarquable du contenu en citrate (***figure 43***). Globalement ces changements suggèrent que l'activité mitochondriale diminue chez les deux génotypes sous la contrainte hydrique et affecte aussi la conversion de Gly en Ser.

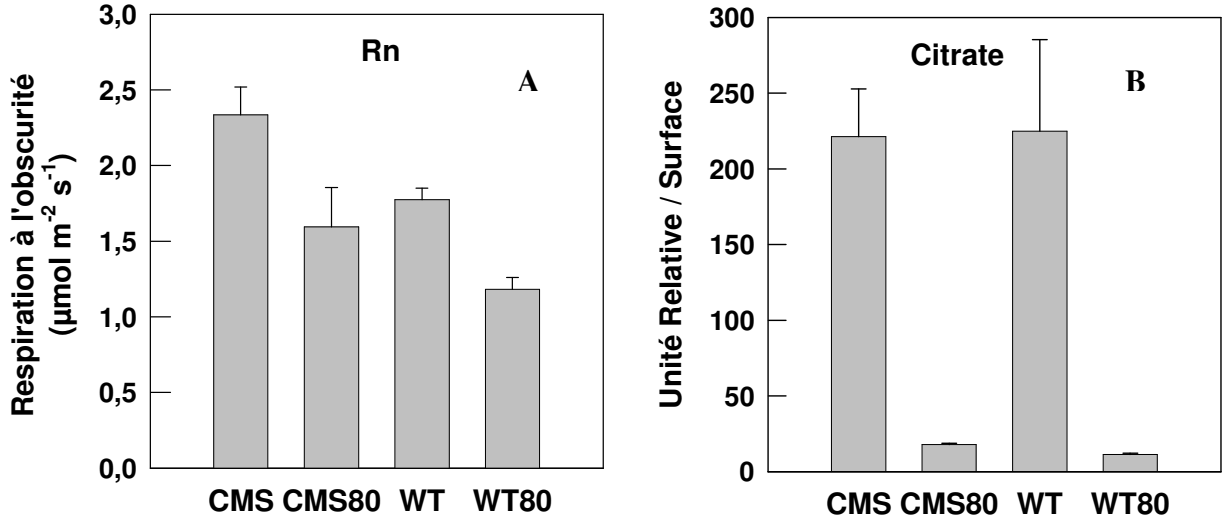


Figure 43 : La respiration mitochondriale à l'obscurité (Rn) (**A**) et le contenu en citrate (**B**) chez les plantes hydratées (WT et CMS) et les plantes maintenues pendant 6 jours à un RWC de 80% (WT80 et CMS80). Le contenues de citrate est déterminé par GC-TOF-MS. Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 3 mesures

.

Chez le CMS80, le flux d'électrons vers la photorespirtion n'a pas changé sous l'effet de la contrainte hydrique, pourtant on remarque une forte diminution du contenu du Gly et Ser. Ceci pourrait être dû à l'implication de ces deux acides aminés dans d'autres voies de biosynthèse (synthèse de protéines, synthèse de glutathion) ou une meilleure intégration dans le cycle de Calvin.

L'oxoglutarate (2-OG) (***figure 44***), le produit de la conversion de glyoxylate-glycine est identique chez toute les plantes quel que soit leurs conditions de culture. Puisque 2-OG est

impliqué dans la régénération de Glu, ceci montre que la quantité de ce métabolite ne limite pas le flux photorespiratoire chez les deux génotypes.

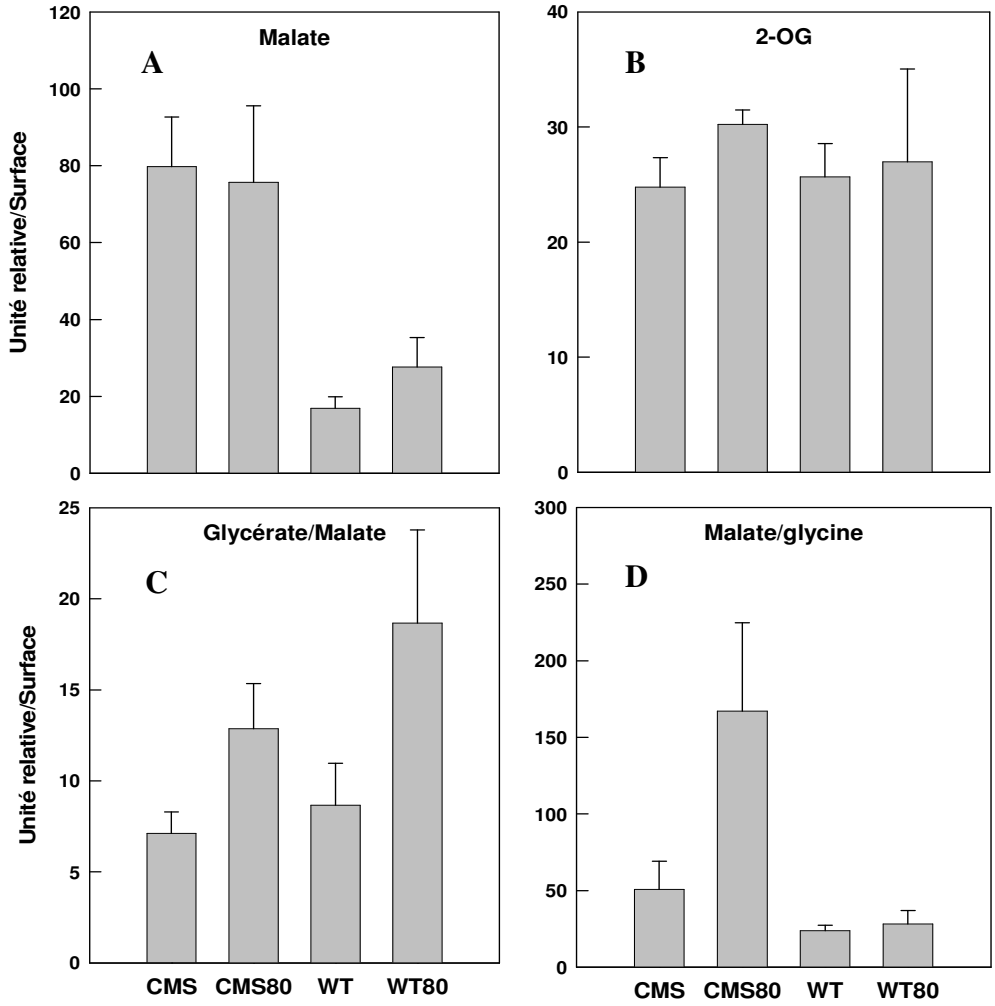


Figure 44 : Le contenu en malate (**A**) et en 2-oxoglutarate (2-OG) (**B**) déterminés par GC-TOF-MS ainsi que le rapport gycérate/malate (**C**) et le rapport malate/glycine (**D**). CMS et WT correspondent aux plantes bien hydratées et CMS80 et WT 80 correspondent aux plantes maintenues pendant 6 jours à un RWC de 80%. Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 3 mesures

Le contenu en malate (***figure 44***) montre qu'il est plus élevé chez les feuilles des plantes CMS par rapport aux feuilles des plantes WT et qu'il n'est pas affecté par le déficit hydrique chez les deux génotypes. Le malate est presque 3 fois plus élevé chez les CMS en comparaison aux WT quel que soit leur condition de culture. En plus le rapport glycérate/malate augmente chez les plantes CMS80 et WT80 par rapport aux plantes bien hydratées. Ceci montre que la disponibilité du malate ne limite pas la régénération du glycérate chez CMS80 et WT80. Chez les plantes bien hydratées, le rapport malate/glycine était légèrement supérieur chez le CMS

que chez le WT. Ce rapport augmente fortement chez CMS80 tandis qu'il ne change pas chez WT80. Si on suppose que le malate provient seulement de la conversion glycine-sérine, cette forte accumulation du malate par rapport à la glycine chez CMS80 pourrait être expliqué de deux manières : soit qu'elle résulte d'un flux photorspirartoire plus élevé chez CMS80 par rapport au CMS hydratées soit que le flux reste égal mais la sérine est impliquée dans des voies supplémentaires autre que la photorespiration.

III.4.2 Les sucres solubles sont plus accumulés chez les WT sous l'effet de la contrainte hydrique

Il est évident que l'ajustement osmotique est un paramètre qui contribue à réduire les effets de la sécheresse en maintenant la turgescence. Les sucres solubles sont considérés les principaux solutés qui influencent l'ajustement osmotique.

Le contenu en sucres solubles est comparé entre les plantes WT et CMS hydratées et maintenues à un RWC de 80% (***figure 45***). Le contenu en sucres solubles totaux est plus fort chez le WT80 que chez le CMS 80 pourtant la photosynthèse est plus faible. Ceci suggère que l'export des sucres diminue chez les WT80 et provoque l'accumulation des sucres en comparaison aux feuilles des plantes CMS80.

Lorsque les plantes sont maintenues à un RWC de 80% les niveaux de tous les sucres solubles dosés sont augmentés chez les WT80 en comparaison aux WT. Chez les CMS80, la contrainte hydrique provoque l'augmentation du contenu de la majorité des sucres solubles à l'exception de rhamnose, ribose et saccharose mais qui reste à des niveaux similaires que ceux du WT80 (***figure 46***). L'augmentation du contenu de rhamnose, ribose et saccharose constitue donc des réponses spécifiques des plantes WT à la contrainte hydrique.
Il est généralement admis que sous la contrainte hydrique, les sucres agissent comme des agents osmotiques. Ceci dit que leur accumulation sous la contrainte hydrique est généralement corrélée à un ajustement osmotique. Pour les plantes WT et CMS de *Nicotiana sylvestris* nous n'avons pas enregistré de changement significatif de potentiel osmotique (***Tableau VIII***) lorsqu'elles sont maintenues à un RWC de 80% par rapport aux plantes bien hydratées. Mais ces solutés peuvent avoir d'autres fonctions alternatives en jouant par exemple le rôle d'osmoprotectants en stabilisant les protéines et les membranes (Francisco *et al.,* 2007).

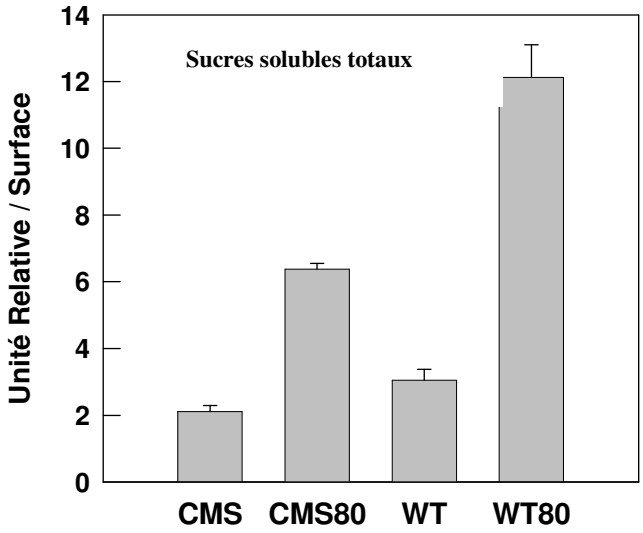


Figure 45 : Contenu en sucres solubles mesuré par GC-TOF-MS chez les plantes bien hydratées (WT et CMS) et les plantes maintenues à un RWC de 80% (CMS80 et WT80). Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 3 mesures.

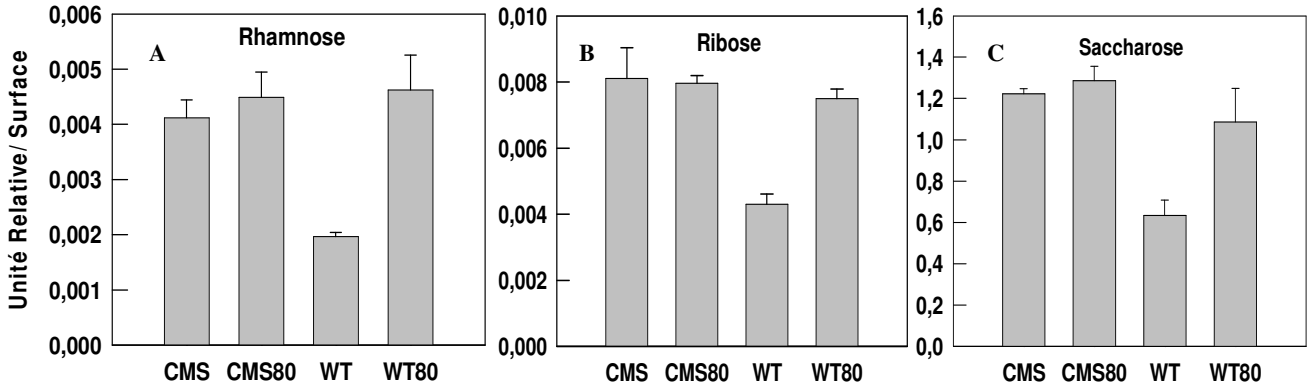


Figure 46: Contenu en rhamnose (**A**), en ribose (**B**) et en saccharose (**C**) mesuré par GC-TOF-MS chez les plantes bien hydratées (WT et CMS) et les plantes maintenues en déficit hydrique (WT80 et CMS80). Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 3 mesures.

Tableau VIII **:** potentiel osmotique à plein turgescence chez les plantes hydratées (Π_0) et chez les plantes maintenues à un RWC 80% (Π_{80})

	WT	**CMS**
$\mathbf{\Pi_0}$	-0.87 ± 0.08 [a]	-0.99 ± 0.08 [a]
$\mathbf{\Pi_{80}}$	-1.08 ± 0.08 [a]	-0.92 ± 0.04 [a]

III.4.3 Le contenu en acides aminés diminue chez les CMS80

Afin d'analyser les changements métaboliques sous l'effet du déficit hydrique, les acides aminés ont été quantifiés sous les deux régimes d'hydratations. Comme le montre ***la figure 47***, le contenu en acides aminés totaux est presque 3 fois plus élevé chez les CMS que chez les WT lorsque les plantes sont bien hydratées. Lorsque les plantes sont maintenues à un RWC de 80%, le contenu en acides aminés est la même chez CMS80 et WT80.

Les analyses individuelles des acides aminés ont montré que le glutamate et la glutamine ont été les acides aminés principaux présents dans les feuilles des deux génotypes lorsqu'ils sont bien hydratés (***tableau IX***). En plus, tous les acides aminés sont présents en concentrations plus élevées chez les plantes CMS que chez les plantes WT en conditions bien hydratées.
La diminution remarquable en contenu d'acides aminés totaux chez les plantes CMS80 est due essentiellement à la diminution du contenu d'acides aminés majeurs (Ala, Ser, Gly, Asp, Ala…).

.

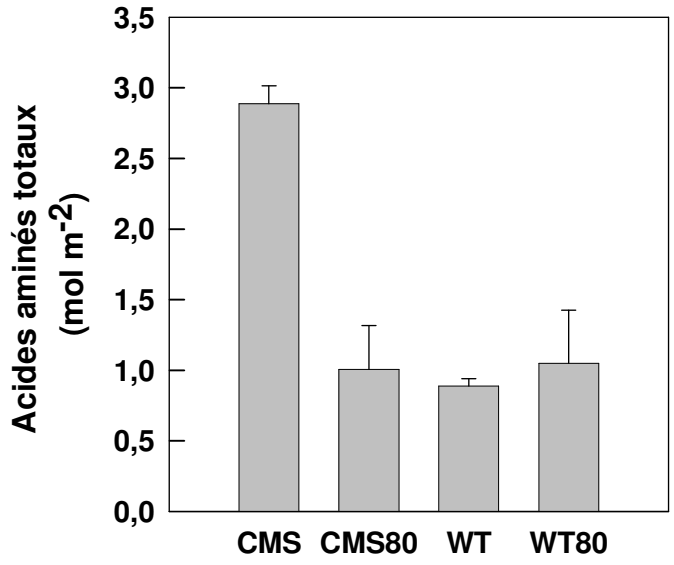


Figure 47 : contenu en acides aminés mesuré par HPLC chez les plantes bien hydratées (WT et CMS) et les plantes maintenues à un RWC de 80% (WT80 et CMS80). Les valeurs sont les moyennes +/- SE de 3 mesures

Tableau IX **:** Contenu en acides aminés chez les plantes bien hydratées (contrôle) et acclimatées à un RWC de 80% (80%) chez WT et CMSII de Nicotiana Sylvestris.

	CMS		WT	
	Contrôle	80%	Contrôle	80%
Alanine	202,12±10	44,53±8.62	38,16±9.77	15,68±1.19
Arginine	45,99±3,94	15,16±60	8,33±0.66	16,71±7,14
Aspargine	202,39±2,25	40,48±13,35	136,89±8,99	51,64±10.74
Glutamine	701,10 ±25,54	44,56±20	161±21,67	43,73±6,89
Glutamate	584,22±14,59	387,09±25,05	188,18±27,22	361,91±64,24
Glycine	200,36±70,33	51,07±8,48	70,83±6,32	104,45±28,78
Isoleucine	13.50±0.88	24,05±7,79	10,06±4,76	26,63±11,09
Leucine	20,52±0,86	21,31±1,02	8,77±0,70	44,46±19,06
Lysine	14,61±0,41	21,35±10,13	5,87±0,36	30,56±13,18
Méthionine	15,21±0,15	9,14±0,18	10,84±0,33	10,96±1,32
Ornithine	7,36±0,56	5,13±0,93	4,07±1,03	3,70±0,04
Phénylanine	131,70±60	117,53±13,95	58,57±1,33	101,64±10
Sérine	507,24±12,50	90,78±29,44	104,46±2,70	78,81±9,92
Thréonine	75,46±2,44	52,88±17,95	47,82±5,65	61,55±16,72
Tryptophane	6,37±0,53	41,7±7,40	2,75±0,13	29,75±0,13
Valine	25,66±1,11	21,58±4,18	11,77±1,37	45,17±22,62

Discussion Générale

L'objectif principal de ce travail était d'étudier l'importance des mitochondries dans la réponse à une contrainte hydrique. Pour cela nous avons exploité le mutant CMS de *Nicotiana sylvestris* qui est caractérisé par l'absence du complexe I (CI) respiratoire (Guettierers *et al.,* 1997, Sabar *et al.,* 2000 ; Pineau *et al.,* 2005). Des travaux antérieurs avaient montré que les plantes CMS présentent une résistance accrue vis-à-vis de certains stress tels que l'ozone, la Mosaïque du Tabac (Dutilleul *et al.,* 2003a) et le méthylviologène (Priault, 2006).

Nous montrons au cours de cette étude que la mutation du CMS modifie la tolérance vis-à-vis du stress hydrique. En effet, d'une part le RWC foliaire des plantes CMS diminue moins vite après un arrêt de l'arrosage que chez les plantes WT de même développement foliaires. D'autre part, les plantes CMS sont capables de maintenir une photosynthèse plus élevée que les plantes WT lorsque les deux génotypes sont maintenus pendant 6 à 10 jours en alimentation hydrique limitante à un RWC de 80%. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse que la mitochondrie joue un rôle crucial dans l'adaptation des plantes à la sécheresse (Bartoli *et al.,* 2004 ; Pastore et *al.,* 2007). Dans ce travail, nous avons recherché les composantes physiologiques et biochimiques de la meilleure tolérance associée à l'absence du CI.

I. La plus faible transpiration du CMS lui confère une meilleure résistance à la déshydratation

Bien que la croissance des plantes CMS soit plus lente que celle des plantes WT, elles atteignent la même biomasse (De Paepe *et al.,* 1990). Nous arrêtons l'arrosage des deux types de plantes au même stade de développement : Les plantes WT et CMS ont la même surface foliaire et un rapport partie aérienne/racine similaire (***tableau II***). Après 4 jours d'arrêt de l'arrosage, g_s est plus élevé chez les CMS que chez les WT (***figure 25***). De même A_n était aussi plus élevé chez les CMS au 4ème jour (***figure 28***).

La tolérance à la sécheresse des CMS, comparativement aux WT, est probablement une conséquence de leur faible g_s en conditions bien hydratées et pendant les premiers jours de la déshydratation.

On pourrait supposer que la conductance stomatique réduite du CMS peut être due à une différence de la densité stomatique mais il a été démontré que la densité stomatique est similaire entre les WT et les CMS (Priault, 2006). Par conséquent la différence de g_s enregistré est probablement une conséquence d'une différence de niveau d'ouverture des stomates.

L'ouverture et la fermeture des stomates sont fortement et finement régulées par de nombreux facteurs de signalisations (Meyer et al, 2005) dont les plus importants sont l'acide abscissique (ABA) et les facteurs d'origine hydrique et/ou hydrauliques (Comstock, 2002), qui agissent en interaction. L'ABA est un élément clé de la fermeture stomatique. Il est transporté dans le xylème du système racinaire jusqu'aux feuilles et perçu au niveau des cellules de garde (Comstock, 2008 ; Bray, 1988 ; Jian et Zhang, 2002). Le contenu total en ABA foliaire est similaire dans les feuilles de plantes WT et CMS bien hydratées (Djebbar *et al.,* soumis), suggérant que la concentration de l'ABA foliaire n'est pas la cause de la différence de g_s entre les plantes hydratées. L'accumulation d'ABA plus accentuée chez le WT au début de la déshydratation est en relation avec un dessèchement plus rapide du sol. En effet, le potentiel hydrique des racines agit comme indicateur du statut hydrique du sol et la disponibilité des ressources en eau (Comstock, 2002). La corrélation entre g_s et le contenu en ABA est différente entre les deux génotypes (Djebbar *et al.,* soumis).

L'induction de la fermeture des stomates via l'ABA est complexe et interagit avec plusieurs voies à l'extérieur et à l'intérieur des cellules de garde. Par exemple l'oxyde nitrique (NO) est une composante de la voie de signalisation de l'ABA dans les cellules de garde (García-Mata and Lamattina, 2001, García-Mata and Lamattina, 2002 ; Meyer et *al.,* 2005). En effet, l'induction de la fermeture stomatique via l'ABA est inhibée en présence de PTIO, une molécule détoxifiant le NO (Desikan *et al.,* 2002 ; Garcia and Lamattina, 2002).

Par ailleurs les ROS sont impliqués dans le réseau de signalisation de l'ABA (Shroder, 2001 ; Garcia Matta & Lamattina ; 2003 ; Meyer, 2005). Les mitochondries du CMS sont susceptibles de produire des quantités plus élevées de ROS mitochondriaux suite à l'activité élevée du complexe III (Priault *et al.,* 2007), une source principale d'ions superoxyde par la chaîne respiratoire (Moller, 2001, Bartoli *et al.,* 2004). Plusieurs observations suggèrent une accumulation de ROS à l'intérieur et l'extérieur des mitochondries chez le CMS. La coloration par le nitroblue tetrazolium (NBT), un indicateur de l'accumulation de superoxyde, est plus accentuée dans les nervures des feuilles matures de CMS que chez le WT (Dutilleul *et al*., 2003a). Les taux d'expression et l'activité d'enzymes antioxydantes, tels la superoxide dismutase mitochondriale (MnSOD), l'ascorbate peroxydase cytosolique et la glutathion réductase, qui sont induites par un stress oxydatif (pour revue Noctor et Foyer, 1998), sont plus élevés chez le CMS que chez le sauvage (Garmier *et al.,* 2003, Dutilleul *et al.,* 2003a, Vidal *et al.,* 2007). Par ailleurs, il est possible que l'accumulation des ROS induise la

fermeture des stomates chez CMS. En effet, il a été déjà montré que la fourniture de H_2O_2 endogène ou exogène peut induire la fermeture stomatique (Desikan *et al.,* 2002 et 2004).

En outre, la mutation de CMS n'était pas liée aux changements au niveau de potentiel hydrique à la perte de turgescence (Π_{tlp}), de potentiel osmotique à saturation (Π_0) et de pression de turgescence à saturation (P_0). Ceci suggère que les feuilles des plantes WT et CMS possèdent le même statut hydrique et les mêmes propriétés mécaniques de la paroi cellulaire et que la différence de g_s observée entre les deux génotypes n'est pas reliée à une différence au niveau de ces paramètres. De même, Nardini *et al* (2008) ont montré que la différence de g_s entre la partie apicale et basale de la feuille de tabac n'est pas due à une différence au niveau des ces paramètres.

Par contre, on observe une différence au niveau de la conductance hydraulique foliaire (K_{fol}) entre WT et CMS (***figure 22***). Il a été proposé dans un certain nombre d'études que g_s soit étroitement liée à la conductance hydraulique (Comstock, 2002 ; Saello et al, 2005 ; Brodribb, 2005 ; Nadrini, 2008). En effet la conductance hydraulique des feuilles de CMS est environ 21% plus faible que celle des feuilles des plantes WT. La résistance hydraulique du xylème et la conductance stomatique ont été corrélés chez les plantes (Meinzer, 2002). Cette relation a été confirmée en montrant qu'une dépression artificielle de K_{fol} a entraîné une diminution proportionnelle de l'assimilation de CO_2 et la conductance stomatique (Hubbard, 2000). Plus récemment, Brodribb *et al*., (2005) ont recherché si la large différence en morphologie foliaire des plantes de forêts tropicales et tempérées correspondait à une différence d'efficacité hydraulique foliaire. Ils ont conclu que K_{fol} étant fortement corrélé avec la conductance stomatique indiquant l'existe d'une régulation interne entre la phase liquide et gazeuse de l'eau. Il pourrait être que la plus faible g_s chez CMS résulte de sa plus faible K_{fol}. Il est remarquable que les valeurs de g_s et K_{fol} des feuilles bien hydratées de WT et CMS soient bien ajustées à la régression linéaire de g_s et K_{fol} présentée par Brodribb *et al* (2005).

La contribution relative des voies vasculaire et extravasculaire à la résistance hydraulique foliaire est variable selon les espèces et les facteurs environnementaux (Cochard *et al.,* 2004 ; Nadrini et Saello, 2005 ; Nadrini *et al.,* 2008). La résistance hydraulique de la voie vasculaire est principalement influencée par des paramètres de l'architecture foliaire tels que la densité des veines et le diamètre du conduit xylémique ((Nardini et Salleo, 2005) tandis que celle de la voie extravasculaire peut être modulée via l'expression et/ou l'activation des aquaporines du plasmalemme. Chez le noyer, Cochard *et al.* (2007) ont proposé que l'ampleur de K_{fol} est

étroitement relié à l'abondance des transcrits des aquaporines de la membrane plasmique (Plasma membrane intrinsic protein 2 :PIP2). La résistance hydraulique des feuilles est principalement d'origine symplasmique. Comme les aquaporines facilitent le passage de l'eau de cellules en cellules, elles pourraient contrôler la valeur de cette résistance. Boursiac *et al.* (2008) ont observé que l'acide salicylique et la salinité diminuaient la conductance hydraulique racinaire chez *Arabidopsis thaliana*. Cette diminution est induite suite à l'accumulation des ROS qui induisent une régulation à la baisse des aquaporines racinaires. Ainsi l'activité des aquaporines peut être abaissé chez les CMS et pouvant être responsable de la faible K_{fol} observé chez ce génotype et par conséquent de la faible g_s.

II. L'inhibition d'A_n dépend de g_s au cours de la déshydratation

Comme montré dans les ***figures 25 et 28***, la diminution d'A_n et g_s en fonction du temps de déshydratation est plus rapide chez WT que chez CMS. Pour tous les RWC supérieur à 70%, A_n et g_s sont plus élevés chez les plantes WT que chez les plantes CMS, mais cette différence disparaît au dessous d'un RWC de 70%. Ceci montre que la différence de g_s et A_n entre les deux génotypes bien hydratés reste conservée au cours de la diminution de RWC. La relation d'A_n avec g_s est similaire chez les deux génotypes et montre que la diminution de g_s est le facteur principal de la diminution de la photosynthèse au cours de la déshydratation. Ceci ne signifie pas que les limitations non stomatiques sont absentes mais elles ne sont pas le facteur dominant qui limite la photosynthèse (Medrano *et al.,* 2000). Ceci est en accord avec plusieurs études précédentes qui montrent que la fermeture des stomates est le facteur primaire induit par la contrainte hydrique et peut expliquer l'inhibition de l'assimilation de CO_2 au cours de la déshydratation (Cornic et Briantais, 1991 ; Cornic, 2000 ; Fresneau et Cornic, 2002 ; Medrano et Flexas, 2002). Comme il a été souvent montré par ailleurs (Cornic *et al.,* 1987 ; Wingler *et al.,* 1997), le rendement quantique maximum de PSII mesuré par le rapport Fv/Fm après une longue période d'obscurité n'est pas changé même aux faibles RWC chez les deux génotypes. Ceci montre que la déshydratation n'induit pas une photoinhibition du PSII. Peeva et Cornic (2009) ont montré chez *Haberlea rhodopensis* que le PSII est capable de faire une séparation de charge même lorsque la feuille a perdu 80% de son eau. De plus, le transport linéaire des électrons (ETR) diminue plus lentement que la photosynthèse au cours de la déshydratation chez les deux génotypes comme montré lors d'études précédentes (Genty et al, 1987 ; Cornic et Briantais 1991 ; Fresneau et Cornic, 2002 ; Flexas et Medrano, 2002). En effet lorsque les stomates se ferment dans ces conditions le dioxygène peut remplacer totalement (en lumière limitante) ou partiellement (en lumière saturante) le dioxyde

de carbone. Cependant l'ETR reste toujours plus élevé chez le CMS que chez le WT au cours de la déshydratation.

Les valeurs de J_c et J_o , les flux d'électrons consommés respectivement par CO_2 et O_2, sont obtenues par mesure simultanée de l'assimilation du CO_2 et de la fluorescence chlorophyllienne (Cornic et Briantais, 1991 ; Valentini *et al.*, 1995). D'après les propriétés cinétiques de la rubisco on a :

$J_c/J_o = S\ (Cc/O),$

Avec *S* correspondant à la spécificité de la Rubisco pour le CO_2 et l'O_2, et C_c et *O* étant les concentrations respectives de CO_2 et O_2 dans les chloroplastes. Si on considère que *S* et *O* ne sont pas modifiés au cours de la déshydratation, la relation entre A_n et J_c/J_o correspond à la relation d'*An* et *Cc*. Chez les deux génotypes, on remarque que cette relation est la même lorsque A_n est mesurée à des C_a différents sur la feuille bien hydratée et à C_a constant lorsque la feuille se déshydrate (***figure 32***). Ceci indique que chez les plantes WT et CMS l'inhibition de la photosynthèse au cours de la déshydratation est due à la diminution de la fraction molaire de CO_2 dans les chloroplastes. Ceci a déjà été montré dans plusieurs travaux (Cornic et Briantais, 1991 ; Cornic, 2000, Lal *et al.,* 1996 ; Flexas *et al.,* 2004, Fresneau et Cornic, 2002).

En conclusion, il est évident que les plantes WT et CMS sont affectées de la même manière au cours de la déshydratation au niveau de leurs paramètres photosynthétique, bien que les plantes CMS aient la capacité de maintenir une teneur en eau plus élevée que les plantes WT.
Il est à noter que nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Gallé et al. (2010), qui ont reporté que les plantes WT et CMS sont affectées de façon similaire par la contrainte hydrique. Cependant, ces auteurs ont effectué la comparaison dans des conditions de stress hydrique sévère lorsque la conductance stomatique diminue au dessous 0,05 mol m^{-2} s^{-1}. Dans nos expériences, cette valeur de conductance stomatique est atteinte à des RWC inférieur à 70 % chez les deux génotypes. A cette intensité de stress, la photosynthèse et la conductance stomatique sont aussi comparables chez les deux génotypes dans nos expériences.

III. Acclimatation à un RWC de 80%

Dans les expériences précédentes nous avons montré que le mutant dépourvu du complexe I de *Nicotiana sylvestris* est plus résistant à la déshydratation à cause de sa plus faible

conductance stomatique. Mais lorsque les plantes WT et CMS sont maintenues à un RWC de 80% (cette valeur étant choisie parce que g_s est la même chez le WT et le CMS soumis à une déshydratation rapide), l'assimilation de CO_2 mesurée en conditions ambiantes de CO_2 (380 ppm) et sous une lumière de 350 PAR µmol.m^{-2} s^{-1} montre une diminution chez les deux génotypes mais plus accentuée chez les WT (***tableau III***). La conductance stomatique diminue chez les deux génotypes à un niveau similaire équivalent à 0,1 mol H_2O m^{-2} s^{-1}. La fraction de CO_2 intercellulaire, *Ci*, calculée comme dans van Caemmerer and Farquhar (1981) diminue chez les deux génotypes de 280 ppm pour les plantes bien hydratées à 240 ppm pour les plantes maintenues à 80% de RWC. Cette différence d'assimilation de CO_2 chez les plantes maintenues à un RWC de 80% suggère une meilleure acclimatation des plantes CMS à la contrainte hydrique.

III.1. Limitation stomatique et non stomatique de la photosynthèse

La photosynthèse n'est pas diminuée seulement à cause des limitations stomatiques mais aussi lorsque le RWC est inférieur à 70% environ par des limitations non stomatiques comme par exemple l'inhibition des synthèses de RuBP et d'ATP (Lawlor, 2002). La plus forte diminution d'A_n chez les WT80 par rapport aux CMS80 avec une g_s similaire pourrait suggérer la présence des limitations non stomatiques qui affectent alors la photosynthèse.

Afin d'évaluer l'ampleur de l'effet de la sécheresse sur la capacité photosynthétique intrinsèque nous avons mesuré A_n en fonction de C_i. À faible C_i la pente de la courbe de réponse A_n-C_i est diminuée chez les plantes WT80, par contre elle reste inchangée chez le CMS80, par rapport respectivement aux plantes WT et CMS hydratées (***tableau V***). La pente à faible C_i correspond à l'efficacité de carboxylation (*EC*) (Farquhar et al. 1980 ; Farquhar and Sharkey 1982) qui est reliée à la quantité de Rubisco active (Farquhar *et al.,* 1980 ; Farquhar and Sharkey, 1982 ; Long et Bennacchi, 2003 ; Lawlor, 2002), et reflète la quantité de Rubisco active (par exemple : Medrano *et al.,* 2002).

L'efficacité de carboxylation plus élevée des plantes CMS80 par rapport aux plantes WT80 peut être due soit à une grande quantité de la Rubisco ou à une plus forte activité de l'enzyme (Von Caemmerer, Farquhar, 1981). Panakovic *et al.,* (1999) ont montré chez un hybride de tournesol tolérant à la sécheresse qu'une plus forte teneur en Rubisco pourrait être un facteur conférant une meilleure acclimatation et une tolérance plus élevée à la sécheresse. Kitao *et al.,* (2003), en étudiant l'acclimatation à la contrainte hydrique, montre que le déclin de

l'assimilation nette de CO_2 chez les plantes acclimatées (Japanese mountain birch) à un stress hydrique imposé par une réduction de l'arrosage n'est pas associé à une diminution de l'efficacité de carboxylation. Ceci est conforme au cas des plantes CMS80 où on a observé une faible diminution d'A_n mais sans qu'il y ait diminution de l'efficacité de carboxylation.

Le point de compensation pour le CO2, Γ, montre une augmentation significative chez les plantes WT lorsqu'elles sont maintenues à un RWC de 80%. Par contre, Γ ne change pas chez les plantes CMS. D'une façon générale l'augmentation du point de compensation est variable selon les espèces pour une faible diminution de RWC mais cette augmentation devient importante lorsque le RWC diminue au-dessous de 80% (Lawlor, 2002). L'augmentation du point de compensation associée à la diminution de l'efficacité de carboxylation chez les WT80 suggère que la baisse de l'assimilation nette de CO_2 lors du maintien des WT à un RWC de 80% implique des modifications du métabolisme photosynthétique. De plus, la vitesse maximale de carboxylation de la Rubisco (*Vcmax*) est diminuée seulement chez les plantes WT 80. Chez les plantes CMS80, elle reste similaire aux plantes CMS bien hydratées.

L'assimilation maximale (A_{max}) qui correspond à la capacité photosynthétique est reliée aux limitations imposées par la régénération du Ribulose-1,5- bisphosphate (RuBP) qui à son tour est liée à l'activité du cycle de Calvin (Farquhar *et al.,* 1980 ; Farquhar and Sharkey, 1982 Long et Bennacchi, 2003 ; Lawlor, 2002). Il faut noter que nos mesures sont faites sous une lumière non saturante (350 µmol m^{-2} s^{-1}), les mêmes que prévalent dans des conditions de croissance, et donc que l'A_{max} que nous mesurons peut être au-dessous des capacités photosynthétiques réelles des deux génotypes. La diminution plus forte d'A_{max} chez les plantes WT par rapport aux plantes CMS lorsqu'elles sont maintenues à un RWC de 80% indique une plus forte diminution de la capacité de la régénération de RuBP et donc une plus forte limitation non stomatique (Lawlor, 2002). Ceci a été aussi observé par Pankovic (1999), qui a montré que bien que la réduction de g_s soit similaire chez deux hybrides de tournesol maintenus en déficit hydrique, la régénération de RuBP était plus inhibée chez l'hybride non résistant à la contrainte hydrique. De même Rivero *et al.* (2009) ont montré une diminution significative de la capacité de renouvellement de la RuBP seulement chez le WT de *Nicotiana tabacum* en comparaison avec un transgénique résistant à la contrainte hydrique.

La diminution du contenu de la RuBP est souvent observée chez le tournesol et l'orge maintenues en conditions hydrique limitantes (Giménez *et al.,*1992 ; Wingler et al, 1999).

Dans d'autres études cette diminution a été corrélé avec la diminution du contenu en ATP (Tezara *et al.,* 1999 ; Flexas et Medrano, 2002).

III.2 Variations et régulation du flux d'électrons photosynthétiques (ETR)

La régénération de la RuBP étant liée aux réactions primaires de la photosynthèse (Lambers *et al.,* 2008), nous avons étudié les réactions primaires de la photosynthèse pour savoir si elles pouvaient limiter le déroulement du cycle de Calvin sous la contrainte hydrique. Après 6 à 10 jours d'acclimatation à un RWC de 80%, les plantes WT montrent une diminution significative de l'ETR par rapport aux plantes bien hydratées (***figure 37***). Par contre, l'ETR est peu affecté chez les CMS80.

Le quenching photochimique, qP, représente la fraction des centres ouverts du PSII (Krause et Weiss 1991, Schreiber et al. 1994, Govindjee, 1995). Le qP atteint ses valeurs les plus faibles chez les WT80 (***figure 38B)*** mais il est semblable chez les plantes CMS, CMS80 et WT. Ceci suggère que chez le WT80, Q_A reste plus réduite, suite probablement á un manque d'accepteurs en aval, ce qui est conforme à la baisse de V_{cmax}.

Le quenching non photochimique (NPQ) est souvent proportionnel à l'acidification du lumen, et est interprété comme une témoin d'une dissipation thermique dans les antennes collectrices du PSII (Gounaris et al, 1984 ; Muller *et al.,* 2001) pour éviter la photoinhibition de PSII (Yordanov, 2000). L'acidité du lumen induit la dé-epoxidation de violaxanthine en zeaxanthine et l'augmentation du NPQ à faible RWC (Wingler, 2000 ; Yordanov, 2000). NPQ est presque le même entre les plantes CMS, CMS80 et WT mais plus forte chez les plantes WT80 à tous les C_i, montrant une dissipation thermique plus élevée chez les plantes WT80 que chez les autres. Ceci est en accord avec les résultats de Flexas *et al.,* (1999) sur des vignes maintenues à un arrosage de 50% de capacité de champ. Dans cette étude, la diminution d'ETR est corrélée avec l'augmentation de NPQ. On peut conclure ainsi que le gradient de protons est suffisamment fort pour la synthèse d'ATP chez WT80 et que l'assimilation des plantes WT80, ne semble pas être limitée par les réactions primaires de la photosynthèse.
Alternativement un stress hydrique peut affecter l'ATP synthase chloroplastique, ce qui baisse la disponibilité en ATP et affecte ainsi l'assimilation du CO_2 et la consommation des électrons (Tezera *et al.,* 1999, pour revue Lawlor, 2002). Cependant, une synthèse de la littérature réalisée par Flexas *et al.* (2004 et 2006) montre que peu d'auteurs s'accordent sur

l'hypothèse d'une diminution de la concentration d'ATP synthases lors d'un déficit hydrique. Nos résultats ne permettent pas de conclure quant à un effet du stress hydrique sur les ATPases.

Un faible qP est souvent associée à une augmentation du risque de photoinhibition (Park et al. 1996, Baroli et Melis 1998). Le rapport Fv/Fm, qui est un indicateur de la photoinhibition, ne diminue pas chez WT80 en comparaison des plantes WT bien hydratées. Ceci montre que le rendement quantique maximal de PSII n'est pas affecté chez les WT80. De plus, la relation entre Φ_{PSII} et Φ_{CO2} est le même chez WT et WT80 montrant que la sécheresse n'affecte pas les réactions primaires chez le WT. Plusieurs travaux montrent qu'il n'ya aucune photoinhibition des PSII (Cornic et Fresneau, 2002), même dans le cas d'un stress sévère et prolongé (Panakovic et al., 1999).

Lorsque le CO_2 est limitant, le flux d'électrons vers la photorespiration peut consommer les électrons et l'ATP, ce qui peut permettre de maintenir un fort qP et un faible NPQ (Wingler *et al.,* 2000, Cornic et Fresneau, 2002). De plus la photorespiration peut protéger l'appareil photosynthétique vis-à-vis de la photoinhibition (Cornic, 1976 ; Powles et Thorne , 1981 Murata e*t al.,* 2007). La distribution des électrons vers l'oxygénation (J_o) et la carboxylation (J_c) ont été estimées chez les deux génotypes avant et après le maintien à un RWC de 80% en utilisant le modèle de Valentini *et al.* (1995). En supposant que *Jo* représente exclusivement le flux d'électrons vers la photorespiraiton on confirme les résultats de Priault *et al.* (2006) qui ont montré une photorespiration plus élevée chez le CMS que chez le WT bien hydraté. Il est remarquable que J_o mesuré sous conditions ambiantes d'oxygène et du CO_2 (***tableau VI***) est presque identique chez les plantes hydratés et les plantes maintenues au manque d'eau. Ceci montre que la photorespiration ne change pas chez les deux génotypes dans un air normal (21% d'O_2 avec 380 ppm de CO_2) lorsque les plantes sont maintenues á un RWC de 80 %. D'une autre part, la réponse de J_o à C_i reste similaire chez le CMS80 à celle de CMS mais le WT80 montre une réponse de J_o à la variation de C_i différente de celle de WT. A faible C_i, J_o est plus basse chez le WT80 que chez le WT bien hydraté (***figure 40***) ce qui suggère une plus faible capacité photorespiratoire chez le WT80 que chez le WT. Par contre à forte C_i, J_o reste plus fort chez le WT80 que chez le WT, suggérant un flux d'électrons alternatif non relié à la photorespiration. Ceci peut être conclu à partir des courbes d'assimilation de CO_2 à 0,5 et 21% d'oxygène à fort C_i qui suggèrent que la photorespiration est largement inhibée dans ces conditions puisque que l'assimilation à forte C_i est identique pour les deux fractions molaires d'oxygène (0,5 et 21% O_2) chez le WT et le WT80 (***figure***

35). On peut supposer ainsi que J_o plus élevé chez WT80 montre dans ces conditions un flux d'électrons vers d'autres réactions, comme par exemple la réaction de Mehler. Par contre Wingler *et al.* (1999), en utilisant des mutants d'orge à activités photorespiratoires réduites, ont montré une augmentation du flux photorespiratoire en conditions de déficit hydrique. Le rôle de la photorespiration durant l'acclimatation à la sécheresse a été évalué aussi chez des plantes transgéniques de tabac (*Nicotiana tabaccum*) surexprimant une cytokinine (Rivero, 2009). La résistance de ces plantes transgéniques est associée à une plus forte induction de la photorespiration en conditions limitantes en eau par rapport au type sauvage. Chez WT80, l'existence d'une valeur élevée de J_o lorsque la fraction molaire de CO_2 est élevée, condition dans laquelle la photorespiration est inhibée, suggère l'induction d'une réaction de Mehler.

III.3. Métabolites du cycle photorespiratoire

L'estimation de la photorespiration (J_o) à faible et forte C_i suggère une diminution de la capacité photorespiratoire chez WT80. Pour cela nous avons analysé les métabolites photorespiratoires afin de chercher une limitation éventuelle du flux photorespiratoire. Le plus remarquable a été l'accumulation de la glycine chez les plantes WT80 avec une forte diminution du rapport Ser/Gly suggérant une limitation au niveau de l'enzyme GDC (glycine decarboxylase). Ceci est en accord avec l'accumulation de la glycine sous l'effet de la contrainte hydrique chez un mutant d'orge à activité GDC réduite (Wingler *et al.,* 1999). Chez des plantes transgéniques de tabac qui présentent une meilleure résistance au stress hydrique, Rivero *et al.* (2009) ont montré une augmentation de l'activité des enzymes GDC et SHMT (respectivement glycine décarboxylase et serine hydroxymethyltransférase) qui ont une forte activité dans les matrices des mitochondries des plantes (Douce *et al.,* 2001). Le fonctionnement de la GDC est connecté à la chaîne de transfert d'électrons mitochondriale via le complexe I (Douce et al, 2001 ; Bauwe et al, 2010). Bien que chez le CMS, le complexe I soit inopérant, il n'y a pas de blocage au niveau de GDC (Dutilleul et *al.,* 2005). Nos expériences ont montré une diminution de la respiration chez les plantes WT et CMS maintenues à un RWC de 80 %, indiquée par une diminution de la libération de CO_2 à l'obscurité et une diminution des substrats de la respiration comme le citrate. On peut donc établir l'hypothèse qu'une faible respiration chez les plantes maintenues à un RWC de 80 % est corrélée avec une faible activité du complexe I chez le WT80, à laquelle correspond une faible activité de GDC, qui n'est pas le cas chez le CMS80.

Le glycérate est aussi significativement augmenté chez les deux génotypes lorsqu'ils sont maintenus à un RWC de 80%. Ceci peut être dû à la difficulté pour le cycle de Calvin à intégrer le glycérate sous l'effet de la contrainte hydrique.

La conductance stomatique est identique entre les deux génotypes lorsqu'ils sont maintenus à un RWC de 80%. Ceci suggère que d'autres facteurs affectent l'assimilation de WT80. Les limitations non stomatiques peuvent être classés en limitations métaboliques et diffusives non-stomatiques (Grassi et Magnani, 2005). On parle de limitations diffusives lorsque la diffusion du CO_2 de l'extérieur vers les chloroplastes est limitant. Flexas *et al.,* (2002, 2006a) concluent que la sécheresse affecte principalement la diffusion du CO_2 (à travers les stomates et dans le mésophylle).

III.4. Les limitations diffusives non-stomatiques

Les limitations diffusives non stomatiques correspondent à la diminution de la conductance du mésophylle au CO_2 (g_m). En supposant que les électrons transportés par la chaîne photosynthétique sont consommés par la photosynthèse et la photorespiration avec seulement une proportion négligeable utilisée par la réaction de Mehler, la conductance du mésophylle peut être calculée (Long et Bernacchi, 2003). La conductance du mésophylle correspond à la diffusion du CO_2 dans les espaces intercellulaires sous forme gazeuse, puis à sa dissolution en phase liquide, et enfin à son entrée puis à sa diffusion à l'intérieur des cellules jusqu'aux sites catalytiques de la Rubisco, dans le stroma des chloroplastes (Flexas *et al.,* 2008). Les résultats montrent qu'en conditions bien hydratées, la conductance du mésophylle est plus élevée chez les plantes WT par rapport aux plantes CMS (***Tableau VII***). Ceci est en accord avec les résultats de Priault *et al.* (2006 b) qui montrent, en déterminant g_m par l'utilisation des isotopes stables, que la conductance interne est deux fois plus faible chez les plantes CMS que chez les plantes WT lorsqu'elles sont cultivées sous une lumière de 350 PAR µmol $m^{-2}s^{-1}$. Suite au maintien à un RWC de 80%, g_m diminue fortement chez les plantes WT80, par contre elle ne diminue pas chez les plantes CMS80.

gm est variable entre les espèces et répond aux conditions environnementales (Flexas *et al.,* 2008). *gm* diminue avec le déficit hydrique (Flexas *et al.,* 2002 ; Lawlor et Cornic, 2002 ; Warren et *al.,* 2008 ; Grassi et Magnani, 2005), le stress salin (centritto *et al.,* 2003) ainsi que l'âge de la feuille (Ethier *et al.,* 2006). Il existe une bonne relation entre A_n et g_m et elle est

régulée de façon identique à celle entre A_n et g_s (Galmes *et al.,* 2007 ; Grassi et Magnani, 2005 ; Flexas et al., 2008). Certains auteurs ont suggéré que des anhydrases carboniques, enzyme responsable de l'interconversion de HCO_3 en CO_2, ou des aquaporines participent à cette régulation (Flexas *et al.,* 2004). Dans ce sens, Uehlein *et al.* (2003) ont observé une augmentation de la perméabilité membranaire au CO_2 chez les oocytes de Xénope exprimant l'aquaporine du tabac NtAQP1. Ils n'ont toutefois pas mesuré *gm*. Cependant, Flexas *et al*. (2006 c), en utilisant des plantes sous et surexprimants NtAQP1 ont montré l'implication de ces aquaporines dans la conductance du mésophylle au CO_2. Plus récemment Uehlein *et al.,* (2008) ont montré l'existence de NtAQP1 dans la membrane interne du chloroplaste du tabac (*Nictiana tabaccum*) et que la réduction de son expression abaisse la conductance interne au CO_2. Une désactivation des aquaporines sous l'effet de la contrainte hydrique chez les feuilles des plantes WT80 peut probablement diminuer la diffusion de CO_2 jusqu'aux sites de carboxylation.

Ces résultats suggèrent que les faibles niveaux d'assimilation de CO_2 observés chez les WT80 par rapport avec ceux des CMS80, sont au moins partiellement dus à des limitations d'origine mésophyllienne, de l'entrée du CO_2 dans les chloroplastes.

Nous avons calculé la fraction molaire du CO_2 dans les chloroplastes (C_c) qui prévaut lorsque les plantes se trouvent dans un air normal (21% d'O_2 avec 380 ppm de CO_2). Ce calcul montre qu'effectivement C_c est le plus faible chez WT80. Ce résultat indique que g_m est plus limitante chez WT80 que chez CMS80 et limite ainsi l'assimilation de CO_2.

III.5. Inhibition de l'activité de la Rubisco

La plus faible C_c peut limiter l'activité de Rubisco. Récemment Galmés *et al* (2011) ont comparé les mécanismes de l'inhibition de l'activité Rubisco chez 11 espèces méditerranéennes qui différent par leur réponse au stress hydrique. Ils suggèrent que la désactivation des sites de Rubisco pourrait être induite par des faibles C_c survenant sous la contrainte hydrique. Leur étude montre que l'activation de Rubisco abaisse lorsque C_c diminue au-dessous de 120 µmol mol^{-1}. À ce faible C_c, l'équilibre entre Rubisco carbamylé et décarbamylé se déplace vers la dernière forme. Ils ont suggéré également que les espèces adaptées à fonctionner à basse C_c peuvent maintenir leur Rubisco active sous une sécheresse plus intense. Ceci est en accord avec nos résultats ou les plantes WT80 montrent une diminution de g_m ce qui diminue C_c (107 *vs* 218 ppm chez les WT hydratées) à un niveau plus faible que le seuil indiqué par Galmès et al (2011), alors que chez CMS, la croissance en conditions hydrique limitantes n'a pas changé g_m et C_c soit légèrement modifié (158 *vs*164

ppm). La Rubisco pourrait être moins activé chez les WT 80 que chez les CMS80 à cause de sa faible C_c.

III.6. L'accumulation des sucres et des acides aminés suite au maintien à un RWC de 80% est différente entre les plantes WT et CMS

Une acclimatation á un RWC 80 % suppose aussi une acclimatation au niveau du potentiel osmotique (Sanchez *et al.,* 1998) qui a été souvent corrélée avec une accumulation des sucres solubles (Timpa *et al.,* 1986 ; Korn *et al.,* 2008 ; Pinheiro et Chaves, 2011). Nous avons comparé les sucres solubles des WT et CMS bien hydratés avec celles des plantes maintenues à 80 % RWC. Chez les deux génotypes le contenu en sucres solubles augmentent fortement et le plus remarquable est une forte accumulation du glucose qui a été aussi observé dans d'autres études (Timpa *et al.,* 1986; Stitt *et al.,* 1991). Cependant, le potentiel osmotique n'augmente pas significativement chez les deux espèces, suggérant un découplage entre l'accumulation des sucres et du potentiel osmotique comme précédemment observé chez l'espèce de *Nicotiana tabacum* qui ne montre pas d'ajustement osmotique sous la contrainte hydrique (Karakas *et al.,* 1997). Bien que l'accumulation des sucres soit plus forte chez WT80, la photosynthèse est plus inhibée chez WT80 que chez le CMS80. Ceci pourrait être expliqué par une plus forte limitation de l'export des sucres chez les plantes WT80. En effet, il a été souvent suggéré (Panakovic *et al.,* 1999 ; Chaves et Oliveira 2004) qu'une inhibition de l'exportation sous la contrainte hydrique induit une accumulation des carbohydrates et une inhibition de la photosynthèse

Contrairement aux sucres, les acides aminés augmentent légèrement chez le WT80 comme souvent montré chez d'autres plantes soumises à la sécheresse (Barnett et Maylor 1966; Charlton *et al.,* 2008), mais diminuent fortement chez le CMS80 en comparaison des plantes bien hydratés (***figure 46***). Il a été montré (Djebbar *et al.,* soumis) que chez des plantes privées d'arrosage pendant 5 jours, le contenu en protéines solubles augmente chez les CMS, mais diminue légèrement chez le WT. Il est remarquable que la variation du contenu en acides aminés dans les deux expériences (déshydratation rapide ou maintien à un RWC de 80%) va dans le même sens. Ceci suggère que sous la contrainte hydrique, la baisse du contenu en acide aminés libres observée chez le CMS pourrait être le résultat de leur incorporation active en protéines.

Les résultats ensembles suggèrent donc une meilleure acclimatation des plantes CMS par rapport aux plantes WT lorsqu'elles sont maintenues à un RWC de 80%. Ceci est indiqué par un maintien de la photosynthèse et une meilleure mobilisation des acides aminés, mécanismes qui peuvent etre impliqués dans sa meilleure tolérance à la sécheresse.

Conclusions et Perspectives

Le présent travail montre que la mitochondrie peut jouer un rôle dans la réponse et l'acclimatation des plantes à la contrainte hydrique. En effet, le mutant (CMS) de *N. sylvestris*, dépourvu du complexe I de la chaîne respiratoire, maintient un contenu en eau plus élevé durant une déshydratation que le type sauvage (Djebbar *et al.,* soumis) et présente une activité photosynthétique plus forte lorsqu'il est soumis à une alimentation hydrique limitante permettant l'établissement d'un contenu relatif en eau (RWC) de 80%. Dans ce travail, la comparaison entre les deux génotypes s'est faite en utilisant des plantes au même stade de développement présentant la même surface évaporante et la même masse racinaire.

Réponse à une sécheresse rapide.

La plus grande tolérance du CMS à une sécheresse rapide est causée par une transpiration plus faible, résultat d'une conductance stomatique qui reste inférieure à celle du type sauvage (WT) jusqu'à ce qu'un RWC de 80% soit atteint.
La raison pour laquelle la conductance stomatique (g_s) du mutant est plus faible que celle du WT reste encore incertaine. Elle n'est pas liée à une différence de concentration d'ABA foliaire entre les 2 génotypes bien hydratés. Cependant, comme la conductance stomatique ne répond pas de la même façon dans les deux types de plantes lorsque la concentration d'ABA foliaire augmente durant la sécheresse, il est clair qu'il y a bien deux contextes physiologiques bien distincts.

La faible conductance stomatique du CMS peut être le résultat de sa faible conductance hydraulique foliaire (K_{fol}). Il est intéressant de noter que les valeurs de g_s et K_{fol} des deux génotypes s'ajustent bien sur des données similaires publiées concernant des fougères et certaines des gymnospermes dont l'écologie est différente. Comme suggéré par Brodribb *et al.* (2005), il est probable qu'il y ait dans la feuille une forte interaction entre la conductance stomatique et la conductance hydraulique entraînant la modification de g_s lorsque K_{fol} est changé. L'un des éléments de cette régulation pourrait être l'activité des aquaporines qui facilitent le passage de l'eau de compartiment à compartiment. Comme il y a plusieurs indications que les espèces activées d'oxygène (ROS) peuvent s'accumuler chez un mutant de la chaîne respiratoire (Priault *et al.,* 2007), on peut supposer que l'activité des aquaporines, qui est inhibée par les ROS, pourrait être ralentie chez ce génotype. Il est bien clair que l'exploration de cette hypothèse nécessite un travail alliant les techniques de biologie moléculaire, permettant de déterminer l'état d'oxydation des aquaporines, et de physiologie,

permettant de corréler un état réduit/oxydé des aquaporines avec des valeurs de la conductance hydraulique. De plus le métabolisme des ROS peut intervenir directement pour régler l'ouverture des stomates, le rôle du peroxyde d'hydrogène à ce niveau étant maintenant bien connu (Deskian *et al.,* 2004 ; Boursiac *et al.,* 2008).

D'autres hypothèses pourraient être également explorées par des études ciblées du métabolisme. Ainsi, est-ce que la faible g_s du mutant peut être reliée à son niveau élevé en composés azotés et acides aminés ? Les effets de changements dans l'alimentation azotée sur l'ouverture stomatique ont déjà été effectivement notés (Radin *et al.,* 1981; Guo *et al.,* 2003; Lu *et al.,* 2005). Est-ce que les concentrations élevées de NAD et d'ATP chez le mutant interfèrent avec l'ouverture stomatique ? Par exemple l'accroissement de NAD peut renforcer la signalisation de l'ABA (Wang et Pichersky, 2007). Quoiqu'il en soit, les aspects évoqués ci-dessus sont directement liés au fonctionnement de la mitochondrie, qu'il s'agisse de la production/consommation de NADH, d'ATP ou de ROS, ou qu'il s'agisse du métabolisme azoté qui implique le fonctionnement du TCA.

Acclimatation à un RWC de 80%

Les CMS s'acclimatent mieux que les WT à des conditions hydriques limitantes induisant une perte d'eau de 20% environ (arrosage permettant le maintien d'un RWC de 80% chez les deux génotypes pendant la sécheresse). Ils présentent, à la fois en CO_2 saturant et limitant, l'assimilation de CO_2 la plus forte, bien que leur conductance stomatique soit identique à celle des WT dans ces conditions hydriques particulières.
De fait la conductance interne à la diffusion du CO_2 (g_m) est la plus faible chez les WT acclimatés (WT80) et diminuée de moitié environ par rapport à des plantes bien hydratées. Il est difficile de discuter le pourquoi de cette baisse importante de g_m, car les éléments impliqués dans cette conductance restent très mal décrit. Peut être, encore ici, les variations de conductance hydrauliques sont-elles cruciales: les aquaporines pouvant faciliter la diffusion du CO_2 avec celle de l'eau. En effet la K_{fol} des WT diminue rapidement lorsque les feuilles perdent leur eau, tandis que celle des CMS reste constante dans la gamme des RWC concernés lors de cette acclimatation. Mais clairement d'autres études à la fois sur g_m et K_{fo} sont nécessaires impliquant outre les méthodes courantes de physiologie, de biologie moléculaire, une modélisation mathématique à fin d'affiner les modèles utilisés dans l'évaluation de ces paramètres.

La plus faible g_m chez les WT80 est liée, comme on l'attend, à une plus petite fraction molaire de CO_2 dans les chloroplastes (C_c) chez ce génotype en condition atmosphérique normale. Cela devrait causer une augmentation de la vitesse d'oxygénation du RuBP (J_o). Cependant la valeur de J_o chez les WT80 est très similaire à celle estimée chez les WT sans carence hydrique (WT).

La baisse de la vitesse de carboxylation maximum chez les WT80 peut être, au moins en partie, un élément expliquant l'absence de stimulation de J_o par le faible C_c. Des données métaboliques suggèrent également une autre voie d'exploration. En effet, comme le contenu en glycine est plus élevé chez le WT80 par rapport au WT on peut aussi faire l'hypothèse que la condition hydrique limitante provoque une limitation sur la voie photorespiratoire au niveau de l'activité de la GDC. Cette limitation serait aussi bien visible en comparant les WT80 et les CMS80 puisque les premières présentent un rapport Ser/Gly plus faible que celui des secondes.

Là encore la liaison entre ces hypothèses et les caractéristiques du mutant mitochondriale est difficile à faire. L'une des voies est peut être de réexplorer la possibilité d'une liaison entre la GDC et le complexe I. Chez le mutant l'impossibilité de cette liaison pourrait la rendre sensible à une inhibition par le NADH.

Enfin il a été vu antérieurement que la mutation affectait la flexibilité de l'appareil photosynthétique réduisant ses capacités d'acclimatation à l'ombrage (Priault *et al.,* 2006a). Il se pourrait qu'une carence hydrique prolongée entraine une modification de la chaîne photosynthétique d'électron, avec une augmentation de la réaction de Mehler. Cela devrait être lié à une augmentation de l'activité des enzymes participant au métabolisme des espèces active d'oxygène qui sont alors synthétisées et pourrait être approfondi en relation avec la régulation de la distribution et de l'utilisation de l'énergie produit dans le chloroplaste.

Références Bibliographiques

Atkin O. K. and Macherel D. 2009. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany*. **103**: 581–597.

Aharon R., **Shahak Y., wininger S., Bendov R., Kapulnik Y and Galili G. 2003**. overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell*. **15**: 439-477.

Anthony L. M., Mary S. A., Paul G. C. and Charles A. 2002. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in Plant Science*. **7** : 478-481.

Asada K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 601–639.

Allen J. P. and Williams J. C. 1998. Photosynthetic reaction centers. *FEBS Letters*. **438**: 5-9.

Appel H. and Hirt H. 2004. Reactive Oxygen Species**:** Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*. **55**:373–99.

Baptist F., Flahaut C., Streb P., Choler P. 2010. No increase in alpine snowbed productivity in response to experimental lengthening of the growing season. *Plant Biology*. **12,** 755-764.

Baker. N. R 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol*. 2008. 59:89–113

Batie C. and Kamin. H. **1984**. Electron transfer by ferredoxin:NADP+ reductase. Rapid-reaction evidence for participation of a ternary complex. *J. Biol. Chem*. **259:**11976–85.

Bernacchi C. J., Portis A. R., Nakano H., von Caemmerer S. and Long S. P. 2002. Temperature Response of Mesophyll Conductance. Implications for the Determination of Rubisco Enzyme Kinetics and for Limitations to Photosynthesis in Vivo. *Plant Physiology*. **130** :1992–1998.

Brodribb T. J. and Holbrook N. M. 2006. Declining hydraulic efficiency as transpiring leaves desiccate: two types of response. *Plant, Cell and Environment*. **29** :2205–2215.

Brodribb T. J., Holbrook N. M., Zwieniecki M. A. and Palma B. 2005. Leaf hydraulic capacity in ferns, conifers and angiosperms: impacts on photosynthetic maxima. New *phytologist* **165**: 839–846.

Brodribb T. J and Holbrook N. M. 2003. Stomatal Closure during Leaf Dehydration, Correlation with Other Leaf Physiological Traits. *Plant Physiology* .**132**: 2166-2173.

Brodribb T. J., Holbrook N. M. and Gutiérrez. 2002. Hydraulic and photosynthetic co-ordination in seasonally dry tropical forest trees. *Plant, Cell and Environment*. **25**: 1435-1444.

Bunce J. A. 2009. Use of the response of photosynthesis to oxygen to estimate mesophyll conductance to carbon dioxide in water-stressed soybean leaves. *Plant, Cell and Environment* **32**, 875–881.

Bunce J.A. 2008. Acclimation of photosynthesis to temperature in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*. Photosynthetica. **46:** 517–524.

Bongi G. and Loreto F. 1989 Gas-exchange properties of salt stressed olive (*Olea europaea* L.) leaves. *Plant Physiology*. **90:** 1408–1416.

Bates L. M. and Hall A. E. 1981. Stomatal closure with soil water depletion not associated with changes in Bulk leaf water status. *Oecologia*. **50**: 52-60.

Burrows P. A., Sazanov L. A., Svab Z., Maliga P. and Nixon P. J. 1998. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid ndh genes. *EMBO J.* **17**. 86996876.

Boursiac Y., Boudet J., Postaire O., Luu D.T., Tournaire-Roux C., Maurel C. 2008. Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *The Plant Journal.* **56**: 207-218.

Buckley T. N. and Mott K. A. 2002. Dynamics of stomatal water relations during the humidity response: implications of two hypothetical mechanisms. *Plant, Cell and Environment*. **25**: 407-419.

Barnett N. M. and Naylor A. W. 1966. Amino Acid and Protein Metabolism in Bermuda Grass During Water Stress. Plant Physiol. **41**:1222-1230.

Bongi G. and Loreto F. (1989) Gas-exchange properties of saltstressed olive (*Olea europaea L.*) leaves. *Plant Physiology*. **90:** 1408–1416.

Butler W. L. 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol*. **29**:345-78.

Bota J., Medrano H. and Flexas J. 2004. Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist* **162**: 671–681.

Brooks A. and Farquhar G. D. 1985. Effect of temperature on the CO_2/O_2 specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. *Planta*. *165*: 397-406.

Brangeon J., Sabar M., Gutierres S., Combettes B., Bove J., Gendy C., Chétrit P., Des Francs-Small C.C., Pla M., Vedel F. and De Paepe R. 2000. Defective splicing of the first nad4 intron is associated with lack of several complex I subunits in the *Nicotiana sylvestris* NMS1 nuclear mutant. *Plant J.* **21**: 269–280.

Ball M. C., Wolfe J., Canny M., Hofmann M., Nicotra A. B. and Hughes D. 2002. Space and time dependence of temperature and freezing in evergreen leaves. *Functional Plant Biology*. **29**: 1259–1272.

Bartoli C. G., Gomez F., Gergoff G, Guiame J. J. and Puntarulo S. 2004. Up-regulation of the mitochondrial alternative oxidase pathway enhances photosynthetic electron transport under drought conditions. *Journal of Experimental Botany*. 56:1269–1276.

Buchanan B.B., Gruissen W. and Jones R.L. (2002) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Soc. of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland USA, p. 1367.

Chow W. S. 2003. Photosynthesis: from natural towards artificial. *J. Biol. Phys*. **29**: 447-459.

Comstock J. P. 2002. Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany*. **53**: 195-200.

Charlton A. J., Donarski J. A., Harrison M., Jones S. A., Godward J., Oehlschlager S., Arques J. L., Ambrose M., Chinoy C., Mullineaux P. M. and Domoney C. 2008. Responses of the pea (*Pisum sativum L.*) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Metabolomics. **4**: 312-327.

Clarkson D. T., Carvajal M., Henzler T., Watehouse R. N., Smyth A. J., Cooke D. T. and Steudle N. 2000. Root hydrolique conductance: diurnal aquaporin expression and the effects of nutrient stress. *J. Exp. Bot.* **51**: 61-70.

Cardol P., De Paepe R., Franck F., Forti F. and Finazzi G. The onset of NPQ and $\Delta\mu_H^+$ upon illumination of tobacco plants studied through the influence of mitochondrial electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. **1797**. 177-188.

Cardol P., Matagne R. F. and Remacle C. 2002. Impact of Mutations Affecting ND Mitochondriaencoded Subunits on the Activity and Assembly of Complex I in Chlamydomonas. Implication for the Structural Organization of the Enzyme. *J. Mol. Biol.* **319**: 1211–1221.

Cornic G. 2000. Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - not by affecting ATP synthesis. *Trends in Plant Science*. **5**: 187-188.

Cornic G. and Massacci A. 1996. Leaf photosynthesis under drought stress. *In: Photosynthesis and the Environment* (ed. Baker N.R.), pp 347-366, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Cornic G. and Briantais J. M. 1991. Partitioning of photosynthesis elevctrons flow between CO2 and O2 reduction in a C3 leaf (*Phaseolus vulgaris L*) at different CO2 concentration and during drought stress. *Planta*. **183**: 178-184.

Cornic G., Gouallec J. L., Briantais J. M. Hodges M. 1989. Effect of dehydration and high light on photosynthesis of two C_3 plants (*Phaseolus vulgaris* L. and *Elatostema repens* (Lour.) Hall f.). *Planta*. **177**: 84-90.

Comstock J. P. 2002. Hydraulic and chemical signaling in the controle of stomatal conductance and transpiration. Journal of Experimental Botany. **53**: 195-200.

Cochard H., Nardini A. and Coll L. 2004. Hydraulic architecture of leaf blades: where is the main resistance? *Plant, Cell & Environment*. **27,** 1257–1267.

Cochard H., Venisse J.S., Barigah T.S., Brunel N., Herbette S., Guilliot A., Tyree M. T. and Sakr S. 2007. Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. Plant Physiology **143,** 122–123.

Coleman J. 2004. Carbonic Anhydrase and Its Role in Photosynthesis. *Advances in photosynthesis and respiration*. **9**: 353-367.

Canny M. J. 1990. What becomes of the transpiration stream? New Phytologist. **114**: 341-368.

Chaves M. M., Maroco J. P. and Pereira J. S. 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. Functional Plant Biology. **30**: 239-264.

Douce, R., and Neuburger, M. 1989. The uniqueness of plant mitochondria. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant MOI. Biol. **40** : 371-414.

Dutilleul C., **Lelarge C., Prioul J-L., De Paepe R., Foyer C. H., and Noctor G. 2005**. Mitochondria-Driven Changes in Leaf NAD Status Exert a Crucial Influence on the Control of Nitrate Assimilation and the Integration of Carbon and Nitrogen Metabolism. *Plant Physiol*. **139**, 64-78.

Dutilleul C. 2003. Répercussions d'un défaut mitochondrial sur les interactions subcellulaires dans le métabolisme foliaire: analyse d'un mutant respiratoire de *Nicotiana sylvestris*. *Thèse de Doctorat,* Université Paris Sud, Orsay, France. 196 p.

Dutilleul C., Garmier C., Noctor G., Mathieu C., Chétrit P., Foyer C. H. and De Paepe R. 2003a. Leaf mitochondria modulate whole cell redox homeostasis, set antioxidant capacity, and determine stress resistance through altered signaling and diurnal regulation. *Plant Cell* **15,** 1212-1226.

Dutilleul C., Driscoll S., Cornic G., Foyer C. H., De Paepe R. and Noctor G. 2003b. Functional Mitochondrial Complex I is required by Tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol.* **131,** 264-275.

Desikan R., Cheung MK., Bright J., Henson D., Hancock JT. and Neill SJ. 2004. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of Experimental Botany* **55**: 205-212.

Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S. 2002. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. **99**: 16314–16318.

Douce R., Bourguignon J., Neuburger M., Rébeillé F., 2001. The glycine decarboxylase system : a fascinating complex. *Trends Plant Sci*. **6**: 167-176.

Douce R, Heldt HW. 2000. Photorespiration. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S, eds. Photosynthesis: physiology and metabolism. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 115–136.

De Paepe R., Chétrit P., Vitart V., Ambard-Bretteville F., Prat D. and Vedel F. 1990. Several nuclear genes control both sterility and mitochondrial protein synthesis in *Nicotiana sylvestris* protoclones. *Molecular General Genetics* **222**: 206-210.

Di Marco G., Manes F., Tricoli D. & Vitale E. 1990. Fluorescence parameters measured concurrently with net photosynthesis to investigate chloroplastic CO2 concentration in leaves of *Quercus ilex* L. *Journal of Plant Physiology*. **136:** 538–543.

Demmig-Adams B 1990. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochim Biophys Acta*. **1020:** 1–24.

Djebbar R., Rzigui T., Pétriacq P., Mauve C., Priault P., Fresneau C, De PaepeM, Florez-Sarasa I., Kesri G. B., Streb P, Gakière B., Cornic G. and De Paepe R. (Soumis). Mitochondria can impact on drought tolerance in plants: 1 lessons from a *Nicotiana sylvestris* Complex I respiratory mutant. Planta.

Elstner E. F. 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity: *Annual review of plant physiology*. **33**:73-76.

Evans J. R. and Loreto F. 2000. Acquisition and diffusion of CO2 in higher plant leaves. In: Photosynthesis: physiology and metabolism, R.C. Leegood, T.D. Sharkey & S. Von Caemmerer (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 321-351.

Evans J.R. & von Caemmerer S. 1996. Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiology*. **110:**339–346.

Evan J. R ., von Caemmerer., Setchell. B. A., Hudson G. S. 1994. The relationship between CO_2 transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of Rubisco. *Australien Journal of Plant Physiology*. **21**: 575-495.

Evans J.R., Sharkey T.D., Berry J. A. and Farquhar G. D. 1986. Carbon isotope discrimination measured concurrently with gas exchange to investigate CO2 diffusion in leaves of higher plants. *Australian Journal of Plant Physiology*. **13:** 281–292.

Ethier G. J., Livingston N. J., Harrison D. L., Black T. A. and Moran J. A. 2006. Low stomatal and internal conductance to CO2 versus Rubisco deactivation as determinants of the photosynthetic decline of ageing evergreen leaves. *Plant, Cell and Environment.* **29**. 2168–2184.

Finazzi G., Johnson G. N., Dall'Osto L., Zito F., Bonente G., Bassi R. and Wollman F. A. 2006. Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii. Biochemistry*. **45**: 1490-1498.

Epron D., Godard D., Cornic G. and Genty, B. 1995. Limitation of net assimilation rate by internal resistance to CO2 transfer conductance in the leaves of two tree species (*Fagus sylvatica* L. and *Castanea sativa* Mill.). *Plant Cell. Environ.* **13**, 43 -51.

Farquhar G. D. and von Caemmerer, S. 1982. Modelling of photosynthetic response to environmental conditions. *In*: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. , editors; Lange.

Farquhar G. and Sharkey T.D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 317-345.

Farquhar G.D. 1979. Models describing the kinetics of ribulose biphosphate carboxylaseoxygenase. *Arch. Biochm. Biophys.* **193**: 456-468.

Farquhar G. D., O'Leary M. H. and Berry J. A. 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Aust. J. of Pl. Physiol.* **9**, 121–137.

Farquhar G. D., von Caemmerer S. and Berry J. A. 1980. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species**.** Planta, **149**, 78-90.

Flexas J., Ribas-Carbo M., Diaz-Espejo A., Galmes J. and Medrano H. 2008. Mesophyll conductance to CO2: current knowledge and future prospects. *Plant, Cell and Environment*. **31**:602–621.

Flexas J., Galmés J., Kaldenhoff R., Medrano H. and Ribas-Carbo M. 2007a. Rapide variations of mesophyll conductance in response to changes in CO2 concentration around leaves. *Plant Cell and Environment.* **30**: 1284-1289.

Flexas J., Diaz-Espejo A., Berry J., Cifre J., Galmes J., Kaldenhoff R., Medrano H. and Ribas-Carbo M. 2007b. Analysis of leakage in IRGA's leaf chambers of open gas exchange systems: quantification and its effects in photosynthesis parameterization. *Journal of Experimental Botany.* **58**:1533–1543.

Flexas J, Bota J, Galmes J, Medrano H, Ribas-Carbo M. 2006a. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*. 127: 343–352.

Flexas J., Ribas-Carbó M., Bota J., Galmés J., Henkle M., Martínez-Cañellas S. and Medrano H. 2006b. Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO2 concentration. *New Phytologist*. **172**: 73-82.

Flexas J., Ribas-Carbo M., Hanson D. T., Bota J., Otto B., Cifre J., McDowell N., Medrano H. L. and Kaldenhoff R. 2006c. Tobacco aquaporin NtAQP1 is involved in mesophyll conductance to CO2 in vivo. *The Plant Journal*. **48**: 427–439.

Flexas J., Galmes J., Ribas-Carbo M. and Medrano H. 2005. The effects of drought in plant respiration. In: Lambers H, Ribas-Carbo M, eds. Plant respiration: from cell to ecosystem. Advances in photosynthesis and respiration series, Vol. 18. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 85–94.

Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G., Sharkey T. D. 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*. 6: 269–279.

Flexas J. and Medrano H. 2002. Drought inhibition of Photosynthesis in C_3 Plants: Stomatal and Non stomatal Limitations Revisited. *Annals of botany*. **89**: 183-189.

Flexas J., Escalona J. M. and Medrano H. 1999. Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant, Cell and Environment.* **22** :39–48.

Foyer H. C. and Noctor G. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Response. The Plant Cell. 17: 1866-1875.

Foyer CH., Descourvières P. and Kunert K. J. 1994 . protection against radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, cell and Environment*. 17:507-523.

Finazzi G., Giles N. J., Dall'Osto L.,| Zito F., Bonente G., Bassi R,| and Francis-Andre W. 2006. Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii. Biochemistry***. 45**:1490-1498.

Fresneau C., Ghashghaie J., Cornic G. 2007. Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in wheat (*Triticum durum* L.): role of leaf internal CO_2. *Journal of Experimental Botany*. **58**:2983-2992.

Gutierres S., Combettes B., De Paepe R., Mirande M., Lelandais C., Vedel F. and Chétrit P. 1999. In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5_ to the first exon of the mitochondrial *nad1* gene is associated to lack of the NADHubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit. *Eur. J. Biochem.* **261**: 361–370.

Guttierres S, Sabar M., Lelandais C., Chetrit P., Diolez P., Degand H., Boutry M.,Vedel F., DE Kouchkovsky Y. and De Paepe R. 1997. Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** :3436–3441.

Galle A, Florez-Sarasa Igor., Thameur A., Rosine de Paepe R., Flexas J and Ribas-Carbo M. 2010. Effects of drought stress and subsequent rewatering on photosynthetic and respiratory pathways in Nicotiana sylvestris wild type and the mitochondrial complex I-deficient CMSII mutant. *Journal of Experimental Botany*. **61**: 765–775.

Galmés J., Miquel Ribas-Carbo M., Medrano H and Flexas J. 2011. Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO2 concentration under water stress. *Journal of Experimental Botany*. **62**:653–665.

Galmés J., Medrano H. And Flexas J. 2007. limitations in response to water stress and recovery in Mideterranean plants with different growth forms. *New Phytologist*. **175**:81-93.

Galmés J., Medrano H. and Flexas J. 2006. Acclimation of Rubisco specificity factor to drought in tobacco: discrepancies between in vitro and in vivo estimations. *Journal of Experimental Botany*. **57** :3659–3667.

Galmés J., Ribas-Carbo M., Medrano h and Flexas J., 2001. Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO2 concentration under water stress. *Journal of Experimental Botany*. **62** :653–665.

Gerhardt B. and Beevers H. 1968. Influence of sucrose on protein determination by the Lowry procedure. *Analytical Biochemistry*. **24:** 337-339.

Garmier M., Dutilleul C., Matthieu C., Chétrit P., Boccara M. and De Paepe R. 2003. Changes in antioxidant expression and harpin induced hypersensitive response in a *Nicotiana sylvestris* mitochondrial mutant. *Plant Physiol. Biochem*. **40**, 561-566.

Garcia-Matta C., Lamattina L., 2003. Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science*. **8** : 20-27.

Garcia-Matta C., Lamattina L., 2002. Nitric Oxide and Abscisic Acid Cross Talk in Guard Cells. *Plant physiology*. **128**: 790-792.

Garcia-Matta C., Lamattina L., 2001. Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress. *Plant Physiology*. 126: 1196-1204.

Gilmore A. M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plant*. **99:** 197–209.

Grassi G. and Magnani F. 2005. Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, Cell and Environment.* **28**, 834–849.

Gimenez C., Mitchell V. J. and Lawlor D. W. 1992. Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiol.* **98,** 516–524.

Hoefnagel M. H. N., Atkin O. K. and Wiskich J. T. 1998. Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics. **1366**: 235–255.

Hartung W, Sauter A and Hose E. 2002. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *Journal of Experimental Botany*. **53**: 27–33.

Hubbard R. M., Ryan M. G., Stiller V., Sperry J. S. 2001. Stoamtal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. *Plant, Cell and Environnement*. **24**: 113-121.

Hopkins W.G. 1995. Introduction to plant physiology. John Wiley and Sons. New York.

Hager A. and Holocher K 1994. Localization of the xanthophyll-cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease. *Planta* **192:** 581–589.

Hetherington A.M., Woodward F. L. 2003. The role of stomatat in sensing and driving environmental change. *Nature*. **424**:901-908.

Harley P.C., Loreto F., Di Marco G. and Sharkey T.D. 1992. Theoretical considerations when estimating the mesophyll conductance to CO2 flux by the analysis of the response of photosynthesis to CO2. Plant Physiology. **98:** 1429–1436.

Harley P. C. and Sharkey T. D. 1991. An improved model of C3 photosynthesis at high CO2: reversed O2 sensitivity explained by lack of glycerate reentry into the chloroplast. *Photosynthesis Research.* **27:** 169–178.

Hubbard R.M., Ryan M.G., Stiller V. and Sperry J.S., 2001. Stomatal conductance and photosynthesis. Plant, Cell and Environment. **24**: 113-121.

Heber. and Walker D. 1992. Concerning a Dual Function of Coupled Cyclic Electron Transport in Leaves. Plant Physiol. 100:1621-1626.

Ivor R. E., Jody J. H., Harold G. W., William P. M. and David H. T. 1988. Interactions between Photosynthesis, Respiration, and Ammonium Assimilation in N-Limited Green Algae. *Plant Physiology* 87:395-401.

Igamberdiev A. U., Bykova N. V., Lea P. J. and Gardeström P. 2001. The role of photorespiration in redox and energy balance of photosynthetic plant cells: a study with a barley mutant deficient in glycine decarboxylase. *Physiol. Plant*. **111**: 427–438.

Jones H. G. Jones M. B. 1989. Introduction : Some terminology and common stress. Cambridge University press, pp. 1-10.

Jiang F. and Hartung W. 2008. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany*. **59**:37–43.

Jordan D. B. and Orgen W. L. 1984. The CO_2/O_2 specificity of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. Plantan. 161: 308-313.

Karakas B., Ozias-Akins P., Stushnoff C., Suefferheld M. and Rieger M.1997. Salinity and drought tolerance of mannitol-accumulating transgenic tobacco. Plant Cell Environ **20**: 609-616

Katsuhara M. **2007**. Molecular mechanisms of water uptake and transport in plant roots: research progress with water channel aquaporins. *Plant root*. **1**: 22-26.

Kiyosue T., Yoshiba Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **8**: 1323–1335.

Kautsky H. and Hirsh A. 1931. Neue Versuche zur Kohlensaüreassimilation. *Naturwissenschaften* **19**, 964.

Krause GH., Vernotte C. and Briantais J. M. 1982. Photoinduced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae. Resolution into two components. *Biochim. Biophys. Acta.* **679**:116–24.

Kro¨mer, S. 1995. Respiration during photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 46, 45–70.

Koide R. T., Robichaux R. H., Morse S. R. and Smith C M. **1989**.Plant status, hydraulic resistance and capacitance. Plant physiological ecology: field methods and instrumentation. 161-183.

Kaiser W. M. 1987. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. *Physiologia Plantarum*. **71**: 142-149.

Khan S., Andralojc P. J., Parry M. A. 1999. 2-carboxy-D-arabitinol 1-phosphate protects ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase against proteolytic breakdown. *Eur. J. Biochem*. *266*: 840-847.

Laisk A. K. 1977. Kinetics of photosynthesis and photorespiration in C3-plants. Nauka, Moscow (in Russian).

Laing W. A., Ogren W. L., Ogren W. L., Hageman R. H. 1974. Regulation of soybean net photosynthetic CO2 fixation by the interaction of CO2, O2 and ribulose-1,5-biphosphate carboxylase. *Plant Physiology*. 55: 678-685.

Lawlor D.W., 2002. Limitation to photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the role of the ATP. *Annals of Botany*. 89: 871-885.

Lawlor D. W and Fock H. 1977. Water stress induced changes in the amounts of some photosynthetic assimilation products and respiratory metabolites of sunflower leaves. Journal of Experimental Botany. **28**: 329–337.

Lambers H., Chapin F. S. and Pons T. L. 2008. Plant physiological ecology, Second edition. New York: Springer.

Lambers H. 1982. Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarum*. 55: 478-485.

Lal A., Ku M. S. B., Edwards G. E., 1996. Analysis of inhibition of photosynthesis due to water stress in the C_3 species *Hordeum vulgare* and *Vicia faba*: Electrons transport, CO_2 fixation and capacity of carboxylation. *Photosynthesis Research*. **49**: 57-69.

Lelandais C., Albert B., Gutierres S., De Paepe R., Godelle B., Vedel F., and Chetrit P. 1998. Organization and expression of the mitochondrial genome in the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant. *Genetics*. **150**: 873-882. 49: 57-69.

Liang Z., Zhang F., Shao M. and Zhang J. 2002. The relations of stomatal conductance, water consumption, growth rate to leaf water potential during soil drying and rewatering cycle of wheat (*Triticum aestivum*). *Bot. Bull. Acad. Sin*. **43:** 187-192

Lian H. L., Yu X., Ye Q., Ding X. S., Kitagawa Y., Kwak S., Su W. A. and Tang Z. C. 2004. The Role of Aquaporin RWC3 in Drought Avoidance in Rice. *Plant and Cell Physiology*. **45**: 841-849.

Lichtenhaler H. K., and Babani F. 2004. Light adaptation and senescence of the photosynthetic appartus. Changes in pigment composition, chlorophyll fluorescence parameters and photosynthetic activirty. In: chlorophyll fluorescence: a signature of photosynthetis, G. C. Papageorgiou & Govindjee (eds). Springer, Dordrecht, 713-736.

Long S. P. and Bernacchi C. J. 2003. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *Journal of Experimental Botany***. 54**:2393 – 2401.

Loreto F., Harley P. C., Di Marco G. and Sharkey T. D. 1992. Estimation of mesophyll conductance to CO2 flux by three different methods. *Plant Physiology*. **98:** 1437–1443.

Lloyd J., Syvertsen J. P., Kriedemann P. E. and Farquhar G. D. 1992. Low conductances for CO2 diffusion from stomata to the sites of carboxylation in leaves of woody species. *Plant, Cell & Environment* **15:** 873–899.

Li X.Q., Chétrit P., Matthieu C., Vedel F., De Paepe R., Remy R. and Ambard-Bretteville F. 1988. Regeneration of cytoplasmic male sterile protoclones of *Nicotiana sylvestris* with mitochondrial variations. *Curr. Genet.* **13**: 261-266.

Marienfeld J. R. and Newton K. J. 1994. The maize NCS2 abnormal growth mutant has a chimeric *nad4- nad7* mitochondrial gene and is associated with reduced complex I function. *Genetics.* **138**: 855-863.

Møller I. M. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 561-591.

Moller M., Rasmusson A. G. 1998. The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends in Plant Science.* **3**: 21-27.

Maurel C. and **Chrispeels M**. **J**. **2001**, A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol*. *125*: 135-138.

Maurel C. **1997**. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:399-429.

Murata N., Takahashi S., Nishiyama Y., Allakhverdiev S. I. 2007. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1767**: 414–421.

Muller P., Li X.P., and Niyogi K. K., 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*. **125** : 1558-1566.

Meinzer F. C. 2002. Co-ordination of vapour and liquid phase water transport properties in plants. *Plant, Cell and Environment*. **25**: 265-274.

Medrano H., Escalona J. M., Bota J., Gulias J. and Flexas J. 2002. Regulation of Photosynthesis of C_3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany*. **89**: 895-905.

Meyer C., Lea U. S., Provan F., Kaiser W. M., and Lillo C. 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynthesis Research*. **83**: 181-189.

Morillon R., Chrispeeels M. J. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. *PNAS*. **98**: 14138–14143**.**

Matagne, R. F., Michel-Wolwertz M. R., Munaut. C., Duyckaerts C. and Sluse. F. 1989. Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol*. **108:** 1221–1226.

Mattsson M., Häusler R. E., Leegood R. C., Lea P. J. and Schjoerring J. K. 1997. Leaf-atmosphere NH3 exchange in barley mutants with reduced activities of glutamine synthetase. *Plant Physiology* **114,** 1307–1312.

Newton K.J., Knudsen C., Gabay-Laughnan S. and Laughnan J.R. (1990). An abnormal growth mutant in maize has a defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell.***2**: 107-113.

Noctor G., De Paepe R. and Foyer C. H. 2007a. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*. **12**: 125-134.

Noctor G., Bergot G., Thominet D., Mauve C., Lelarge-Trouverie C. and Prioul J. L. 2007b. A comparative study of amino acid analysis in leaf extracts by gas chromatography–time of Xight-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography with Xuorescence detection. *Metabolomics*. **3**:161–174.

Noctor G., Arisi A., Jouanin L. and Foyer C. 1999. Photorespiratory glycine enhances glutathione accumulation in both the chloroplastic and cytosolic compartments. *J. Exp. Bot.* **50**: 1157-1167.

Noctor G., Arisi A., Jouanin L., Kunert K., Rennenberg H., and Foyer C. 1998a. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot*. **49**: 623-647.

Noctor G. and Foyer C.H. 1998b. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**:249-279.

Nardini A., Gortan E., Ramani M. and Salleo S., 2008. Heterogeneity of gas exchange rates over the leaf surface in tobacco: an effect of hydraulic architecture? *Plant, Cell and Environment.* **31**, 804–812.

Nardini A., Tyree M. T., and Salleo S. 2001. Xylem Cavitation in the Leaf of *Prunus laurocerasus* and Its Impact on Leaf Hydraulics. *Plant Physiology*. **125** :1700–1709.

Nardini A., Gortan E. and Salleo S. 2005. Hydraulic efficiency of the leaf venation system in sun- and shade-adapted species. *Functional Plant Biology* **32,** 953–961.

Nardini A. and Salleo S. 2005. Water stress-induced modifications of leaf hydraulic architecture in sunflower: co-ordination with gas exchange. *Journal of Experimental Botany* **56,** 3093–3101.

Nogues S., Munne-Bosch S., Casadesus J., Lopez-Carbonell M. and Alegre L. 2001. Daily time course of whole-shoot gas exchange rates in two drought exposed Mediterranean shrubs. *Tree Physiology*. **21**: 51–58.

Pastore D., Trono D., Laus M. N., Di Fonzo N. and Flagella Z. 2007. Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *Journal of Experimental Botany*. **58**: 195-210.

Pastore D., Di Pede S and Passarella S. 2003. Isolated durum wheat mitochondria and potato cell mitochondria oxidize externally added NADH mostly via the malate/oxaloacetate shuttle with a rate that depends on the carrier-mediated transport. *Plant Physiology*. **133**:2029–2039.

Passioura. J. B. 1982. Water in the soil-Plant-Atmosphere Continuum. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series, Vol. 12B (Eds O.L.. Lange P.S. Nobel C.B. Osmond H. Ziegler) Springer-Verlag., Berlin, pp. 5-33.

Pla M., Mathieu C., De paepe R., Chétrit P. and Vedel F. 1995. Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad7* gene results in lack of the NAD7 polypeptide in a*Nicotiana sylvestris* CMS mutant. *Molecular and General Genetics*. **248**:79-88.

Pineau B., Mathieu C., Gerard-Hirne C., De Paepe R. and Chétrit P. 2005. Targeting the NAD7 subunit to mitochondria restores a functional complex I and a wild type phenotype in the *Nicotiana sylvestris* CMS II mutant lacking nad7. *J Biol. Chem*. **280**: 25994-26001.

Priault P., Vidal G., De Paepe R. and Ribas-Carbo M. 2007. Leaf age-related changes in respiratory pathways are dependent on complex I activity in *Nicotiana sylvestris. Physiologia Plantarum*, **129**, 152-162.

Priault. P, 2006: Interactions mitochondries / chloroplastes au cours de la photosynthèse et de la réponse aux stress chez Nicotiana sylvestris.

Priault P, Fresneau C, Noctor G, de Paepe R, Cornic G, Streb P. 2006a. The mitochondrial CMSII mutation of Nicotiana sylvestris impairs adjustment of photosynthetic carbon assimilation to higher growth irradiance. *Journal of Experimental Botany:* **57**, 2075–2085.

Priault P., Tcherkez G., Cornic G., de Paepe R., Naik R., Ghashghaie J. and Streb P. 2006b. The lack of mitochondrial complex I in a CMSII mutant of Nicotiana sylvestris increases photorespiration through an increased internal resistance to CO2 diffusion. Journal *of Experimental Botany* **57**, 3195–3207.

Parry MAJ., Andralojc P. J., Mitchell RAC., Madgwick P. J. And Keys A. J. **2003**. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. *Journal of Experimental Botany*. 54: 1321-1333.

Padmasree K., Padmavathie L. and Raghavendra L. S. 2002. Essentiality of Mitochondrial Oxidative Metabolism for Photosynthesis: Optimization of Carbon Assimilation and Protection Against Photoinhibition. Critical *Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **37**: 71-119.

Powles S. B. Thorne S. W. 1981. Effect of high-light treatments in inducing photoinhibition of photosynthesis in intact leaves of low-light grown *Phaseolus vulgaris* and *Lastreopsis microsora. Planta.* **152**: 471-477.

Peeva V. and Cornic. G. 2009. Leaf photosynthesis of *Haberlea rhodopensis* before and during drought. *Environmental and Experimental Botany*. 65: 310-318.

Perez-Martin A, Flexas J, Ribas-Carbo M., Bota J.,Toma M., Infante J. M and Diaz-Espejo A. 2009. Interactive effects of soil water deficit and air vapour pressure deficit on mesophyll conductance to CO2 in Vitis vinifera and Olea europaea. *Journal of Experimental Botany*. **60** :2391–2405.

Pons T. L., Flexas J., von Caemmerer S., Evans J.R., Genty B., Ribas-Carbo M. and Enrico Brugnoli E. 2007. Estimating mesophyll conductance to CO2: methodology, potential errors, and recommendations. *Journal of Experimental Botany*: **60** : 2217–2234.

Porra R. J., Thompson W. A. and Kriedemann P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. et Biophys. Acta.* **975:** 384-394.

Portis A. R. 1992. Regulation of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Activity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **43** : 415-437.

Robinson S. P. and Portis A. R. 1988. Release of the nocturnal inhibitor, car□yarabinitol-1 - phosphate, from ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase by rubisco activase. *FEBS Letters*. **233**: 413-416.

Ridolfi M., Fauveau M. L., Label P., Garrec J. P. and Dreyer E. 1996. Response to water stress in an ABA unresponsive hybrid poplar (Populus koreana X trichocarpa cv. Peace). I Stomatal function. *New Phytologist*. **134**: 445-454.

Raghavendra A. S. and Padmasree K. 2003. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends in Plant Science*. **8**: 546-553.

Raghavendra. A.S., Padmasree. K and. Saradadevi. K. 1994. Interdependence of photosynthesis and respiration in plant cells: interactions between chloroplasts and mitochondria. *Plant Science*. **97**: 11-14.

Remacle C., Baurain D., Cardol P., and Matagne R. F. 2001. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Deficient in Mitochondrial Complex I: Characterization of Two Mutations Affecting the *nd1* Coding Sequence. *Genetics*. **158**: 1051–1060.

Rawson H M. 1979. Vertical wilting and photosynthesis, transpiration, and water use efficiency of sunflower leaves. *Aust J Plant Physio.l* **6**: 109-120.

Ribas-Carbo M., Taylor N. L., Giles L., Busquets S., Finnegan P. M., Day D. A., Lambers H., Medrano H., Berry J. A. and Flexas J. 2005. Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiology*. **139**: 466–473.

Ribas-Carbo M., Lennon A. M., Robinson S. A., Giles L., Berry J. A. and Siedow J. N. 1997. The regulation of electron partitioning between the cytochrome and alternative pathways in soybean cotyledon and root mitochondria. *Plant Physiology*. **113**. 903–911.

Ribas-Carbo M, Berry JA, Yakir D, Giles L, Robinson SA,Lennon AM, Siedow JN. 1995. Electron partitioning between the cytochrome and alternative pathways in plant-mitochondria. *Plant Physiology*. **109**, 829–837.

Rivero R. M., Shulaev V. and Blumwald E. 2009. Cytokinin-Dependent Photorespiration and the Protection of Photosynthesis during Water Deficit. *Plant Physiology*. **150** :1530–1540.

Ricardo A, Antonio F, Paolo V, Maarteen J. C, 2006. Drought, abscisic acid and transpiration rate effects on the regulation of PIP aquaporin gene expression and abundance in *Phaseolus vulgaris* Plants. *Annals of Botany*. **98**: 1301-1310.

Rasmusson A. G., Soole K. L. and Elthon T. E. 2004. Alternatives NAD(P)H Deshydrogenases of Plant Mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol*. **55**: 23-39.

Rasmusson A. G., Heiser V., Zabaleta E., Brennicke A. and Grohmann L. 1998. Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. **1364**: 101-111.

Radin J.W., Ackerson R.C. 1981. Water Relations of Cotton Plants under Nitrogen Deficiency III. Stomatal conductance, photosynthesis, and abscissic acid accumulation during drought. *Plant Physiol*. **67**:115-119.

Röbbelen G. 1957. Untersuchungen An Strahleninduzierten Blattfarbmutanten Von *Arabidopsis Thaliana* (L) Heynh. Molecular and General Genetics MGG. 88: 189-252.

Siedow. J. N, Umbah. Ann. L. 1995. Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. The Plant Cell. **7**: 821-831.

Salleo S., Nardini A., Pitt F. and Lo Gullo M. A. 2000. Xylem cavitation and hydraulic control of stomatal conductance in laurel (*Laurus nobilis* L.). *Plant, Cell & Environment.* **23.** 71–79.

Suleyman I. A and Norio M. 2004. Environmental stress inhibits the synthesis de novo of proteins involved in the photodamage–repair cycle of Photosystem II in Synechocystis sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica*. **1657**: 23– 32.

Sauter A., Davies W. J. and Hartung W. 2001. The long-distance abscissic acid signal in the droughted plant: The fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany*. **52**: 1991-1997.

Sack L., Tyree M.T. and Holbrook N. M. 2005. Leaf hydraulic architecture correlates with regeneration irradiance in tropical rainforest trees. *The New Phytologist* **167,** 403–413.

Sabar M., De Paepe R. and De Kouchkovsky Y., 2000. Complex I Impairment, Respiratory Compensations, and Photosynthetic Decrease in Nuclear and Mitochondrial Male Sterile Mutants of *Nicotiana sylvestris*. *Plant Physiol*. **124**: 1239-1250.

Schreiber U., Schliwa U. And Bilger W. 1986. Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. Photosynthesis research. **10**: 51-62.

Sharkey T. D. 1988. Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiol. Plant.* **73**. 147-152.

Sharkey T. D., Vassey T. L., Vanderveer P. J. and Vierstra R. D. 1991. Carbon metabolism enzymes and photosynthesis in transgenic tobacco (*Nicotiana tabaccum* L.) having excess phytochrome. *Planta* **185,** 287–296.

Sperry J. S and Tyree M. T. 1988. Mechanism of Water Stress-Induced Xylem Embolism. *Plant Physiol*. **88** : 581-587.

Slatyer R O. and Taylor S A. 1960. Terminology in plant- and soil-water relations. *Nature*. **187**: 922-924.

Slatyer R O. 1967. Plant-water relationships. Academic Press, London New York.

Sperry J. S. , Tyree M. T . , Donnelly J. R. 1988. Vulnerability of xylem to embolism in a mangrove vs an inland species of Rhizophoraceae . *Physiol. Plant*. **74**:276-83

Steudle E. and Peterson C. A. 1998. How does water get through roots? *Journal of experimental Botany*. **49**: 775-785.

Steudle E. 1992. The biophysics of plant water: compart-mentation, coupling with metabolic processes, and water flow in plant roots. In: Somero CN, Osmond CB, Bolis CL, eds. Water and life. Comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular, and molecular levels. Berlin: Springer-Verlag, 173–204.

Singsaas E. L., Ort D. R. Delucia E. H. 2003. Elevated CO2 effects on mesophyll conductance and its consequences for interpreting photosynthetic physiology. *Plant, Cell and Environment.***27** *:*41–50.

Streusand V. J. and Portis A. R. 1987. Rubisco Activase Mediates ATP-Dependent Activation of Ribulose Bisphosphate Carboxylase. *Plant Physiol*. 85:152-154.

Tenhunen J. D., Lange O. L., Gebel J., Beyschlag W. and Webr J.A. 1984. Changes in photosynthetic capacity, carboxylation efficiency, and CO_2 compensation point associated with midday stomatal closure and midday depression of net CO_2 exchange of leaves of *Quercus suber. Planta.* **162***:* 193-203.

Tyree M. T., Nardini A., Salleo S., Sack L. and El Omari B. 2005. The dependence of leaf hydraulic conductance on irradiance during HPFM measurements: any role for stomatal response? *Journal of Experimental Botany* **56,** 737–744.

Tyree M. T. and Sperry J. S. 1989. Vulnerability of xylem to cavitation and embolism. *Annu. Rev. Plant Phys. Mol. Bio.* **40**:19-38.

Tyree M. T. and Jarvis P. G. 1982. Water in tissues and cells. In Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 12B (eds O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler), Springer-Verlag, Berlin, pp. 35-77.

Tyree M. T., Cheung Y. N. S. 1977. Resistance to water flow in *Fagus grandifolia* leaves. *Revue canadienne de botanique*. **55** : 2591-2599.

Tyree M. T. and Hammel H. T. 1972. The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. *J Exp Bo.t* **23:** 267–282.

Trumpower, B. L., and Gennis, R. B. 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu. Rev. Biochem*. **63,** 675-716.

Turner N, C., P. J. Kramer (eds). 1980. Adaptataion of plants to water and high temperature stress. New York: Wiley.

Taiz L. and Zeiger E. 2002. Plant Physiology. 3rd ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, 427 p.

Tyerman S. D., Bohnert H., Maurel C., Steudle E., Smith JAC., 1999. Plant aquaporin: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. *J. Exp. Bot* : **50**: 1055-1071.

Trejo C. L., Davies W. J. and Ruiz LdMP. 1993. Sensitivity of Stomata to Abscisic Acid (An Effect of the Mesophyll). *Plant Physiology*. **102**: 497-502.

Trejo C.L. and Davies W. J. 1991. Drought-induced Closure of *Phaseolus vulgaris* L. Stomata Precedes Leaf Water Deficit and any Increase in Xylem ABA Concentration. *Journal of Experimental Botany***. 42**: 1507-1516.

Tcherkez G. D. Farquhar G. D., Andrews T. J. 2006. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *PNAS*. **103**: 7246-7251.

Tcherkez G., Cornic G., Bligny R., Gout E. and Ghashghaie J. 2005. In Vivo Respiratory Metabolism of Illuminated Leaves. *Plant Physiology*. **138**: 1596-1606.

Tezara W., Mitchell V. J., Driscoll S. D. and Lawlor. D. W. 1999. Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. *NATURE*. **401** :914-917.

Takahashi S. and Murata N. 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*. **13**: 178-182.

Uehlein N., Otto B., Hanson DT., Fischer M., McDowell N. and Kaldenhoff R. 2008. Function of Nicotiana tabacum Aquaporins as Chloroplast Gas Pores Challenges the Concept of Membrane CO2 Permeability. The Plant Cell.**20**: 648–657.

Uehlein N., Lovisolo C., Franka S. F. and Kaldenhoff R. 2003. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO_2 pore with physiological functions. *Nature*. **425***:* 734-737.

Vanlerberghe G. C. and McIntosh L. 1997. alternative oxidase: From Gene to Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. **48**:703–34

Valentini R., Epron D., De Angelis P., Matteuci G. and Dreyer E. 1995. In situ estimation of net CO^2 assimilation, photosynthetic electron flow and photorespiration in Turkey oak (Q. cerris L.) leaves: diurnal cycles under different levels of water supply. *Plant, Cell & Environment*, **18**. 631-640.

Van Caemmerer S. 2000. Biochemical Models of Leaf Photosynthesis, Techniques in Plant Sciences No. 2. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.

von Caemmerer S, Evans JR. 1991. Determination of the average partia1 pressure of CO_2, in chloroplasts from leaves of severa1 C_3 plants. *Aust J Plant Physiol*. **18**: 287-305.

von Caemmerer S. and Farquhar G. D. 1981. Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 376–387.

Vidal G., Ribas-Carbo M., Garmier M., Dubertret G., Rasmusson A. G., Mathieu C., Foyer C. H. and De Paepe R. 2007. Lack of Respiratory Chain Complex I Impairs Alternative Oxidase Engagement and Modulates Redox Signaling during Elicitor-Induced Cell Death in Tobacco. *The Plant Cell*. **19**: 640–655.

Wingler A., Lea P. J., Quick W. P. and Leegood R. C. 2000. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **355**: 1517–1529.

Wingler A, Quick WP, Bungard RA, Bailey KJ, Lea PJ, Leegood RC 1999. The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant Cell Environ*. **22**: 361–373.

Wilkinson S. Davies W. J. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant, Cell and Environment*. **33**: 510-525.

Wilkinson S. and Davies W. J. 2002. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*. **25**: 195-210.

Warren C. R. 2008. Soil water deficits decrease the internal conductance to CO2 transfer but atmospheric water deficits do not. *Journal of Experimental Botany*. **59**: 327–334.

Walker J. E., Arizmendi J. M., Dupuis A., Fearnley I. M., Finel M., Medd S. M., Pilkington S. J., Runswick M. J. and J. Skehel M. 1992. Sequences of 20 subunits of NADH: Ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria: Application of a novel strategy for sequencing proteins using the polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Biology*. **226**: 1051-1072.

Xue X., Gauthier D. A., Turpin D. H., and H. G. Weger H. G., 1996: Interactions between Photosynthesis and Respiration in the Green Alga Chlamydomonas reinhardtii (Characterization of Light-Enhanced Dark Respiration)**.** *Plant Physiol*. **112**: 1005–1014

Yokota A. and Kitaoka S.1985. Correct pK values for dissociation constant of carbonic acid lower the reported km values of ribulose bisphosphate carboxylase to half. Presentation of a

nomograph and an equation for determining the pK values. **Biochemica and Biophysica research communications**. **31**: 1075- 1079.

Yamato K. T., and Newton K. J. 1999. Heteroplasmy and homo- plasmy for maize mitochondrial mutants: a rare homoplasmic *nd4* deletion mutant plant. *J. Heredity***: 90:** 369–373.

Yoshida K., Terashima I. Noguchi K. 2007. Up-Regulation of Mitochondrial Alternative Oxidase Concomitant with Chloroplast Over-Reduction by Excess Light. *Plant and Cell Physiology*. **48**: 606-614.