

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Mentouri, Constantine
Faculté de Biologie
Département de Biologie Végétale et Ecologie

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de magistère en Biotechnologies Végétales
(Ecole Doctorale)

Thème

**Analyse de la variabilité de la réponse au stress hydrique chez des
lignées recombinantes de Tournesol**

(*Helianthus annuus* L.)

Présenté par: **TEMAGOULT Mahmoud**

Soutenue le : / / 2009 devant le jury:

| | | |
|--------------------|-------------------------------|--|
| Président: | Mr DJEKOUN Abdelhamid | Prof. Université Mentouri, Constantine |
| Rapporteur: | Mlle YKHLEF Nadia | Prof. Université Mentouri, Constantine |
| Examineur: | Mr BOUDJENIBA Messaoud | M.C. ENS Kouba Alger |
| Examineur: | Mme BOUDOOUR Leila | M.C. Université Mentouri Constantine |

Remerciements :

Au terme de ce travail, je voudrai d'abord exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à Mlle YEKHLEF Nadia, Professeur à l'université Mentouri Constantine qui m'a fait profiter de sa riche expérience et à bien voulu diriger ce travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à toute l'équipe du laboratoire biochimie génétique et biotechnologies végétales et en particulier à Mr BELBEKRI Nadir pour son assistance permanente.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi au président et aux membres du jury qui me feront l'honneur d'évaluer mon travail.

Toute ma gratitude à mes collègues de promotion ainsi qu'à d'autres étudiants.

De peur d'oublier des noms, je remercie tous ceux qui m'ont aidé de loin ou de près pour la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail à mes chers parents, à mes frères et sœurs et à toute ma famille.

Analyse de la variabilité de la réponse au déficit hydrique chez des lignées recombinantes de tournesol

Résumé :

Le but de ce travail est d'étudier la variabilité de la réponse au déficit hydrique chez des lignées recombinantes de tournesol par études de paramètres physiologiques, morphologiques et biochimiques.

Dans un premier temps, on a cherché à distinguer dans une population de 100 génotypes de tournesol ceux qui sont résistants de ceux qui sont sensibles par étude de quelques paramètres physiologiques. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une grande variabilité dans le comportement des différentes lignées de cette population sous condition de manque d'eau. Ainsi on a pu distinguer trois groupes : un groupe de génotypes tolérants au stress hydrique, un groupe de sensibles et un autre de très sensibles.

La deuxième partie part des résultats de la première et consiste en une étude comparative de quelques paramètres morphologiques et biochimiques relatifs à la croissance sous contrainte hydrique artificielle stimulée *in vitro* par le PEG chez des génotypes qui ont été choisis en fonction de leur tolérance ou sensibilité vis-à-vis le déficit hydrique. Les résultats obtenus montrent que la tolérance au stress est en grande partie due au degré de développement du système racinaire. La comparaison des profils SDS-PAGE montrent que le manque d'eau réprime la majorité de protéines, d'autres sont partiellement inhibées alors que d'autres sont induites mais pas de bandes exprimées spécialement chez les génotypes tolérants.

Mots clés : Tournesol, lignées recombinantes, sécheresse, physiologie, morphologie, SDS-PAGE.

الملخص

إن الهدف من هذا العمل هو دراسة تنوع التجاوب مع الجفاف عند سلالات نقية من عباد الشمس بواسطة المعطيات الفيزيولوجية المورفولوجية و البيوكيميائية.

لقد قمنا أولاً بالبحث عن السلالات المقاومة و الحساسة في مجموعة من مئة سلالة بواسطة دراسة المعطيات الفيزيولوجية. لقد دلت النتائج المتحصل عليها على تنوع كبير في السلوك تحت ظروف الجفاف عند هذه المجموعة و استطعنا تقسيمها إلى ثلاثة فئات. الفئة المقاومة للجفاف الفئة الحساسة و الفئة الجذ حساسة

الجزء الثاني من هذا العمل يهتم بالمقارنة بين بعض السلالات التي اختيرت بناء على النتائج المحصل عليها في الجزء الأول و ذلك بزرها في الأنابيب و إثارة الجفاف بال 600PEG. إن دراسة النمو تحت ظروف الجفاف تدل على أن مقاومة الجفاف متصلة إلى حد كبير بدرجة تطور الجهاز الجذري. مقارنة الهجرة الكهربائية للبروتينات الورقية تدل على أن الجفاف أدى إلى إنهاء إنتاج العديد من البروتينات و انقص من بعضها و أثار فئة أخرى لكن لا وجود لبروتينات منتجة خصيصاً عند السلالات المقاومة للجفاف.

الكلمات المفتاحية

عباد الشمس. سلالات نقية. جفاف. فيزيولوجيا . مورفولوجيا SDS-PAGE .

Study of drought response variability in sunflower recombined inbred lines

Abstract:

The aim of this study is the characterization of the drought response in a population of sunflower recombined inbred lines by a physiological, morphological and biochemical approach.

In a first time, we have tried to distinguish in 100 sunflower genotypes those which are resistant and those which are sensible by studying various physiological traits. Considerable variation between genotypes was observed. Three groups were distinct: the resistant, the sensible and the extremely sensible.

In the second section of this work, the effect of water stress induced *in vitro* by PEG 600 on morphology was studied in eight genotypes selected according to results obtained in the first experiment. The results showed that the tolerance of water stress was, in a great part, determined by the degree of the development of the root system. The comparison of the SDS-PAGE profiles of the protein leaves showed that drought affects the protein expression: several proteins were inhibited, others are partially inhibited and we observe the apparition of new proteins but not expressed especially in the tolerant lines.

Key words: Sunflower, Recombined inbred lines, drought, physiology, morphology, SDS-PAGE.

Liste des abréviations :

APS : Persulfate d'ammonium.

II : Pression osmotique.

KDa : Kilo Dalton

MR/UVM : Masse racinaire par unité de volume du milieu.

Ø PS2 : Rendement quantique du PS2.

PEG : Polyéthylène glycol.

PF : poids frais.

PFR : Poids frais de la racine.

PFR/PFT : Rapport poids frais de la racine/Poids frais de la tige.

PFT : Poids frais total.

PM : Poids moléculaire

PPT : Poids total de turgescences.

PS : Poids sec.

PSF : Poids spécifique foliaire.

RS : Résistance stomatique.

SDS : Sodium dodecyl sulfate.

SF : Surface foliaire.

TCA : Acide trichloracétique.

TCT : Taux de chlorophylle totale.

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyl-1-,2-diaminométhane .

TRE : Teneur relative en eau.

Liste des figures :

| | Page | |
|--------------------|---|----|
| Fig. I-1 | L'indicateur « effet de serre » est la quantité de gaz à effet de serre émise après combustion par unité d'énergie utilisée | 25 |
| Fig. I-2 | Champs de tournesol cultivé dans la localité de LAMSARA près du Mont Chelia (W. de Khenchela) à des fins d'apiculture | 26 |
| Fig. I-3 | Quelque variété de tournesol utilisé en horticulture | 26 |
| Fig. I-4 | La réponse de la cellule de la plante au stress causé par la dessiccation | 31 |
| Fig. I-5 | Description de l'effet de SDS et agents réducteurs tels que le β -mercapto-éthanol sur les protéines | 33 |
| Fig. I-6 | Mécanisme de la formation du réseau (Network) par polymérisation de l'acrylamide en présence du biscrylamide qui crée les ponts | 34 |
| Fig. I-7 | Lignées recombinantes | 46 |
| Fig. II-1 | Pression osmotique (II MPa) en fonction de la concentration du milieu en PEG (%) | 54 |
| Fig. III-1 | Pourcentage de survie des génotypes de tournesol étudiés | 61 |
| Fig. III-2 | Teneurs relatives en eau enregistrées chez les génotypes du groupe A | 63 |
| Fig. III-3 | Valeurs de la résistance stomatique enregistrées chez les génotypes du groupe A | 63 |
| Fig. III-4 | Teneurs totales en chlorophylle enregistrées chez les génotypes du groupe A | 65 |
| Fig. III-5 | Valeurs du rendement quantique du PSII (Φ PS2) enregistrées chez les génotypes du groupe A | 65 |
| Fig. III-6 | Surfaces foliaires observées chez les génotypes du groupe A | 69 |
| Fig. III-7 | Valeurs du poids spécifique foliaire enregistrées chez les génotypes du groupe A | 69 |
| Fig. III-8 | Lot témoins des 8 génotypes de tournesol testés <i>in vitro</i> | 71 |
| Fig. III-9 | Lot stressés des 8 génotypes de tournesol testés <i>in vitro</i> | 71 |
| Fig. III-10 | Longueurs de la tige observées chez les génotypes de tournesol testés <i>in vitro</i> | 74 |

| | | |
|--------------------|---|----|
| Fig. III-11 | Longueurs de la racine observées chez les génotypes de tournesol testés <i>in vitro</i> | 75 |
| Fig. III-12 | Nombre de racines développées par les vitroplants | 75 |
| Fig. III-13 | Poids frais total des vitroplants | 76 |
| Fig. III-14 | Poids frais de la racine des vitroplants | 76 |
| Fig. III-15 | Rapport Poids de la racine/Poids de la tige (PT/PR) | 77 |
| Fig. III-16 | Masse racinaire par unité de volume du milieu | 77 |
| Fig. III-17 | Profile SDS-PAGE Protéines foliaire (témoins) | 81 |
| Fig. III-18 | Profile SDS-PAGE Protéines foliaire (stressés) | 81 |

Liste des tableaux :

| | |
|---|----|
| Tableau I-1 : Gènes de tournesol publiés..... | 41 |
| Tableau II-1 : Présentation des génotypes utilisés lors de la première expérimentation... | 48 |
| Tableau II-2 : Lignées utilisés dans de la deuxième expérimentation..... | 53 |
| Tableau II-2 : Composition du Kit LMW | 58 |
| Tableau III-1 : Réponse des 100 génotypes de tournesol étudiés au stress hydrique Appliqué..... | 60 |
| Tableau III-2 : Valeurs de la TRE, RS, TCT, ØPS2 enregistrés chez les génotypes du groupe A | 66 |
| Tableau III-2 : Valeurs de la surface foliaire et du poids spécifique foliaire enregistrés chez les génotypes du groupe A | 68 |
| Tableau III-3 Paramètres relatifs à la croissance sur milieu MS additionné de PEG chez les génotypes de tournesol étudiés | 80 |
| Tableau III-5 Présentation de bandes détectées chez les feuilles de tournesol..... | 82 |

Sommaire :

| | Page |
|--|------|
| Introduction | 13 |
| CHAPITRE I : Revue bibliographique | |
| I-1- Le tournesol | 17 |
| I-1-1-Présentation de l'espèce | 17 |
| I-1-2-Botanique | 19 |
| I-1-3-Agronomie | 20 |
| I-1-4-Utilisation du tournesol | 23 |
| I-2-Effet du stress hydrique sur les plantes et stratégies d'adaptation | 26 |
| I-2-1-Le stress hydrique : définition et conséquences physiologiques | 26 |
| I-2-2-Mécanismes de résistance à la sécheresse | 28 |
| I-2-3-Protéines et stress hydrique | 30 |
| I-3-Le sélection pour la sécheresse | 36 |
| I-4-La sélection variétale chez le tournesol et apports des biotechnologies dans sont amélioration | 37 |
| I-4-1-Historique | 37 |
| I-4-2-Apport des biotechnologies dans l'amélioration du tournesol | 42 |
| I-5-Utilisation des lignées recombinantes pour l'étude d'un caractère complexe | 44 |
| CHAPITRE II : Matériel et méthodes | |
| II-1-Première expérimentation | 48 |
| II-1-1-Matériel végétal | 48 |
| II-1-2-Condition et mode de culture | 49 |
| II-1-3-Stade de mesure | 49 |
| II-1-4-Caractérisation de la contrainte hydrique | 50 |
| II-1-4-1- La teneur relative en eau | 50 |
| II-1-4-2-Résistance stomatique | 50 |
| II-1-4-3 –Paramètres associés à la photosynthèse | 51 |
| II-1-4-4 –Surface foliaire et poids spécifique foliaire | 52 |
| II-1-4-5-Etude statistique | 53 |
| II-2-Deuxième expérimentation | 53 |
| II-2-1-Matériel végétal | 53 |
| II-2-2-Conduite de la culture <i>in vitro</i> | 55 |
| II-2-3-Stade de mesure | 55 |
| II-2-4-Caractérisation de la contrainte hydrique chez le vitroplants | 56 |
| II-2-5- Etude statistique | 56 |
| II-2-6-Analyse des protéines totales foliaires par SDS-PAGE | 56 |
| II-2-7-Traitement des données | 58 |
| CHAPITRE III : Résultats et discussion | |
| III-1- Résultats et discussion première partie | 60 |
| III-1-1-Survie au stress des génotypes de tournesol étudiés | 60 |
| III-1-2- La teneur relative en eau | 61 |
| III-1-3- Résistance stomatique | 62 |
| III-1-4-Paramètres associés à la photosynthèse | 64 |
| III-1-5 –Surface foliaire et poids spécifique foliaire | 67 |
| III-2- Résultats et discussion deuxième partie | 71 |
| III-2-1-Paramètres relatifs à la croissance sur milieu MS additionné de PEG | 72 |
| III-2-2-Analyse des protéines totales foliaires par SDS-PAGE | 81 |
| Conclusion générale | 86 |

Références bibliographiques
Annexes

89
99

INTRODUCTION

Le tournesol est d'abord cultivé pour ses graines, son coût de production modéré, la richesse et la qualité de son huile, sa teneur en protéines font de lui une des principales cultures oléagineuse dans le monde. Plusieurs facteurs expliquent que l'huile de tournesol soit considérée comme une huile de première qualité : couleur pâle, forte teneur en acides gras non saturés, saveur neutre, forte résistance à l'oxydation et point de fumée élevé.

En plus d'être utilisée en cuisine, l'huile de tournesol entre dans la fabrication de margarine, de sauces pour salades, de préparations pour nourrissons, de lubrifiants, de biocarburants, de fluides hydrauliques, de savons, de produits d'éclairage et de certains types de peintures, vernis et plastiques. Le tourteau résiduel contient 50 à 60 % de protéines et de ce fait est considéré comme un aliment de bétail de premier choix.

Selon la **FAO(2006)**, la production mondiale de graines de tournesol est de 26,1 millions de tonnes. Les principaux producteurs sont la Russie (4,801 millions de tonnes/an) et l'Ukraine (3,05 millions de tonnes/an), l'Argentine et l'union européenne.

En 2004, l'Algérie a importée des graines d'oléagineux pour 69 787 000 USD (**FAO, 2004**). Depuis, le prix des oléagineux n'a cessé d'augmenter. En effet, la hausse des prix enregistrée au niveau des produits énergétiques se transmet aux produits agricoles via le développement des biocarburants. Alors qu'il est difficile de prévoir l'évolution future des cours, il est communément admis que les nouveaux prix d'équilibre qui s'installent sur ces marchés seront largement en dessus de ceux observés avant la crise. Les enjeux sont multiples et touchent à l'indépendance énergétique des pays développés, la souveraineté alimentaire des pays tiers et à la préservation de l'environnement.

Hormis la production de l'huile d'olive, l'Algérie ne produit aucun type d'huile végétale. (**FAO, 2006**).

Les premiers essais sur les possibilités de mise en culture de graines oléagineuses en Algérie ont été réalisés en 1954 à la station d'essai de semences et d'amélioration des plantes à El-Harrach où les cultures suivantes ont été testées avec succès : tournesol, soja, colza, carthame, arachide, coton, ricin et le lin.

La culture des espèces oléagineuses (Tournesol, Colza et Carthame) n'a débutée en Algérie qu'en 1965 pour être abandonnée en 1983. Durant cette période (1965-1983), la contribution de la production locale dans la couverture des besoins de consommation et dans l'approvisionnement des unités industrielles en matière première a été très insignifiante, 600 tonnes d'huile en moyenne contre des besoins estimés durant cette période à 176 000 tonnes environ, représentant ainsi moins de 1 % des besoins nationaux. Les superficies réservées à ces cultures, avant leur abandon en 1983, n'ont pas dépassé, (toutes confondues) 15 000 ha pour un rendement oscillant entre 01 et 06 q /ha. Selon **AMEROUN (2002)**, Ceci a été dû principalement à:

- L'absence d'une approche de développement intégrée entre les secteurs agricole et industriel, qui a conduit à une mise en œuvre accélérée et anarchique des programmes.
- La mise en place tardive du programme d'expérimentation appliquée qui n'a pas servi le programme de production, notamment en matière de transfert des acquis.
- L'insuffisance des supports logistiques des opérations d'appui.
- Le manque, voir l'absence d'application des techniques rationnelles de production due à l'insuffisance de vulgarisation et à certaines difficultés d'équipement.

Plante à débouchés nationaux garantis, le tournesol doit impérativement bénéficier d'une grande attention. Il s'agit d'installer les moyens nécessaires à la relance de cette culture en Algérie.

Le Tournesol est une culture de printemps pratiquée en conditions pluviales, la contrainte majeure en Afrique du Nord est le déficit hydrique en fin de cycle qui pénalise énormément le rendement.

Il ressort des diverses prospectives sur les changements climatiques une forte probabilité d'une augmentation de la température et une aggravation du déficit pluviométrique en particulier dans le bassin méditerranéen et il est peu probable que le tournesol bénéficie massivement de l'irrigation à l'avenir (**KIANI, 2007**), il convient donc de réfléchir aux voies d'amélioration de la productivité du tournesol dans le cadre de contraintes hydriques plus ou moins marquées.

Le tournesol est une culture très prometteuse dont on attend de grandes performances et elle sera parmi les plantes qui bénéficieront le plus des biotechnologies.

L'amélioration de la productivité du tournesol repose sur deux approches complémentaires: l'optimisation de la conduite culturale d'une part et d'autre part la sélection de génotypes présentant des caractéristiques intéressantes.

La sélection du tournesol a portée essentiellement sur la résistance aux principaux pathogènes, le tournesol n'a pas beaucoup bénéficié de la sélection pour la résistance à la sécheresse (KIANI, 2007).

L'amélioration variétale et le développement de plantes résistantes à la sécheresse s'est heurté jusqu'à présent à la grande complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu dans la réponse à la sécheresse. Comprendre les réponses aux stress est essentiel dans les essais entrepris pour sélectionner des cultivars capables de résister à la sécheresse et aux autres conditions susceptibles de réduire le rendement.

Le réchauffement climatique prévisible pour les années à venir aura des répercussions importantes en termes d'agriculture et donc de recherche appliquée.

Le présent travail portera sur l'étude de la variabilité de la réponse au déficit hydrique chez des lignées recombinantes de tournesol.

Notre travail se divise en deux parties :

- La première partie a pour but de distinguer dans une population de 100 génotypes de tournesol les résistants des sensibles par une étude de quelques paramètres physiologiques.
- La deuxième partie part des résultats de la première et consiste en une étude comparative de quelques paramètres morphologiques et biochimiques *in vitro* chez des génotypes qui ont en fonction de leur tolérance ou sensibilité vis-à-vis le déficit hydrique.

Le mémoire sera présenté sous forme de trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique relative au tournesol, à l'effet de la sécheresse sur les végétaux et les approches utilisées l'étude et l'amélioration des plantes sous contraintes hydrique.
- Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés.
- Le troisième chapitre sera consacré à la présentation et la discussion des résultats obtenus.

Enfin le mémoire se conclura en dégageant quelques perspectives de ce travail.

CHAPITRE I :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1-Le Tournesol

I-1-1-Présentation de l'espèce :

Le genre *Helianthus L.*, caractérisé au sein des Astéracées par une absence d'aigrette sur la graine, prend son origine en Amérique du Nord. La forme cultivée, *Helianthus annuus L.*, se distingue des formes sauvages par un petit nombre de caractères affectant, par exemple, la tige (disparition de la ramification qui conduit à générer un gros capitule unique) et la graine (augmentation du calibre) (DORE et VAROQUAUX, 2006).

Le genre *Helianthus* peut être scindé en trois sections : *Annui*, *Ciliares* et *Divaricati* (DEMOL, 2002) :

1- La section *Annui* comprend une douzaine d'espèces, dont *H. annuus*, le Tournesol cultivé. Ces espèces diploïdes ($2n=34$) et interfécondes sont presque toujours annuelles. Leur habitat naturel est le centre et l'ouest de L'Amérique du Nord. Leurs feuilles sont généralement alternes, pétiolées et de forme ovoïde. Les différentes espèces sont : *H. agristis* Polard, *H. annuus L.*, *H. anomalus* Blake, *H. agrophyllus* Torr. Et Gray, *H. bolanderi* A. Gray, *H. debilis* Nutt., *H. exilis* A. Gray, *H. neglectus* A. Gray, *H. niveus* T.S Brandeg., *H. paradoxus* C.G Heiser, *H. petolaris* Nutt., *H. praecox* Englem. Et Gray. La forme cultivée actuelle du tournesol serait la sous-espèce *Helianthus annuus L. var. macrocarpus*.

2- La section *Ciliares* se divise en deux sous-sections :

*La sous section *Ciliares* qui se compose de trois espèces pérennes (*H. arizonensis* R.C Jackson, *H. ciliaris* D.C., *H. laciniatus* A. Gray) sans rhizome proprement dit, mais avec un système racinaire latéral très développé à partir duquel la plante peut se développer. Les feuilles sont le plus souvent opposées et sessiles. Ces espèces se rencontrent dans l'Ouest de l'Amérique du Nord. Deux d'entre elles sont diploïdes ($2n = 34$) et une (*H. ciliaris* se trouve sous deux formes : tétraploïdes (68 chromosomes) et hexaploïdes (102 chromosomes).

*La sous section *Pumili* se compose de trois espèces pérennes diploïdes ($2n=34$) (*H. cusickii* A. Gray, *H. gracilentus* A. Gray, *H. pumilus* Pers.). Les plantes de cette série sont naines, à feuilles velues et généralement opposées. Elles se multiplient à partir de bourgeons qui émergent à la base des vieilles racines. On les rencontre dans l'Ouest de l'Amérique du Nord.

3- La section *Divaricati* se compose d'espèces pérennes. A partir des racines, se développent souvent des bourgeons, des rhizomes, des tubercules. *H. tuberosus*, le Topinambour, appartient à cette section. On y distingue cinq sous-sections :

*La sous-section *Augustifolii* qui se compose de trois espèces diploïdes (*H. augustifolius* L., *H. floridanus* A. Gray, *H. simulans* Watson) ($2n=34$) dispersées à l'Est de l'Amérique du Nord. Les tiges des plantes sont poilues et portent des feuilles généralement alternes à limbe étroit dont les bords sont enroulés vers la face inférieure, avec ou sans rhizome.

*La sous-section *Atrorubentes* se compose d'espèces diploïdes ($2n=34$) (*H. atrorubentes* L., *H. heterophyllus* Nutt., *H. radula* Torr. Et Gray, *H. silphioides* Nutt.) Réparties au sud-est des Etats-Unis. Elles ne possèdent pas de rhizomes, mais des racines fibreuses. Au cours de son développement, la plante passe par un stade « rosette » caractéristique..

*La sous-section *Divaricati* comprend neuf espèces réparties dans le centre et l'Est de l'Amérique du Nord. Trois d'entre elle sont diploïdes (*H. divaricatus* Michx., *H. mollis* Lam., *H. occidentalis* Riddell), une est tétraploïde (*H. ursutus* Rofin) et trois hexaploïdes (*H. eggeretii* Small, *H. rigidus* Derf., *H. tuberosus* L.). Enfin, deux d'entre elles peuvent se trouver sous deux formes : diploïde ou tétraploïde (*H. decapitalus* L., tétraploïde ou hexaploïde (*H. strumosus* L.). Les plantes possèdent des rhizomes et sont à feuilles opposées.

*La sous-section *Gigantii* se compose de huit espèces dont cinq sont diploïdes (*H. giganteus* L., *H. grisseeratus* Martins, *H. maximiliani* Shrad., *H. nuttallii* Torr. Et Gray, *H. salicifolius* A. Dieter.) et trois hexaploïdes (*H. californicus* DC., *H. resinosus* Small, *H. schweinitzii* Torr. et Gray). Ce sont de grands Tournesol à feuilles alternes et à rhizomes. On les trouve dans le centre et l'Est de l'Amérique du Nord, excepté *H. nuttallii* catonné à l'Ouest et *H. maximiliani* présent partout.

*La sous-section *Microcephali* comprend cinq espèces dont trois sont diploïdes (*H. Microcephalus* Torr. et Gray, *H. glocophyllus* D.M. Smith, *H. ligifolius* Purshi) et deux tétraploïdes (*H. laevigatus* Torr. et Gray et *H. smithii* C.B. Heisser). Ces espèces se trouvent dans l'Est de l'Amérique du Nord. Les capitules sont de petite taille. Les feuilles supérieures sont alternes.

Les tournesols sauvages qui ont été mentionnés constituent une grande réserve de caractères dont l'exploitation a tout juste débuté.

I-1-2-Botanique:

- **Inflorescence et fleurs :**

Chaque plante porte un capitule d'un diamètre variant de 15 à 30 cm. Le capitule comporte un réceptacle charnu sur lequel s'insèrent des fleurs tubulées au centre et des fleurs ligulées à la périphérie.

Les fleurs ligulées sont réparties sur un ou deux rangs à la périphérie du capitule. Leur nombre ne dépasse jamais la centaine. Elles sont asexuées ou très rarement unisexuées de type femelle.

Les fleurs tubulées ou fleurons forment l'essentiel du capitule. On en dénombre environ 2 000 en moyenne. Chaque fleuron logé dans une bractée acuminée est constitué d'un ovaire infère ne contenant qu'un seul ovule sur lequel s'insèrent, de l'intérieur vers l'extérieur, différentes pièces florales : le style, cinq étamines, la corolle, le calice. (**DEMOL, 2002**).

- **Floraison**

Elle est centripète. Sa progression s'effectue par cycles quotidiens de trois cercles de fleurons. Elle dure de cinq à dix jours selon les conditions climatiques.

La maturation d'un fleuron débute par son éclosion, les anthères étant alors projetées au-dessus de la corolle suite à l'élongation des filets. Les anthères sont déhiscentes et le pollen se déverse dans le tube floral : c'est le stade male. Le lendemain, le style s'allonge, traverse le tube staminal et émerge au-dessus des anthères. Les deux lobes stigmatiques se séparent et s'enroulent en crosse vers le style, c'est le stade femelle. La réceptivité des stigmates peut durer de 15 à 20 jours (**DEMOL, 2002**).

- **Fécondation**

La morphologie florale et la dynamique de floraison font du tournesol une plante à tendance allogame. Il existe cependant une grande variabilité quant à l'auto-incompatibilité de la plante et les améliorations ont intérêt à créer des variétés capables de s'auto-polliniser.

La pollinisation est entomophile. Les abeilles et les bourdons sont les principaux agents pollinisateurs du tournesol. La fleur est très attractive et le taux de fréquentation est très

important. Pour améliorer le rendement en graines, il est recommandé de disposer d'une à deux ruches par hectare. (DEMOL, 2002).

- **Fructification**

Les fruits sont des akènes de forme allongée et légèrement aplatie. L'akène est constitué d'un embryon droit flanqué de deux grands cotylédons blanchâtres, riche en lipides et protéines.

Le tout est enveloppé d'un péricarpe appelé coque dont la zone interne est sclérifiée et la zone externe colorée (brun à noir avec ou sans stries). La coque représente 18 à 25% du poids du fruit. (DEMOL, 2002).

I-1-3-Agronomie:

Le tournesol peut se développer sur différents types de sols, mais préfère les sols qui se réchauffent rapidement.

Son système racinaire pivotant occupe un volume de terre plus important que celui du Maïs, d'où sa meilleure résistance à la sécheresse.

Le tournesol est une bonne tête de rotation : il libère tôt le sol et restitue environ 7 T de MS soit 12 à 1.500 kg d'humus, et une partie de l'azote, du phosphore et du potassium qu'il a extrait (SOLTNER, 2005).

Le tournesol est réputé relativement tolérant à la sécheresse et s'adapte à divers types de sols, aussi bien sablonneux qu'argileux, et à une vaste gamme de pH du sol (5,7 à plus de 8). Toutefois, sa tolérance au sel est faible et il exige un sol bien drainé.

Grace à ses racines profondes, il peut utiliser des éléments nutritifs qui ont été entraînés par lessivage dans les couches plus profondes du sol (SOLTNER, 2005).

- **Le semis du tournesol :**

Le tournesol est semé en avril. On sème à 2-3 cm de profondeur en terre battante, 4-5 cm en terre desséchée en surface.

La densité recherchée est de 50 000 à 60 000 plantes levées/ha que l'on obtient par exemple en semant 67.000 graines pour une faculté germinative de 90%. En cas d'accident de levée, ne conserver que s'il reste plus de 35.000 pieds/ha (**SOLTNER, 2005**).

Des études ont montré que le système racinaire du tournesol a besoin pour se développer d'une forte porosité et de sols plutôt légers, vu sa sensibilité aux accidents structuraux (tassement, semelle de labour). En sols argileux, l'inondation de jeunes plantes du tournesol provoque une augmentation de la biosynthèse d'éthylène dans les racines et les tiges et endommage le système chlorophyllien des feuilles. Le tournesol ne survit pas au delà de 3 jours d'ennoyage (**ANONYME a, 2008**).

Le tournesol est faiblement tolérant à la salinité du sol. Des études ont montré que la teneur en huile diminue d'environ 20 % lorsque la salinité varie de 0,25 à 1,2 s.m⁻¹, mais la composition en acides gras reste invariable. La germination n'est affectée que si la concentration en sel du sol dépasse 0,7 % (**SOLTNER, 2005**).

- **La fumure du tournesol :**

Sur le plan fertilité du sol, il est moins exigeant que le maïs et le blé.

La croissance très rapide du tournesol entraîne des besoins élevés notamment en azote et potassium. Mais les exportations par la graine elle-même sont relativement faibles étant donné les fortes restitutions.

Pour les éléments P-K le tournesol est moyennement exigeant et peu exigeant en phosphore. Ce qui veut dire que la puissance d'extraction minérale de ses racines est élevée.

La fertilisation phospho-potassique peut donc être limitée à 40-60 unités/ha en fertilisation normale, 50 à 70 unités en fertilisation renforcées.

Pour l'azote on recommande des doses modérées, pas plus de 80 unités. Le tournesol valorise mal les doses supérieures. Il est en effet du fait de la puissance de ses racines et la période à laquelle il pousse, très capable d'utiliser la minéralisation de l'azote organique du sol. Apporté en excès, il favorise l'exubérance de la végétation et le développement des maladies (*Sclerotinia*, *Phomopsis*, *Botrytis*) (**SOLTNER, 2005**).

- **L'irrigation du tournesol :**

La consommation en eau du tournesol est très variable et peut aller de 400 à 600 mm et plus. La consommation de pointe peut atteindre 11 mm/jour pendant la floraison. Pour une production de 35 qx/ha, il faut viser une consommation totale de 400 à 450 mm (**EL ASRI *et al.*, 2001**).

Selon les réserves du sol en eau et le type de sol, il faut apporter 3 à 6 irrigations de 30 à 60 mm pendant la phase post-florale. En cas d'eau limitante, l'apport d'une seule irrigation au stade début floraison est aussi productif que le régime à trois irrigations pendant la phase reproductive (**EL ASRI *et al.*, 2001**).

Plus le déficit hydrique est précoce plus les pertes des rendements sont élevées. (**EL ASRI *et al.*, 2002**).

La répartition de l'irrigation entre les phases végétatives et reproductive joue un grand rôle dans la détermination du rendement grain. **EL ASRI *et al.*, (2002)** ont prouvé que pour une même dose d'eau (510 ml), une répartition de 170 mm pendant la phase végétative et 340 mm pendant la phase reproductive engendre la meilleure efficacité de point de vue matière sèche grain. Les apports d'eau pendant la phase reproductive peuvent permettre d'une part un gain sensible à partir d'un meilleur remplissage des graines et d'autre part d'une amélioration de la teneur en huile. Des déficits hydriques supérieurs à 100 mm, entre le stade "bouton floral 3 cm" et la fin floraison, n'autorisent aucun niveau de rendement grain supérieur à 2 tonnes à l'hectare.

- **Traitement de la culture :**

Contre les maladies du tournesol, mildiou, botritis, sclérotiniose, phoma et phomopsis, des traitements sont soit peu, soit non efficaces. Seule la résistance variétale est à rechercher, d'où les grands efforts des sélectionneurs (**SOLTNER, 2005**). De même une bonne agronomie : rotation, fertilisation modérée et équilibrée, bonne aération du sol, semi à densité pas trop élevée, irrigation, lutte éventuelle contre les pucerons, récolte précoce.

Dans certains cas les traitements fongicides s'imposent soit par traitement des semences, soit par pulvérisation au stade « limite du passage du tracteur ».

Une rotation de quatre ans est recommandée pour le tournesol, en raison surtout de sa grande sensibilité à la sclérotiniose. Au cours des années intermédiaires, il faut éviter les autres cultures dicotylédones.

Les ravageurs du tournesol sont peu nombreux les limasses à la levée exigent souvent un traitement, les taupins sont combattus par le traitement des semences, les pucerons en cas de pullulation précoce au stade 2-3 paires de feuilles. Le traitement s'impose rarement (**SOLTNER, 2005**).

- **La récolte du tournesol :**

On considère que le tournesol a atteint la maturité lorsque le dessous du capitule est jaune et que les bractées virent au brun. Selon les lieux, les climats, les années, la récolte intervient de fin août à début octobre.

La récolte se fait à la moissonneuse batteuse équipée de plateaux à bords relevés fixés devant la barre de coupe pour amener les tiges à la coupe et récolter les graines et panicules qui tombent devant la lame. On supprime un rabatteur sur deux et la vitesse du batteur est très réduite 500t/min (**SOLTNER, 2005**).

I-1-4-Utilisation du tournesol :

Le tournesol est, avant tout, utilisé dans l'alimentation humaine (huile), mais il a aussi des débouchés en alimentation animale (tourteau) et dans l'industrie.

- **Alimentation humaine :**

L'huile est extraite des graines, dont la teneur dans les variétés améliorées varie de 45 à 50 %. Le tournesol sous climat tempéré produit une huile riche en acide linoléique et à ce titre, peut être considérée comme bonne pour la santé (**DORE et VAROQUAUX, 2006**).

D'après les nutritionnistes, cette huile a d'excellentes qualités diététiques, par exemple pour combattre le diabète. C'est également une bonne source de vitamine E (700 mg/L, la teneur de cette vitamine dans l'huile d'olive n'est que de 150mg/L). L'huile de tournesol entre également dans la fabrication de margarine. L'acide oléique a des qualités nutritionnelles qui intéressent aujourd'hui quelques grands fabricants d'huile alimentaire. Des sélectionneurs ont mis au point des variétés de tournesol dont l'huile contient plus de 60% d'acide oléique (**DORE et VAROQUAUX, 2006**).

- **Alimentation animale :**

La plante entière récoltée avant maturité est utilisée comme fourrage. Le tourteau de tournesol, c'est-à-dire le produit obtenu après extraction de l'huile et utilisé en alimentation animale, se situe parmi les meilleurs en raison de sa forte teneur en matières azotées totales (45-55%) et en méthionine, sa teneur en vitamines du groupe B est également élevée (le tournesol contient plus de riboflavine que l'arachide ou le soja).

Comparé aux autres tourteaux, du point de vue minéral, celui du tournesol présente un meilleur équilibre phosphocalcique. Toutefois son taux élevé en cellulose en limite l'emploi chez les monogastriques. Il est néanmoins possible de décortiquer mécaniquement la graine pour obtenir un tourteau d'amande. Les sélectionneurs recherchent des variétés à coque mince et (ou) faciles à décortiquer.

Enfin, les variétés de bouche sont utilisées pour l'oisellerie (**DORE et VAROQUAUX, 2006**).

- **Industrie de la lipochimie :**

Certaines utilisations non-alimentaires du tournesol se sont développées, cette industrie recherche des huiles très riches en acide oléique, qui peuvent être utilisées en cosmétique, en pharmacie, dans la fabrication des lubrifiants, des biocarburant, et de matières plastiques (**DORE et VAROQUAUX, 2006**).

- **Biocarburants :**

L'huile de tournesol peut être utilisée directement à la place du diesel (**HOPKINS, 2003**), ou après transformation en EMHV (ester méthylique d'huile végétale ; autrement appelé diester), obtenu après mélange avec de l'alcool méthylique. L'huile pure, contrairement aux diesters, ne nécessite aucun procédé industriel de fabrication. Une simple presse suffit. Le tournesol est la plante qui offre le meilleur rendement (six fois supérieur au gazoil). C'est aussi la plus écologique (**ANONYME b, 2008**). Pas de rejet de soufre, 25% d'émission de dérivés azotés en moins, trois fois moins de CO₂ rejeté à la combustion. Le carburant tournesol est très pertinent aujourd'hui avec l'impératif de réduire les gaz à effet de serre (Fig. I-1). Tandis que le pétrole brûlé libère dans l'atmosphère du carbone qui a été stocké hors circuit depuis des millions d'année, le CO₂ émis par les biocarburants durant leur combustion est compensé par le carbone absorbé par les plantes durant leur phase de végétation (**ANONYME b, 2008**).

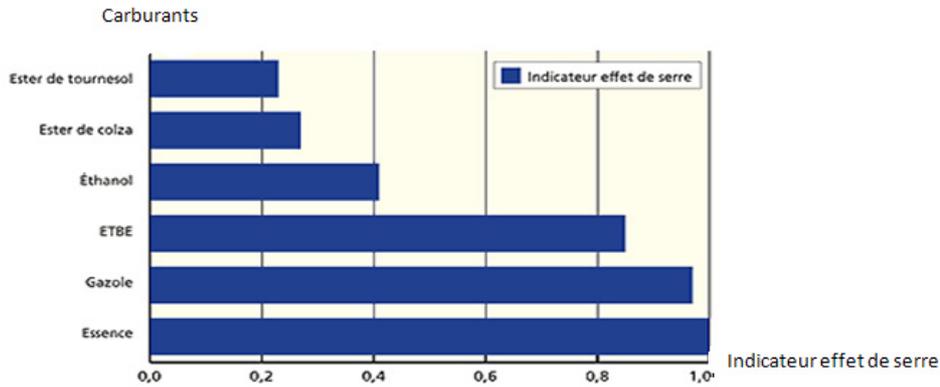


Fig. I-1 : L'indicateur « effet de serre » est la quantité de gaz à effet de serre émise après combustion par unité d'énergie utilisée. Il est présenté en indice, base 1 pour l'essence.

Source : IFEN, d'après PricewaterhouseCoopers/Écobilan, 2002.

Face à un pétrole cher et bientôt rare, plusieurs pays (essentiellement les pays développés) ont eu recours aux biocarburants. Ce débouché non alimentaire des huiles végétales entre en concurrence avec une demande de plus en plus forte destinée à nourrir une population en croissance. L'enjeu est majeur et touche la souveraineté alimentaire des pays tiers. L'Algérie si du point de vue énergétique est indépendante, elle dépend fortement de l'importation du point de vue alimentaire. De plus, toute l'économie nationale se base sur le pétrole. Bien que nous ne sommes pas encore à court de pétrole, nous sommes à court de temps pour développer les cultures oléagineuses. Il se pourrait tout à fait que se voie vérifiée la prédiction du *Cheikh Yamani*, ancien ministre saoudien du pétrole quand il a dit (in **MERITET S, 2006**) : « Plus les prix du pétrole seront élevés, plus la technologie sera stimulée et plus le pétrole encourra le risque d'être remplacé, L'âge de pierre ne s'est pas terminé faute de pierres. L'âge du pétrole s'achèvera, mais pas faute de pétrole ».

- **Tournesol et apiculture :**

Le tournesol, avec près de dix millions de fleurons à l'hectare et une longue période de floraison est une excellente plante mellifère. Les abeilles sont attirées en grand nombre. Selon la littérature, la production de pollen et de nectar est moyenne à bonne (**CHARRIERE et al., 2006**). Les sécrétions nectarifères varient fortement d'une variété à l'autre, selon la nature du sol et le climat (**CHARRIERE et al., 2006**). Le rendement peut aller de une à deux hausses (16Kg) en un mois. Le miel de Tournesol est de Couleur dorée, brillante et jaune canari très caractéristique, de texture assez fine, il exhale un arôme végétal très frais et possède un pouvoir sucrant important et riche en vitamines F (**ANONYME C, 2008**).



Fig I-2 : Champs de tournesol cultivé dans la localité de LAMSARA près du Mont Chelia (W. de Khenchela) à des fins d'apiculture (Juillet 2008)

- **Tournesol et horticulture :**

En horticulture, cette plante offre une inflorescence spectaculaire et décorative. En fonction de l'utilisation, les variétés sont très différentes, en particulier ça concerne les ramifications, le nombre de capitules, leur couleur... etc



Floristan

Inca Jewels

Italian White

Music Box

Sunbeam



Ring of Fire Sunrich Prado Sunrich Lemon Sunrich Orange Sundance Kid

Fig. I-3 : Quelques variétés de tournesol utilisées en horticulture GAST (1995).

I-2-Effet du stress hydrique sur les plantes et stratégies d'adaptation :

I-2-1-Le stress hydrique: définition et conséquences physiologiques:

Le stress hydrique a été défini comme une baisse de la disponibilité de l'eau, traduisant par une réduction de la croissance de la plante et/ou de sa reproduction par rapport au potentiel du génotype. La contrainte hydrique est le facteur ou l'ensemble de facteurs ayant

pour conséquence le stress. D'autres auteurs limitent la définition du stress aux seules conditions correspondant à une hydratation suboptimale des tissus (LAMAZE *et al.*, 1994).

L'installation d'une sécheresse se manifeste par la combinaison d'une part, de la restriction de la disponibilité en eau du sol et, d'autre part, de l'augmentation de la demande évaporatrice (KIANI, 2007).

Le manque d'eau peut se manifester aussi bien dans le sol que dans l'atmosphère (SCORIC, 1990). Généralement, la sécheresse du sol est lente (LARCHER, 1995), mais la diminution de l'humidité de l'air peut parfois être rapide (YOKOTA *et al.*, 2006).

D'un point de vue physique, le stress hydrique résulte d'un abaissement du potentiel hydrique dans l'air et/ou dans le sol en dessous d'une certaine valeur, dépendant du génotype, du phénotype et des caractéristiques du milieu (type de sol, température, vent, etc.) (LAMAZE *et al.*, 1994).

L'évaporation de l'eau abaisse le potentiel hydrique et augmente la concentration du sol en sels. La plante perçoit la sécheresse du sol comme une augmentation de la concentration des sels autour de la surface des racines et/ou une augmentation de la pression osmotique des cellules racinaires.

L'effet du stress dépend de son degré, sa durée, le stade de développement de la plante, le génotype et son interaction avec l'environnement (YOKOTA *et al.*, 2006).

- **Effets précoces:**

Les feuilles ferment leurs stomates dès qu'elles sentent une augmentation de la pression de vapeur de l'air (MOTT et PARTHURST, 1991); (ASSMANN *et al.*, 2000). La fermeture des stomates est une des réponses précoces au déficit hydrique, elle se fait en quelques minutes (ASSMANN *et al.*, 2000), elle a pour but la protection de la plante contre la déshydratation mais cause en même temps une diminution de l'assimilation du carbone ce qui perturbe la photosynthèse (CECHIN *et al.*, 2006).

On observe aussi une diminution de la vitesse d'élongation cellulaire, la balance hormonale est fréquemment altérée, est l'activité de nombreuses enzymes est changée, ainsi que l'expression du génome (LAMAZE *et al.*, 1994).

- **Effets à moyen terme: L'ajustement osmotique**

L'ajustement osmotique a été défini comme un abaissement du potentiel osmotique par l'accumulation de solutés dans les cellules en réponse à un stress salin ou hydrique.

Les solutés accumulés sont très variés et appartiennent à diverses familles biochimiques comme les acides aminés (proline, arginine, citruline, ornithine, etc.), les amides (glutamines et asparagine), les polyamines, les acides organiques (citrate, malate, lactate, etc.), les sucres (saccharose, pinitol, sorbitol, mannitol, glycérol, etc.), les amines quaternaires (glycine-bétaine) et les sels minéraux (K^+ , Na^+ , Cl^-) (LAMAZE *et al.*, 1994).

- **Effets à plus long terme:**

On observe des modifications morphologiques, anatomiques, physiologiques et développementales de la plante. (LAMAZE *et al.*, 1994). Elles comprennent principalement une baisse du volume des nouvelles cellules, une réduction de la surface des feuilles et une augmentation de leur épaisseur, un vieillissement prématuré des feuilles matures, une élévation du rapport racine/feuille en termes de biomasse et, dans le cas d'un stress dépassant la capacité de résistance de la plante, la dessiccation et la mort de celle-ci.

I-2-2-Mécanismes de résistance à la sécheresse:

La résistance à la sécheresse est un terme générique qui comprend plusieurs processus. On en distingue classiquement quatre: L'échappement, la restauration, la tolérance à la déshydratation et l'évitement.

JONES (1992) in (KIANI, 2007) a défini et établi une classification des 'stratégies' d'adaptation des plantes à la sécheresse : (1) la première consiste à 'éviter' le stress hydrique et (2) l'autre à le 'tolérer'.

Les mécanismes d'évitement réduisent l'impact d'un stress bien qu'il soit présent dans l'environnement.

La première façon d'éviter la sécheresse est l'esquive. L'esquive permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adaptation de son cycle de culture à la longueur de la saison des pluies. Le développement rapide avec une floraison précoce permet à la plante d'éviter les périodes sèches. Cette stratégie appliquée aux espèces cultivées a amené à décaler la date de semis et/ou à sélectionner des variétés plus précoces permettant d'éviter les déficits hydriques de fin de cycle.

La deuxième façon d'éviter la sécheresse est la capacité de la plante à maintenir un état hydrique satisfaisant. La stratégie de l'évitement est principalement liée, d'une part, à la réduction de la transpiration et, d'autre part, à une optimisation de l'absorption d'eau par les racines.

La tolérance exige que l'organisme soit en équilibre thermodynamique avec le stress, ce qui signifie que les conditions qui règnent dans la plante sont en équilibre avec les conditions de l'environnement externe. La tolérance à la sécheresse implique que l'organisme survive à une dessiccation qui n'endommage pas son protoplasme et qu'il conserve la capacité de reprendre une croissance normale lorsque le protoplasme sera réhydraté.

La tolérance est la stratégie qui permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique. Le maintien de la turgescence lors d'un déficit hydrique permet de retarder la fermeture des stomates, de maintenir le volume chloroplastique et de réduire le flétrissement foliaire. Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance au déficit hydrique interne. Cette tolérance au déficit hydrique interne permet un fonctionnement prolongé de la photosynthèse. Les produits carbonés peuvent alors être utilisés autant pour l'ajustement osmotique que la croissance racinaire.

Les capacités d'ajustement osmotique sont variables chez le tournesol et dépendent du génotype, des modalités d'installation du déficit hydrique, et de l'âge de la feuille (**KIANI, 2007**)

La tolérance à la sécheresse est le résultat de mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires complexes. L'expression de différents gènes et l'accumulation de divers osmolytes (l'ajustement osmotique) couplés à un système antioxydant efficace sont souvent les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique. Plusieurs de ces mécanismes ont été caractérisés chez différentes plantes (**KIANI, 2007**)

Les différents mécanismes adaptatifs combinés entre eux peuvent conférer aux plantes des comportements différents en situation de contraintes hydriques.

L'adaptation se rapporte à des modifications de structure ou de fonction héréditaires, qui augmentent l'adéquation de l'organisme dans un environnement stressant. Les modifications morphologiques et physiologiques associées au métabolisme acide des crassulacées (CAM) sont des exemples d'adaptation (**HOPKINS, 2003**).

L'acclimatation, par ailleurs se rapporte à des modifications physiologiques non héréditaires, qui interviennent au cours de la vie d'un individu. Ces modifications se produisent

lors d'une exposition graduée au stress, elles permettent à l'individu de vivre et de se reproduire dans un environnement stressant. La capacité de s'acclimater est bien sûr un caractère génétique, mais les modifications produites en réponse au stress ne sont pas transmises à la génération suivante. Le processus d'acclimatation à un stress est appelé résistance et les plantes qui se sont acclimatées sont dites résistantes (**HOPKINS, 2003**).

I-2-3-Protéines et stress hydrique:

La nature immobile des plantes les a obligées à développer principalement des mécanismes moléculaires (**MADHAVA RAO, 2006**).

L'analyse des gels d'électrophorèses montre que le stress hydrique inhibe la synthèse de la plupart des protéines, tandis que celle d'un ensemble restreint dites de stress est induite. Ce schéma est commun dans ses grandes lignes à différents types de stress (**LAMAZE *et al*, 1995**). Les protéines de stress jouent un rôle dans l'adaptation de la plante, et de ce fait, de nombreux chercheurs abordent la résistance au stress par l'isolement et l'étude de ces molécules. (**LAMAZE *et al*, 1995**).

Une partie des protéines induites ont une fonction directe dans l'augmentation de la tolérance au stress (protéines fonctionnelles), d'autres ont une fonction dans la chaîne de transduction (protéines régulatrices) qui aboutiront à la production de protéines fonctionnelles (Fig. I-5).

La plupart des protéines à fonction directe sont des aquaporines, des enzymes catalysant la biosynthèse d'osmolytes (carbohydrates, acides aminés et bétaines), des protéases destinées à l'hydrolyse des protéines endommagées (ubiquitines, thiolprotéases) et des enzymes détoxifiantes (catalases, SOD, ascorbate peroxydase, glutathione-S-transférase, etc. (**SCHULZE *et al.*, 2002**).

Les dehydrines, LEA ou Rab protéines, forment un groupe remarquable de protéines induites par le stress hydrique et qu'on trouve chez toutes les plantes (**CAMPBELL et CLOSE 1997**) ; elles n'ont pas de fonctions enzymatiques, mais elles sont très efficaces dans la protection de membrane cellulaire et des protéines par des structures quaternaires (**CLOSE, 1996**).

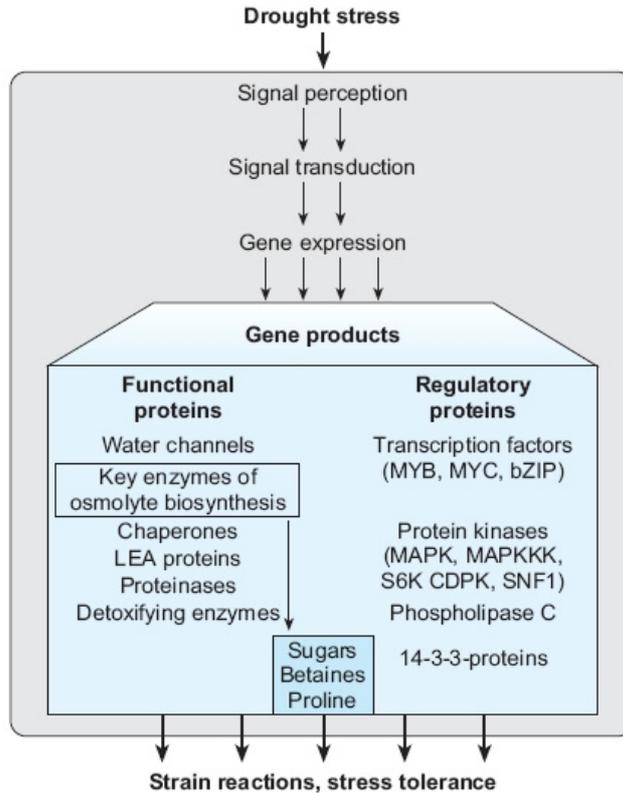


Fig. I-4 : La réponse de la cellule de la plante au stress causé par la dessiccation
(D'après SHINOZAKI et YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 1997)

Découvertes en 1981, Ces protéines protectrices apparaissent toujours pendant la dessiccation de l'embryon et de l'endosperme lors de la maturation des graines. Elles sont très abondante dans les embryons des graines tolérantes à la dessiccation et accumulées dans les périodes de déficit hydrique. (CELLIER *et al*, 1998).

Elles ne contiennent ni de Cys ni de Trp et de ce fait elles résistent à la dénaturation thermique et à la dénaturation acide. Elles ont un poids moléculaire moyen qui varie entre 15 et 200 kDa (SCHULZE *et al.*, 2002).

Les dehydrines et les enzymes catalysant la synthèse d'osmolytes compatibles sont d'un grand intérêt dans la transformation des plantes sensibles à la sécheresse. Xu *et al.*1996, ont introduit dans le riz le gène HVA1 provenant de l'orge. Le riz obtenu à été considérablement plus tolèrent au stress hydrique et aussi au salin.

L'effet de la sécheresse sur la plante et les changements qu'elle provoque dans l'expression du génome a conduit plusieurs chercheurs à aborder l'étude par analyse du protéome. Les changements du protéome après exposition à un stress peuvent fournir les marqueurs de la tolérance qui sont très utiles pour la sélection. Le protéome reflète l'état actuel de la cellule et c'est la maillat qui relie le transcriptome et le métabolome. L'analyse du protéome a beaucoup évoluées ces dernières années et les exemples de son utilité sont nombreux (**HORVA et al., 2006 ; KUMAR et BHATLA 2006, VITAMVAS et al., 2006 ; ROSSIGNOL, 2001**).

Un des outils d'analyse du protéome le plus souvent utilisé est l'électrophorèse qui est une technique biochimique de séparation fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. L'idée d'utiliser cette caractéristique pour séparer des molécules remonte à la fin du dix-neuvième siècle grâce aux travaux du biochimiste suédois Arne Tiselius (1902-1971). Il a réussi le premier à séparer par cette technique les protéines contenues dans des liquides biologiques complexes comme le sérum sanguin et le lait. Aujourd'hui, l'électrophorèse est devenue une technique de routine dans les laboratoires où on l'utilise pour séparer les protéines et les acides nucléiques. L'électrophorèse des protéines peut être réalisée sur des supports variés, notamment sur gel de polyacrylamide en présence du sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE). Cette technique décrite pour la première fois par **Laemmli** en 1970 est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire.

On fait bouillir un mélange de protéines en présence :

- d'un agent réducteur : le B-mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures.
- d'un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques.

En conséquence :

- les protéines sont dénaturées : elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native.
- les protéines n'ont plus de pont disulfure : elles sont sous une forme monomérique (Fig. I-5).

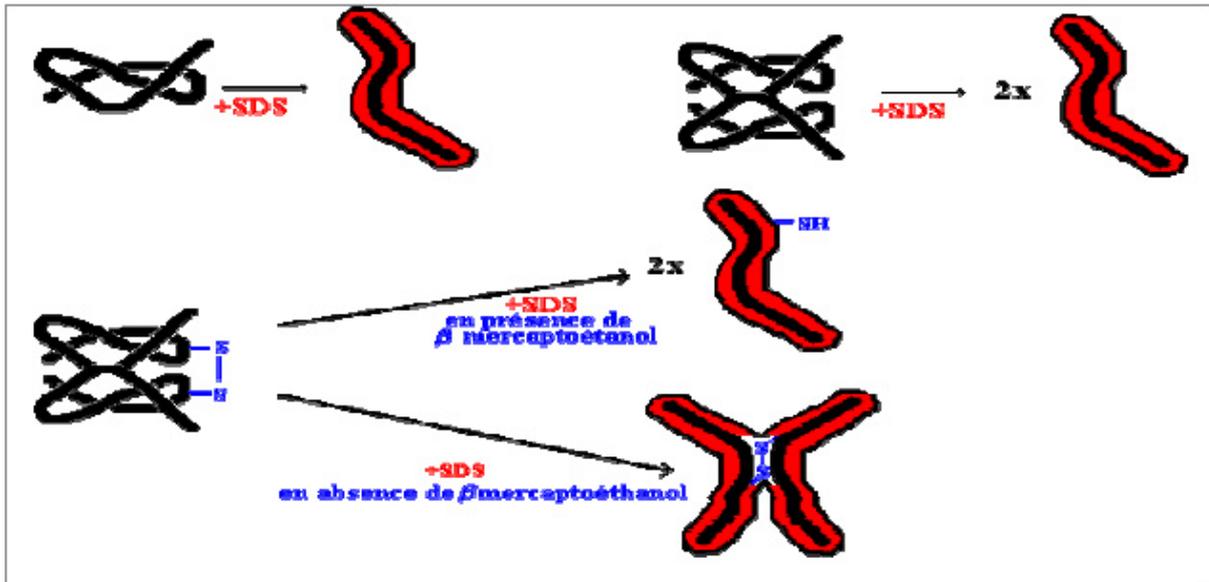


Fig. I-5-Description de l'effet de SDS et agents réducteurs tels que le β -mercapto-éthanol sur les protéines(M. H. Dicko., 2006)

Les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. C'est un gel inerte pour les pH et les forces ioniques de tampons utilisés en séparations de protéines ; les adsorptions sont nulles.

Le gel de polyacrylamide est un gel réticulé, obtenu par polymérisation d'acrylamide qui forme des chaînes et de bis-acrylamide qui pontent les chaînes d'acrylamide (Fig. I-6).

La réaction de polymérisation est initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium et catalysée par le TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyl-1,2-diaminométhane - toxique).

Il est possible de réaliser des gels de porosités variées. Plus les mailles seront petites, plus les grosses molécules auront de la difficulté à avancer dans le gel, donc plus elles seront retardées. On utilisera donc diverses grosseurs de mailles (ou porosité) selon que les protéines qu'on veut séparer sont petites ou grosses.

Ce choix repose sur deux facteurs principaux qui influenceront la taille des pores du gel: la quantité d'acrylamide et le rapport bisacrylamide/acrylamide (ou agent réticulant/acrylamide).

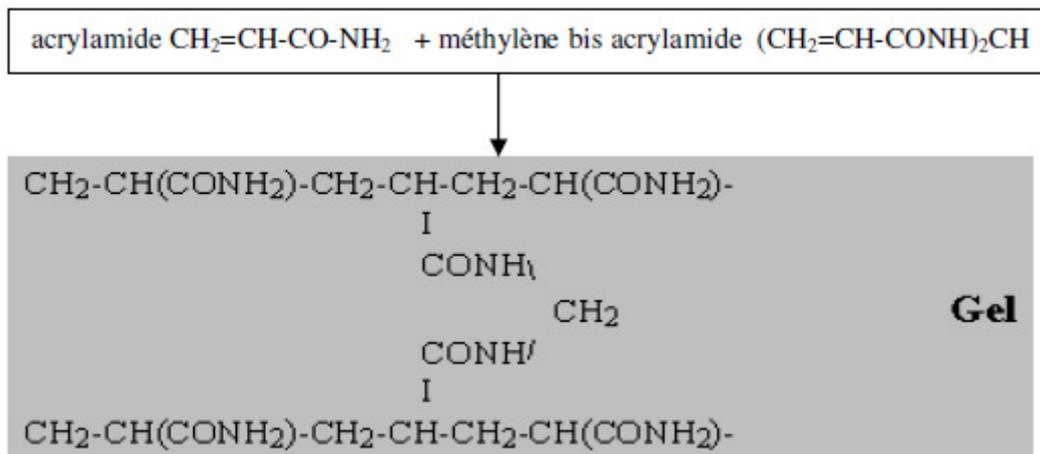


Fig. I-6-Mécanisme de la formation du réseau (Network) par polymérisation de l'acrylamide en présence du biscrylamide qui crée les ponts. (M. H. Dicko., 2006)

D'une part, plus il y a d'acrylamide en solution au moment de la polymérisation, plus les mailles seront petites. D'autre part, plus le rapport bis/acrylamide est élevé plus les mailles seront petites. En effet, plus il y a de bis, plus les chaînes d'acrylamide seront réticulées, donc plus les pores seront petits.

On se sert donc souvent de deux valeurs pour caractériser la porosité d'un gel de polyacrylamide:

%T : (T pour concentration totale) qui est la concentration totale exprimée (en g/100 mL) d'acrylamide et de l'agent réticulant;

%C : (C pour "cross-linking") qui est le rapport (en %) entre les poids de l'agent réticulant sur celui de l'acrylamide et du réticulant combiné.

La séparation se fait sur deux gels : un gel de concentration (stacking gel) et un gel de séparation (resolving gel).

*Le gel de tassement ("stacking gel") est le gel dans lequel les protéines entrent dans l'acrylamide. Il sert à entasser les diverses espèces protéines en bandes très minces pour augmenter la résolution de la séparation. Dans cette section du gel, les protéines ne se séparent pas, elles migrent ensemble en s'entassant dans un volume plus petit que le dépôt.

L'acrylamide y est très peu concentré de sorte que toutes les protéines migrent ensemble à la même vitesse.

*Le gel de séparation ("separating gel") est le gel dans lequel les protéines entassées dans le gel de tassement se séparent les unes des autres. L'acrylamide y est plus concentré de sorte que les protéines se séparent puisqu'elles migrent à des vitesses différentes, étant retardées selon leur masse moléculaire.

On fabrique un gel de polyacrylamide en mélangeant les composantes de base: acrylamide, agent réticulant, tampons, détergents (s'il y a lieu), etc. Quelques secondes avant de "couler" le gel, on ajoute le catalyseur et l'accélérateur puis on verse immédiatement dans un moule. On coule la solution d'acrylamide avant qu'elle n'ait eu le temps de gélifier. On laisse polymériser le gel qui devient alors solide. Le moule contenant le gel solide est alors prêt à être introduit dans la cellule à électrophorèse. On ajoute les échantillons et on met le gel sous tension dans les conditions de voltage et de courant pour que les protéines migrent à la vitesse voulue.

Pour faciliter la visualisation de la migration, on ajoute dans l'échantillon un traceur de migration ("tracking dye"). Ce produit est coloré et migre juste derrière le front d'ions, ce qui permet de visualiser facilement la migration. Le bleu de bromophénol est couramment employé. On arrête l'électrophorèse quand le traceur a atteint le bas du gel.

On démoule ensuite celui-ci pour colorer les protéines dans le gel ou soumettre à d'autres analyses

La façon la plus simple de visualiser le patron de migration des protéines est de les colorer. Avant de procéder à cette coloration, il faut "fixer" les protéines. En effet, lorsqu'on enlève la tension électrique, les protéines vont se mettre à diffuser dans le gel. Ceci va évidemment diminuer la résolution de la séparation. Pour éviter cette diffusion, on les fixe dans le gel, autrement dit, on les précipite dans le gel. Ces agrégats de protéines intimement entremêlés dans les mailles du gel ne peuvent plus diffuser. Cette fixation se fait normalement en mettant le gel dans une acide dilué comme l'acide acétique ou l'acide trichloroacétique . On peut omettre cette fixation si le colorant lui-même contient de l'acide dilué, cela permet de fixer les protéines en même temps qu'on les colore.

Le colorant le plus couramment utilisé est le bleu de Coomassie. Ce produit, en milieu acide et en présence de méthanol, a une grande affinité pour les protéines. Sa petite taille lui permet de pénétrer rapidement dans le gel pour atteindre les protéines. Sa solubilité dans l'acide permet de combiner la coloration des protéines et leur fixation.

Après une nuit de coloration (sous agitation), on transfère le gel dans un bac contenant de l'eau distillée pour enlever l'excès de colorant qui a diffusé dans le gel et empêche de voir les protéines. À la fin de cette décoloration, on obtient un gel transparent avec les bandes de protéines colorées en bleu.

La séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide donne un profil caractéristique du génotype et reproductible si les techniques sont standardisées. La différence entre profils réside dans l'intensité relative des bandes colorées ainsi que dans le nombre de bande obtenues.

I-3-La sélection pour la sécheresse:

Le manque d'eau est le plus important stress environnemental dont les cultures sont confrontées. Le réchauffement climatique prévisible pour les années à venir aura des répercussions importantes en termes d'agriculture et donc de recherche appliquée. Développer des plantes résistantes à la sécheresse permettrait en partie de résoudre les problèmes d'autosuffisance alimentaire de nombreux pays.

Le but est la réduction du fossé existant entre les potentialités de rendement dans les conditions optimales et le rendement sous contrainte hydrique (CATIVELLI, 2008).

Trois méthodes pour l'amélioration de la résistance à la sécheresse ont évolué (J. MITRA, 2001) :

1-La première consiste en l'hybridation pour un maximum de rendement sous conditions optimales : Du fait qu'il y est une haute corrélation positive entre le rendement d'un génotype quelconque sous condition optimales et son rendement sous stress, cette méthode repose sur le principe suivant : les génotypes doués des meilleures potentialités de rendement sous condition optimales donneront des rendements relativement bons sous stress. Un haut potentiel génétique est donc attendu d'un génotype à haut rendement sous conditions optimales. Cette méthode ne prend pas en compte l'interaction génotype-environnement qui peut diminuer ces potentialités génétiques.

2-La deuxième méthode est de sélectionner sous conditions réelles de sécheresse, cette dernière méthode n'est pas trop fiable car l'intensité de la sécheresse varie d'une année à l'autre ce qui provoque le changement de la pression de sélection environnementale d'une génération à l'autre.

3-La troisième méthode consiste soit en l'amélioration de la résistance au déficit hydrique chez des génotypes à haut rendement, soit en l'amélioration du rendement chez un génotype résistant en leur incorporant les mécanismes physiologiques et morphologiques relatifs.

L'amélioration variétale et le développement de plantes résistantes à la sécheresse s'est heurté jusqu'à présent à la grande complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu dans la réponse à la sécheresse ainsi qu'à la variabilité des environnements (type de sol, scénario climatiques...) auxquels sont soumises les plantes (CATIVELLI, 2008). Pour palier à ces difficultés, l'amélioration fait appel à plusieurs disciplines qui ressortent de la biotechnologie : Biologie moléculaire, Génomique, Géni-génétique...etc. La combinaison de ces disciplines avec la physiologie végétale permet :

- La compréhension approfondie des mécanismes physiologiques et génétiques impliqués dans la résistance.
- Le criblage et la détection précoce des individus recherchés.
- Caractériser les ressources génétiques existantes relatives à la résistance à la sécheresse.
- Introduire les gènes impliqués dans la résistance et accélérer le processus de création variétale.

I-4-La sélection variétale chez le tournesol et apports des biotechnologies en son amélioration :

I-4-1-Historique :

La domestication du Tournesol a débuté en Amérique du Nord. Des preuves archéologiques indiquent que les indiens ont cultivé cette plante dès 3 000 ans av. J.-C probablement pour l'extraction de matières tinctoriales de la coque (tatouage et teinture) et pour la consommation de l'amande (DORE et VAROQUAUX ,2006).

Le tournesol a été introduit en Europe au XVI^e siècle via l'Espagne où il à été longtemps considéré comme plante ornementale (SKORIC, 1990).

Un inventeur anglais, Arthur Bunyan, a contribué à l'extension de la culture du Tournesol en mettant au point une méthode d'extraction de l'huile à partir de la graine, qui fut brevetée en 1716 (**DORE et VAROQUAUX F, 2006**).

C'est aux russes que l'on doit la transformation du tournesol en plante oléagineuse de grande culture. D'après **VESELOVSKIY (1885)** in (**SKORIC, 1990**), les fermiers Russes, et surtout ceux des provinces de Saratov et de Voronyez ont sélectionné le tournesol en se basant sur les caractéristiques liés au rendement. Cela a conduit au développement de plusieurs populations locales.

Les premiers travaux d'amélioration génétique faisaient appel à la sélection massale ou phénotypique, qui consiste à sélectionner les capitules en fonction de caractères donnés.

Plus tard, **PUSTOVOIT** a mis au point une technique beaucoup plus efficace, soit la méthode dite « des réserves » (**ACIA, 2005**). Elle consiste à prélever des graines de divers capitules et de les évaluer à l'égard de divers caractères dans une pépinière pendant deux ans, les capitules sélectionnés étant par la suite pollinisés de façon contrôlée. Cette méthode qui a été acceptée par d'autres améliorateurs comme **JDANOV** et **SHCHERBINA (SKORIC, 1990)** a permis l'augmentation de la teneur en huile de 360 à 520 kg⁻¹ et à l'incorporation de la résistance au *Orobanche cumana*, *Puccinia helianthi*, *Homeosoma nebullela*. C'est aux variétés soviétiques à haute teneur en huile : Peredovik, Armavirskiy 3497, Mayak, VNIMK 8931, VNIMK 6540 et Smena que l'on doit l'entendement de la culture du Tournesol dans tous les continents (**SKORIC, 1990**).

D'autres chercheurs se sont intéressés de l'étude de la pureté et de l'hétérosis chez le tournesol. **MARZOV (1947)** in (**SKORIC, 1990**) rapporte qu'en 1915, dans la station de recherche de Saratov, **PLACHEKOVA** était le premier à parvenir en la création de lignées pures de Tournesol. Il affirme qu'entre 1933 et 1934, après avoir testé plusieurs combinaisons en utilisant des lignées pures, avait remarqué une hétérosis pour certains caractères (**SKORIC, 1990**).

Durant les années 50, l'étude de l'hétérosis dans le tournesol a attiré plus de chercheurs: **PUTT** au Canada, **HABURA** et **SCHUSTER** en Allemagne de l'Ouest, **GUNDAEV, JDANOV** et **VOLYF** dans l'ex. URSS..., leurs efforts ont été déterminants car

l'hétérosis a été étudiée pour tous les caractères importants et les résultats de leurs recherches sont devenus la base de criblages de sources potentielles de stérilité male (SCORIC, 1990).

- **L'exploitation de la stérilité male: un point déterminant dans l'histoire de l'amélioration du tournesol:**

Selon ANASHCHENKO (1979) in (SKORIC, 1990), l'histoire de l'étude de la stérilité male chez le tournesol peut être divisée en trois étapes :

1-La première étape :(1920-1950) où des plantes male stériles ont été trouvées accidentellement. Des pieds males stériles étaient collectionnés par KOVSKY en 1924 dans le jardin botanique de Tiflis. KUPCOV en 1927, a trouvé des plantes stériles dans des populations provenant d'Inde. Il reportât en 1934 que cette stérilité male était contrôlée par un seule gène récessif.

2-La deuxième étape (1950-1969) où plusieurs sources de stérilité male contrôlée par un ou plusieurs gènes ont été découvertes.

3-La troisième étape a commencée par les travaux de LECLERCQ en1969 qui a découvert une source stable de stérilité male cytoplasmique provenant du croisement entre *Helianthus petiolaris* Nutt. × *Helianthus annus* L.

L'américain KINMAN (1970) a développé les lignées restauratrices de fertilité RHA265 et RHA266 qui se sont avérées très pratiques dans le développement des hybrides de Tournesol (SCORIC, 1990).

La mise au point des premiers hybrides de tournesol basées sur la stérilité male cytoplasmique a beaucoup attirer l'intention des agriculteurs à cette culture. Au début des années 70, la culture du tournesol aux Etats-Unis a sauté de quelques milliers d'hectares à 2 millions ha. En France, la surface des terres destinées à la culture du tournesol a passée de 35 000 ha à 1 million d'hectares avec un rendement stable de 2 t ha⁻¹ (SCORIC, 1990).

Le tournesol peut s'hybrider avec quantité d'espèces sauvages voisines, propriété utilisée en sélection. Ces espèces représentent une source de traits souhaitables (LU et al., 2007).

L'introduction des traits intéressants depuis ce pool secondaire nécessite l'utilisation des techniques spéciales dites de biotechnologies non seulement pour surmonter les difficultés liées à l'incompatibilité, mais aussi pour accélérer les processus d'amélioration.

Techniques utilisées :

- **Culture de tissus et transformation:**

La culture des tissus et les techniques de régénération de plantes sont une partie intégrante du processus de la transformation. Les connaissances accumulées dans ce domaine ont révolutionné l'aptitude à diriger la culture.

La régénération de plantes fertiles à partir de cellules cultivées et de protoplastes en combinaison avec de nouvelles méthodes d'introduction de l'ADN et de sélection des cellules transformées a eu pour résultat la production de tournesols transgéniques (LUCAS *et al.*, 2000), (XU HU *et al.*, 2003)

La faculté à la régénération est étroitement liée au génotype utilisé (DEGLENE *et al.* 1997). Des QTL pour les traits organogénétiques ont été cartographiés par DEGLENE *et al.* (1997) et BERRIOS *et al.* (2000). JAMBHULKAR (1995) a développé une technique rapide de culture d'embryon immature de tournesol qui peut réaliser cinq cycles en une année. Une méthode à haute fréquence de régénération (72%) via l'embryogenèse somatique pour plusieurs génotypes de tournesol a été mise au point par FIORE *et al.* (1997). SUJATHA *et PRABAKARAN* (2001) ont trouvé que l'embryogenèse peut être réalisée à haute fréquence en utilisant le milieu de Gamborg. DEVI *et RANI* (2002) ont utilisé *Agrobacterium rhizogenes* pour induire la formation des racines in vitro.

- **La transformation du tournesol:**

- a -Transformation par *Agrobacterium*:**

C'est la méthode la plus efficace pour la transformation du tournesol. Toutefois, la transformation dépend du génotype. En blessant les explants par un bombardement par des particules avant l'inoculation du méristème par *Agrobacterium*, on augmente significativement la fréquence (DURANTE *et al.* 2002).

- b-La biolistique:**

Cette méthode peut être utilisée pour la transformation du tournesol et son efficacité dépend du matériel utilisé (DURANTE *et al.* 2002).

- **La transformation des chloroplastes:**

Récemment, le génome chloroplastique est devenu un but attractif pour les modifications génétiques, plusieurs exemples et protocoles ont été développés (LU *et al.*, 2007).

Cette technologie est spécialement importante dans la biotechnologie du tournesol notamment de ce qui est de la biosécurité. Comme le génome chloroplastique est à transmission maternelle, la dissémination de pollen issu de tournesol dont la transgénèse a visé le génome chloroplastique ne présente aucun danger pour l'environnement.

- **Génomique et biologie moléculaire:**

La taille du génome du tournesol est estimée à 3,189 millions paires de base (ARUMUGANATHAN et EARLE 1991). Le projet du génome du tournesol à été initié et une banque EST est disponible. Le nombre séquences de gène de tournesol déposés dans *GenBank* n'a cessé de croître et environ 40 000 EST de tournesol ont été assemblées (cgpdb.ucdavis.edu). L'assemblage est constitué de 12 000 gènes. Environ 12886 EST ont été apportés par le secteur public et sont disponible dans GnpSeq (genoplante-info.infobiogen.fr/)(KOZIK *et al.* 2003).

- **La cartographie génétique du tournesol:**

Les programmes d'hybridation ont été accélérés significativement par l'utilisation des marqueurs moléculaires (RFLP, RADP, SSR, SNP) et de la sélection assistée par marqueurs. (TANKSLEY *et al.* 1998); (ROMMENS and KISHORE 2000). Une carte SSR du génome du tournesol a été faite par TANG *et al.*, (2002). Un grand nombre de QTLs relatif à la teneur des graines en huile et à des traits agronomiques ont été cartographiés et analysés par AFLP et SSR :

Tableau I-1 : Gènes de tournesol publiés (LU *et al.*, 2007)

| Nom du gène | Fonction | Référence |
|-----------------------|--------------------------------|--|
| Asparagine synthetase | Métabolisme des acides aminés | Herrera Rodriguez <i>et al.</i> (2002) |
| Sulfur-rich albumin | Teneur en Méthionine | Wang <i>et al.</i> (2001) |
| RPS4 | Protéines ribosomiques | Regina <i>et al.</i> (2002) |
| PEX6 | Biogenèse du Peroxysome | Kaplan <i>et al.</i> (2001) |
| Cytochrome c oxidase | Voies respiratoires | Curi <i>et al.</i> (2002) |
| ORFB | Stérilité male cytoplasmique | Sabar <i>et al.</i> (2003) |
| PET1 | Stérilité male cytoplasmique | Horn <i>et al.</i> (1996) |
| Ha-LTP5 | Transfert des lipides, Défense | Regente and de la Canal (2003) |
| Alpha-galactosidase | Protéines de la graine | Kim <i>et al.</i> (2003) |

| | | |
|-----------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| Thiolase II | Métabolisme des acides gras | Schiedel et al. (2004) |
| ACP desaturase | Modification de l'huile | Rousselin et al. (2002) |
| FAD2 | Modification de l'huile | Martinez-Rivas et al. (2001) |
| Alpha-tubulin | Développement du pollen | Evrard et al. (2002) |
| LIM domain protein | Développement du pollen | Baltz et al. (1999) |
| SF21 | Développement du pistil | Krauter-Canham et al. (2001) |
| Lea | Embryogenèse | Prieto-Dapena et al. (1999) |
| HaHSFA9 | Embryogenèse | Almoguera et al. (2002b) |
| Tubulin | Structure cellulaire | Evrard et al. (2002) |
| Cyclin | Division cellulaire | Freeman et al. (2003) |
| SERK | Embryogenèse somatique | Thomas et al. (2004) |
| Habb-4 | Facteur transcriptionnel | Palena et al. (1999) |
| MADS-box genes | Facteur transcriptionnel | Dezar et al. (2003) |
| HAKN1,2,3 | Facteur transcriptionnel | Tioni et al. (2003) |
| ABP1 | Signal de l'auxine | Thomas et al. (2003) |
| SOD and GPX | Système antioxydant | Herbette et al. (2003) |
| Guanylate kinase | Stress hydrique ou salin | Liu and Baird (2003) |
| LytB | Stress hydrique ou salin | Liu and Baird (2003) |
| Dehydrin | Résistance à la sécheresse | Giordani et al. (1999) |
| TIP | Résistance à la sécheresse | Sarda et al. (1999) |
| Hsp | Protéines de choc thermique | Coca et al. (1996) |
| NBS-LRR | Résistance aux maladies | Plocik et al. (2004) |
| RGAs | Résistance aux maladies | Radwan et al. (2003) |
| RGCs | Résistance au mildiou downy | Gedil et al. (2001) |
| PKS and RAS | Résistance aux maladies | Bidney et al. (2003) |
| Pathogen-induced gene | Réponse aux pathogènes | Mazeyrat et al. (1998) |
| Lectin | Résistance aux maladies | Nakagawa et al. (2000) |
| Proteinase inhibitor | Défense | Kouzuma et al. (2001) |
| Carbohydrate oxidase | Active la défense | Custers et al. (2004) |
| PR5 | Active la défense | Hu et al. (2003) |
| Defensin | Active la défense | Hu et al. (2003) |
| SOC | Active la défense | Hu et al. (2003) |
| AAC oxidase | Défense et réponse aux lésions | Liu et al. (1997) |
| AHAS 1,2,3 | Résistance aux herbicides | Kolkman et al. (2004) |
| Metallothioneins | Détoxification des métaux | Chang et al. (2004) |
| Hela 2 | Allergène | Asturias et al. (1998) |

I-4-2-Appports des biotechnologies dans l'amélioration du tournesol:

- **Résistance aux insectes:**

Dans plusieurs zones où le tournesol est cultivé, les insectes causent de considérables pertes de rendement.

Des chercheurs (**POZZI et al. 2000**); ont transformés des plantes de tournesol en utilisant les gènes *cyr1F* et *cry1Ac* de *Bacillus turengiensis*.

Les plantes transformées souffrent moins des attaques de lépidoptères et ont un rendement 50% plus élevé que les plantes non transformées, des expériences menées sous serres montrent que le transgène n'a pas d'effets nuisibles sur les plantes transformées.

- **La résistance aux herbicides:**

Essentiellement contre la phosphinothricine (ou glufosinate) et le glyphosate qui sont à spectre large et très utilisés à cause de leur moindre toxicité pour les mammifères et leur rapide biodégradation. La résistance du tournesol transgénique à l'imidazolinone provient d'un parent résistant qui a été découvert à Kansas (**Lu et al., 2007**).

- **La résistance aux maladies:**

L'hybridation classique a apporté au tournesol cultivé la résistance à la plupart des races de mildiou et de rouille. Jusqu'ici, une totale résistance à *Sclerotinia* n'a pas été apportée (**Lu et al., 2007**).

Un tournesol transgénique beaucoup moins sensible à *Sclerotinia* a été obtenu par l'introduction *via Agrobacterium* du gène *OXO* provenant du blé (**LU et al., 2007**), (**SCELONGE et al., 2000**). Lorsque les plantes transgénique sont croisées avec des lignées de tournesol résistantes à *Sclerotinia* la descendance qui hérite le transgène est beaucoup plus résistante.

Il est possible d'accroître la résistance à *Sclerotinia* en combinant la résistance naturelle à celle apportée par le gène *OXO* (**LU et al., 2007**).

- **La tolérance aux stress abiotique:**

LIU et BAIRD (2003) ont pu cloner et caractériser dans le tournesol cinq cDNA régulés par la sécheresse et 12 régulés par la salinité. Ces gènes et autres inclus dans les systèmes de défense sont très utiles dans l'ingénierie de la tolérance aux stress abiotiques.

- **Amélioration des traits liés à la qualité:**

- a- La qualité d'huile:**

Le but est d'avoir une huile à faible teneur en acides gras saturés et une forte teneur en acides gras insaturés. Un tournesol produisant une huile à haute teneur en acide oléique a été obtenu par **KATZ (1997)**. La surexpression dans les graines de tournesol du gène codant pour

la Δ -9-stearoyl desaturase de *Ricinus communis* réduit considérablement le taux de l'acide stéarique et l'expression antisens du gène codant pour la stearyl-ACP desaturase dans le tournesol diminue considérablement le taux des acides saturés (LU *et al.*, 2007).

b- Teneur et composition en protéines :

L'augmentation de la teneur en protéine est essentielle pour l'amélioration de la qualité du tourteau. Malheureusement, le caractère teneur en protéines est étroitement corrélé négativement avec celui de la teneur en huile. Le tournesol étant avant tout considéré comme une plante oléagineuse, la sélection pour ce caractère semble compromise. Par contre, des progrès dans la qualité des protéines semblent accessibles grâce à l'usage de la transgénèse. Des stratégies permettant d'augmenter les teneuses en lysine et en méthionine ont déjà été mises au point (DORE et VAROQUAUX F, 2006).

- **Flux de gène et biosécurité:**

Le pollen de tournesol reste viable pendant plusieurs mois dans une chambre acclimatée (LU *et al.*, 2007). Le flux de gène entre tournesol cultivé (notamment le transgénique) et espèces sauvages est très documentés (FAURE *et al.* 2002; LU *et al.*, 2007). Par exemple, le gène de résistance à l'imidazolinone peut être transmis de tournesol transgénique à des tournesols non transgéniques et autres sauvages (MASSINGA *et al.* 2003). Ce flux de gènes a beaucoup limité les potentialité des applications des biotechnologies nouvelles au tournesol (LU *et al.*, 2007). BURKE et RIESEBERG (2003) ont pu démontrer que les hybrides entre tournesol sauvage et tournesol OGM porteurs de gène *OXO* produisent moins de graine et de ce fait la diffusion de ce gène dans l'environnement par le pollen est minime. En plus, il existe plusieurs voies pour empêcher le flux de gènes entre espèces cultivées et les espèces sauvages. Par exemple, la transformation du chloroplaste est une solution de choix pour lutter contre le flux de gène entre OGM et plantes non modifiées.

I-5-Utilisation des lignées recombinantes pour l'étude d'un caractère complexe:

La variation d'un caractère peut être due à l'effet d'un seul gène (caractère monogénique) et dans ce cas des phénotypes « mutants » peuvent être comparés à des phénotypes « sauvages ». Or, la plupart des traits importants au niveau agronomique sont soumis à des variations continues et sont contrôlés par plusieurs locus (VEDELLE et LOUDET, 2001).

Lorsque cette variation est continue, on parlera d'un caractère quantitatif qui pourra être mesuré sur un grand nombre d'individus. La génétique mendélienne explique ces variations continues en faisant intervenir non plus un mais plusieurs locus qui interviennent pour une plus ou moins grande part dans la variation de ce caractère et qui sont répartis sous leurs différentes formes alléliques dans une population. Ces locus sont présents en ségrégation dans la population étudiée. Pour les identifier, il faut relier pour chaque individu de la population le génotype et le phénotype de cet individu (**VEDELLE et LOUDET, 2001**).

Les populations en ségrégation les plus efficaces pour étudier ces caractères sont les lignées recombinantes. Elles sont généralement issues de croisement entre des lignées fixées. Le croisement conduit à la recombinaison de parties de chromosomes appartenant aux deux lignées parentales (**PLOMIN *et al.*, 1998**).

Elles sont appelés recombinantes parce qu'elles sont toutes constituées de descendants de la génération F2 qui a été elle-même créée par un accouplement initial entre deux lignées parentales (**PLOMIN *et al.*, 1998**).

A chaque génération un individu est choisi, qui sera à l'origine de la génération suivante. Ces populations de lignées offrent plusieurs avantages :

- Le taux d'hétérozygotie diminue à chaque génération (il n'est plus que de 3% environ à la génération F6)
- Après plusieurs autofécondations, tous les individus d'une lignée n sont génétiquement identiques entre eux et identiques à la lignée n-1
- Par le jeu des méioses successives chaque lignée correspond à une combinaison particulière d'allèles (lignée recombinantes ou *Recombinant Inbred Lines*, RILs) (Fig. I-7).

En raison des recombinaisons dans les générations successives, les lignées recombinantes expriment des recombinaisons d'allèles différents de ceux des lignées parentales du départ.

Quand les lignées parentales ont des allèles différents pour un locus, chaque lignée devient homozygote pour l'un ou l'autre allèle tout au long des accouplements consanguins successif. Ainsi, environ la moitié des lignées sont homozygotes pour un allèle et l'autre moitié est homozygote pour l'autre allèle (**VEDELLE et LOUDET, 2001**).

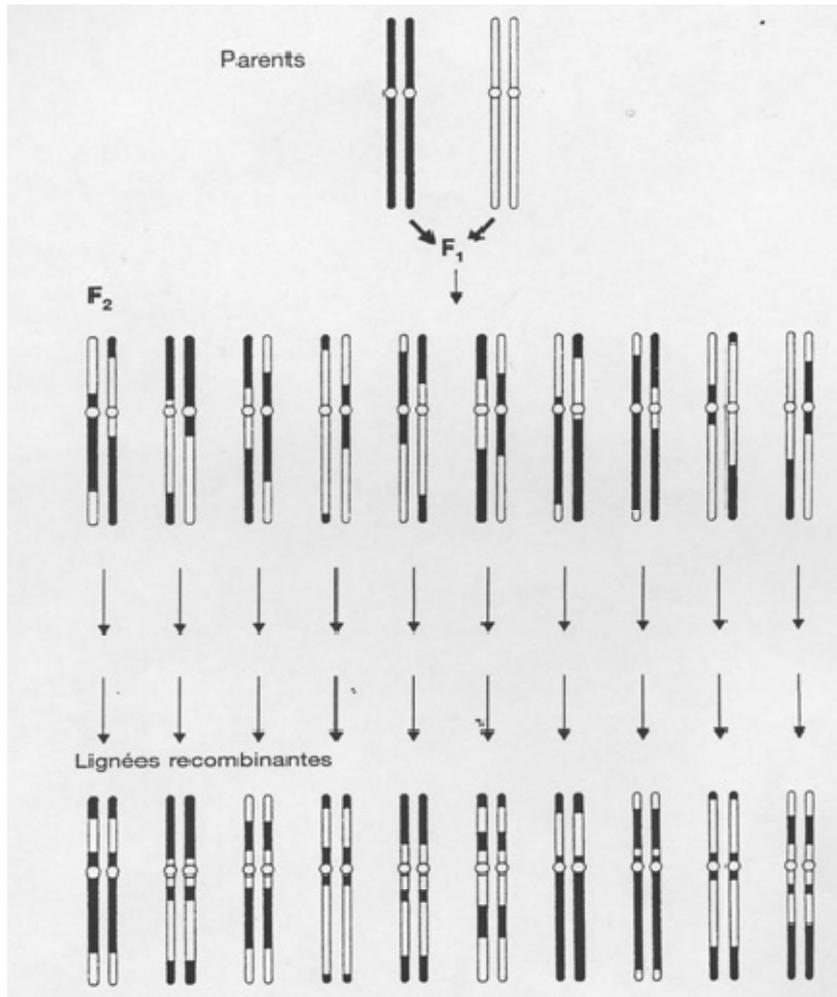


Fig. I-7 : Lignées recombinant (VEDELLE et LOUDET, 2001).

CHAPITRE II
MATERIEL & METHODES

II-Matériel et méthodes :

Notre travail se divise en deux parties :

- La première partie a pour but de caractériser une population de 100 génotypes de tournesol par rapport à la réponse au stress hydrique.
- La deuxième partie part des résultats de la première et consiste en une étude comparative de quelques paramètres morphologiques et biochimiques *in vitro* chez des génotypes qui ont été choisis en fonction de leur réponse au déficit hydrique.

II-1-Première expérimentation :

II-1-1-Matériel végétal :

L'étude a été menée sur 100 génotypes de tournesol (*Helianthus annuus. L*) :

Tableau II-1 : Présentation des génotypes utilisés lors de la première expérimentation.

| N° | Lignée | N° | Lignée | N° | Lignée | N° | Lignée |
|----|---------------|----|---------------|----|--------------|----|---------------|
| 1 | C 100 | 26 | C 134a | 51 | C 60b | 76 | LR 25 |
| 2 | C 101 | 27 | C 135 | 52 | C 61 | 77 | LR 29 |
| 3 | C 103 | 28 | C 137 | 53 | C 62 | 78 | LR 32 |
| 4 | C 104 | 29 | C 138 | 54 | C 64 | 79 | LR 34 |
| 5 | C 105 | 30 | C 139 | 55 | C 70 | 80 | LR 35 |
| 6 | C 106 | 31 | C 141a | 56 | C 71 | 81 | LR 39 |
| 7 | C 107a | 32 | C 142 | 57 | C 74 | 82 | LR 4 |
| 8 | C 107b | 33 | C 143 | 58 | C 77 | 83 | LR 41a |
| 9 | C 108 | 34 | C 144 | 59 | C 78 | 84 | LR 42 |
| 10 | C 112 | 35 | C 146 | 60 | C 79 | 85 | LR 44 |
| 11 | C 113 | 36 | C 148 | 61 | C 80 | 86 | LR 45 |
| 12 | C 115 | 37 | C 150 | 62 | C 82 | 87 | LR 5 |
| 13 | C 120 | 38 | C 153b | 63 | C 83 | 88 | LR 51 |

| | | | | | | | |
|----|---------------|----|--------------|----|---------------|-----|---------------------|
| 14 | C 121 | 39 | C 33 | 64 | C 88 | 89 | LR 53 |
| 15 | C 122 | 40 | C 34 | 65 | C 89 | 90 | LR 54 |
| 16 | C 123 | 41 | C 36 | 66 | C 90 | 91 | LR 55 |
| 17 | C 124 | 42 | C 39 | 67 | C 91 | 92 | LR 59 |
| 18 | C 125a | 43 | C 40 | 68 | C 93 | 93 | LR 62 |
| 19 | C 125b | 44 | C 41 | 69 | C 94 | 94 | LR 63 |
| 20 | C 126 | 45 | C 42 | 70 | C 98a | 95 | LR 64 |
| 21 | C 127 | 46 | C 43 | 71 | LR 1 | 96 | LR 67 |
| 22 | C 128 | 47 | C 46a | 72 | LR 16b | 97 | LR 7 |
| 23 | C 130b | 48 | C 54 | 73 | LR 18b | 98 | LR 8 |
| 24 | C 131 | 49 | C 55 | 74 | LR 19 | 99 | PAC 2* |
| 25 | C 133 | 50 | C 59 | 75 | LR 20a | 100 | RHA 266* |

(* génotypes parentaux)

Le matériel végétal nous a été fourni par l'INSAT Toulouse (France).

Ce travail a été conduit au niveau du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV) à *Chaab Ersas* (Université *Mentouri*, Constantine).

II-1-2-Condition et mode de culture :

La culture a été réalisée dans des pots en plastique de trois kilogrammes contenant un mélange 2/3 terre + 1/3 sable. Après la levée, trois plantules sont maintenues par pot.

Les pots sont disposés à l'air libre et une irrigation à saturation leur est fournie.

Un traitement par un insecticide *Dursban*® à été réalisé après deux semaines de culture.

II-1-3-Stade de mesure :

L'étude de l'effet du manque d'eau sur les différents génotypes étudiés a été réalisée au stade 3^{eme} et 4^{eme} feuille appelé chez le tournesol stade B3-B4 et qui correspond à 21 jours de développement (voir Annexe).

Le stress est appliqué par arrêt totale de l'irrigation pendant une semaine et qui correspond à 34 % de la capacité au champ.

La veille de l'application du stress les pots ont été irrigués à saturation. Une première mesure des paramètres physiologiques a été faite le lendemain matin et servira de témoin.

Après une semaine de manque d'eau, les mêmes mesures ont été reprises et qui sont utilisés pour caractériser la contrainte hydrique.

II-1-4-Caractérisation de la contrainte hydrique :

II-1-4-1-La teneur relative en eau (TRE %) :

La teneur relative en eau (TRE) est l'un des critères d'évaluation de la tolérance à la sécheresse, proposée par **CLARK et MAC-GAIG (1982)**, ces auteurs ont montré que la (TRE) diminue lorsque le stress hydrique augmente.

Selon cette méthode les feuilles coupées sont directement pesées (Poids frais **PF**) et plongées dans des tubes à essai remplis d'eau distillée, les tubes sont placés dans l'obscurité dans un endroit frais, après 24H, les feuilles saturées sont pesées de nouveau (poids de turgescence **PPT**), enfin l'échantillon est mis à sécher à l'étuve à 85°C et pesé une dernière fois après 48H (poids sec **PS**).

La teneur relative en eau est mesurée suivant la méthode de **BARRS, (1968)** in (**BOUARROUDJ, 2003**) :

$$\text{TRE (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / (\text{PPT} - \text{PS}) \times 100$$

II-1-4-2-Résistance stomatique (RS s.m⁻¹) :

La fermeture des stomates est une des réponses précoces au déficit hydrique, elle se fait en quelques minutes (**ASSMANN et al., 2000**), elle a pour but la protection de la plante contre la déshydratation mais cause en même temps une diminution de l'assimilation du carbone ce qui perturbe la photosynthèse (**CECHIN et al., 2006**).

La résistance stomatique est mesurée à l'aide d'un poromètre à diffusion de vapeur d'eau, type *Delta Devices MK3®*, sur la partie médiane de la feuille (**YKHLEF, 2001**). Le poromètre est un ensemble portatif muni d'une pince à l'intérieur de laquelle se trouve une coupelle dotée d'un détecteur de vapeur et de deux thermistances. La mesure de la résistance stomatique consiste à insérer une feuille toujours attachée à la plante dans la pince où la face

supérieure est en regard de la coupelle. Le temps nécessaire et la vitesse d'humidification de la coupelle sous l'effet de la transpiration foliaire dépend essentiellement, du degré d'ouverture des stomates. La transformation des valeurs lues par le poromètre en résistance stomatique est réalisée en référence à une courbe d'étalonnage.

II-1-4-3- Paramètres associés à la photosynthèse :

- **Taux de chlorophylle totale (TCT SPAD) :**

La mesure du taux de la chlorophylle dans les feuilles a été effectuée avec un chlorophylle-mètre *Minota SPAD®* (*Spectrum Technology Inc, IL, USA*). C'est un radiomètre manuel dont la mesure correspond à un rapport entre les réflectances de la feuille dans le rouge (650 nm) et le proche infrarouge (940 nm). Il s'agit d'une pince permettant de déterminer le taux de chlorophylle présente dans une feuille.

Pour ce faire, l'instrument mesure la transmittance de la feuille dans le rouge R et dans le proche infrarouge PIR, il calcule ensuite le ratio des transmittance et le converti en valeur de SPAD, correspondant à la teneur en chlorophylle de la feuille. Le temps de mesure est très rapide, soit environ trois secondes par mesure.

Pour chaque plante, trois mesures de la teneur en chlorophylle sont prises à l'aide du chlorophylle-mètre. Pour les calculs, seule la moyenne des trois mesures est utilisée. Nous avons donc une mesure par plant, donnée en unités relatives.

- **Fluorescence chlorophyllienne :**

L'énergie lumineuse absorbée par les pigments des feuilles des végétaux supérieurs est utilisées dans les réactions photochimiques de la photosynthèse. Toutefois, une partie de l'énergie incidente n'ayant pas pu être convertie en énergie photochimique est dissipée sous forme d'émission de fluorescence et de chaleur (**YKHLEF, 2001**).

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne est une méthode rapide et non compliquée pour apprécier l'effet du stress environnemental sur le système photosynthétique (**CAI et al., 2007**).

Lorsqu'une feuille est mise à l'obscurité, le système photosynthétique se met au repos après quelques minutes. Si cette feuille est exposée à un flash lumineux, le système photosynthétique répond par un signal de fluorescence comportant deux phases :

- a- une phase d'augmentation très rapide de l'intensité de fluorescence d'une valeur initiale F_0 à une valeur maximale F_m .
- b- Une deuxième phase lente et descendante de l'intensité vers un état stationnaire F_s . Chez des feuilles souffrant de stress hydrique, la phase lente est altérée.

Dans les conditions ambiantes et en présence de la lumière, les centres réactionnels des photosystèmes sont fermés. Pour déterminer les niveaux d'excitation de ces photosystèmes, on mesure la fluorescence chlorophyllienne sous une lumière actinique. Cette étape nous permet d'obtenir les niveaux d'excitation minimale et maximale, dont les valeurs correspondant sont F_s (fluorescence stationnaire) et F_m (fluorescence maximale en présence de la lumière). (OGREN *et* OQUIST, 1985 ; TOIVONEN *et* VIDAVER, 1988; YKHLEF, 2001).

- **Principe et conditions de mesure :**

La mesure de la fluorescence chlorophyllienne a été effectuée sur des feuilles attachées à la plante et adaptées à l'obscurité. Pour cela, on place le clip sur la surface de la feuille pendant 20min. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un FLUOROMETRE modèle *FMS*. Le principe de cet appareil consiste à l'application de courtes impulsions ($1\mu s$) de lumière rouge modulée L_0 à une fréquence de 1.6 KHz et de très faible intensité ($2,45 \mu E. m^{-2}. S^{-1}$), afin d'éviter qu'aucun phénomène d'induction ne puisse être induit. Cette lumière L_0 permet de déterminer la fluorescence initiale (F_0). Suivie de l'application d'une seconde lumière blanche non modulée L_1 (lumière actinique) de plus grande intensité ($160 \mu E. m^{-2}. S^{-1}$), appliquée à une fréquence de 110 KHz.

Parmi les paramètres fournis par le fluoromètre, on a retenu le rendement quantique du PSII (Φ_{PS2}).

II-1-4-4-Surface foliaire (SF mm^2) et poids spécifique foliaire (PSF mg/mm^2) :

La mesure de la surface foliaire qui est un indice nécessaire pour la détermination de la croissance est réalisée selon la méthode de (PAUL *et al.*, 1979) in (BOUARROUDJ, 2003). Cette méthode consiste à reproduire la surface foliaire sur papier, ainsi la surface de la feuille qui est estimée à partir du poids de la feuille en papier par rapport au poids de $1cm^2$ du même papier.

La mesure du poids spécifique foliaire à été faite dans notre cas par rapport au poids frais de la feuille.

II-1-4-5-Etude statistique :

L'étude statistique des résultats obtenus a été faite par analyse de la variance à deux critères (AV_2) par le logiciel *Minitab*.

II-2-Deuxième expérimentation :

La deuxième partie de ce travail consiste en une étude comparative de quelques paramètres morphologiques et biochimiques effectuée sur des vitroplants obtenus par culture *in vitro* des graines de génotypes choisis en fonction de leur comportement vis-à-vis le déficit hydrique lors de la première expérimentation.

II-2-1-Matériel végétal :

L'expérimentation concerne huit génotypes, le tableau ci-dessous présente les génotypes choisis pour la deuxième expérimentation :

Tableau II-2 : Lignées utilisées dans la deuxième expérimentation

| | | | | | | | | |
|-----------|-----------|-------|-----------|--------|----------------|------|--------------------|---------|
| Génotype | C 93 | C 98a | LR 53 | C 134a | LR 67 | LR 4 | PAC2 | RHA 266 |
| Caractère | Tolérants | | Sensibles | | Très sensibles | | Lignées parentales | |

II-2-2-Conduite de la culture *in vitro* :

Le milieu de culture de base utilisé dans notre essai est le milieu MS (**MURASHIGE et SKOOG, (1962) in CIDES (1999)**), il est constitué de sels minéraux (macro et Micro éléments, fer), d'éléments organiques (vitamines, sucres et acides aminés) dissouts dans de l'eau et solidifié par l'addition de l'agar (10 g/L) (Voir annexe).

Ce milieu est, selon le cas additionné ou non de PEG (Polyéthylène glycol).

Le PEG est un polymère inerte non anionique à longue chaîne $HOCH_2(CH_2-O-CH_2)_xCH_2OH$ et d'un poids moléculaire qui varie entre 200 et 20 000. Il est utilisé pour maintenir le milieu expérimental à un potentiel hydrique déterminé (**STEUTER, 1981**). La

pression osmotique générée est fonction de la concentration et du poids moléculaire et sa mesure est essentielle avant chaque expérimentation pour déterminer le niveau de stress.

Pour cela, quatre solutions de milieu MS ont été préparées avec respectivement 0, 5, 10 et 20 % de PEG 600 (Fig. II-1). L'osmolarité de la solution a été déterminée par un osmomètre WESCOR 5500 (Logan, Utah, USA). Il est basé sur la mesure de l'abaissement de la tension de vapeur. Les mesures obtenues sont converties en Π (MPa) en utilisant la formule suivante :

$$\Pi = RTc \quad (\text{MONEY, 1989})$$

Où :

C = L'osmolarité en moles. Kg^{-1} .

RT = $2.446 \text{ Kg.MPa.mol}^{-1}$ à 21°C .

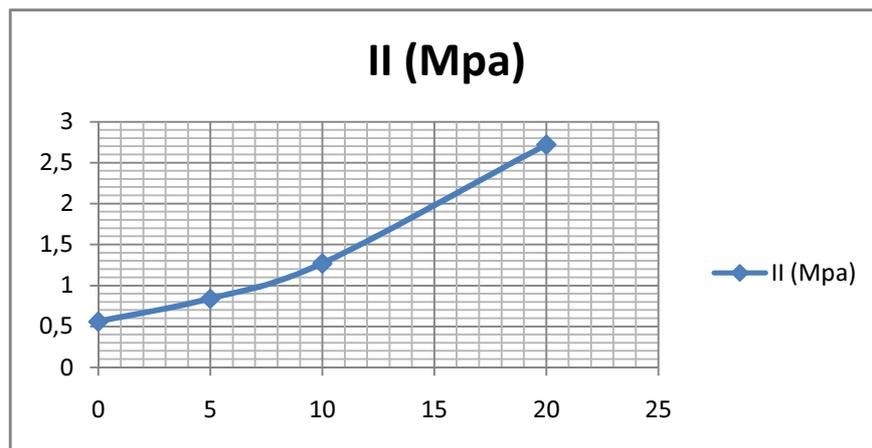


Fig. II.1 : Pression osmotique (Π MPa) en fonction de la concentration du milieu en PEG (%)

La culture in vitro nécessite le maintien de l'asepsie tout le long de l'expérimentation pour ne pas gêner la croissance des plantes d'une part et de ne pas avoir un stress autre que celui sur lequel on travail.

La stérilisation du milieu de culture, de l'eau de rinçage et des contentent en verre est assurée par l'autoclave à une température de 121°C et une pression de 1bar pendant 20 min. La stérilisation des instruments métalliques est assurée par l'étuve à une température de 180°C pendant 30 min.

Les manipulations ont été réalisées sous hotte désinfectée à l'eau de Javel et à proximité de deux becs Bunsen.

- **Prégermination :**

Les akènes sont stérilisés par trempage dans de l'éthanol à 70% en agitant fortement pour dissoudre les substances cireuses pouvant imprégner leur tégument, ils sont ensuite débarrassés de l'éthanol par lavage à l'eau distillée stérile, puis immergés dans une solution d'eau de javel commerciale à 12° diluée deux fois pendant 20 minutes sous une hotte à flux laminaire en agitant fortement, suivi de trois rinçages successifs à l'eau distillé stérile ensuite les péricarpes sont enlevés et les graines sont transportées au moyen d'une pince stérile dans des boîtes de Pétri contenant du milieu MS sans régulateurs de croissance. 4 graines sont disposées régulièrement espacées de manière à éviter les chevauchements des racines pouvant aboutir à une cassure au moment du transfert.

Les boîtes sont fermées avec du *Parafilm*, puis mises sous lumière continue et à température ambiante de 25° C pour la germination.

- **Application du stress :**

Les graines germées de chaque génotype ont été ensuite repiquées dans des tubes de 15x2.5 cm et répartis en deux lots :

- a- Le premier lot sert de témoin (**T**), il est constitué de plantes cultivées sur milieu MS sans PEG.
- b- Le deuxième lot traité est soumis au stress hydrique par abaissement de la pression osmotique du milieu de culture à -1MPa par addition de PEG 600.

Les deux lots (**T** et **S**) seront analysés avec trois répétitions pour chaque génotype.

II-2-3-Stade de mesure :

L'étude de l'effet du stress hydrique et les modifications qu'il induit au niveau du végétal a été réalisée après un mois de développement sur milieu artificiel où le manque d'eau a été stimulé par ajout de PEG.

II-2-4-Caractérisation de la contrainte hydrique chez les vitroplants :

Pour caractériser la croissance sous conditions déficitaires en eau, plusieurs paramètres ont été utilisés :

- **La longueur de la tige (mm).**

- **La longueur de la racine (mm).**
- **Nombre de racine.**
- **Poids frais total (PFT mg).**
- **Poids frais de la racine (PFR mg).**
- **Masse racinaire par unité de volume du milieu (MR/UVM mg/cm³) :**

La masse racinaire par unité de volume du milieu est égale à :

$$\text{Masse racinaire par unité de volume du milieu} = \text{PFR}/20$$

Avec :

PFR : Poids frais de la racine

20 = représente le volume total du milieu (cm³).

- **Rapport poids frais de la racine/Poids frais de la tige (PFR/PFT).**

II-2-5-Etude statistique des données :

Les résultats obtenus ont été analysés par le test d'**AV₂** (Analyse de la variance à deux critères) effectué par le logiciel *Minitab*.

II-2-6-Analyse des protéines totales foliaires par SDS-PAGE :

- **Principe :**

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel (un polymère) sous l'effet d'un champ électrique (**DICKO, 2006**). L'une des variantes les plus répandue de l'électrophorèse est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) décrite par **Ulrich LAEMMLI** en **1970** et qui est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (**DICKO, 2006**).

- **Extraction des protéines foliaires totales :**

A la fin de l'essai, les feuilles des vitroplants ont été utilisées pour la SDS-PAGE. Plusieurs méthodes d'extraction ont été utilisées, la méthode qui a donnée des résultats fiables est celle citée par **DE LEONARDIS et al., (2007)** et qui a été réalisée sur des feuilles de blé :

Broyage de 100 mg de matière fraîche dans un mortier avec de l'azote liquide.

Ajout de 1 ml de **solution A** (Solution de précipitation). (Voir annexe).

Incubation pendant 1 heure à -20°C.

Centrifugation de 15 min à 13 000 trs.

Élimination du surnageant.

Lavage des culots par 1 ml de la **solution B** (solution de rinçage). (Voir annexe).

Incubation pendant 1 heure à -20°C. (Faire une petite centrifugation si le culot s'est détaché).

Élimination du surnageant.

Séchage de culots dans l'étuve à 60°C pendant 2 à 3 min (il ne faut pas qu'ils soient trop secs).

Réduire en poudre les culots (à l'aide d'une baguette en verre).

Solubilisation de la poudre obtenus dans 100 µl de *Laemmli buffer* (125 mM Tris HCl pH 6.8, 2% SDS, 2% b-mercaptoethanol, 5% glycerol) en vortexant et en mettant à 100°C pendant 5 min.

Centrifugation de 10 min à 10 000 t/min.

- **Conditions de migration :**

La migration a été réalisée ensuite selon **Laemmli., (1970)** in **DICKO, (2006)** sur un gel **T= 15%, C = 0.027** sous ampérage constant de 80 mA.

Le premier puits de chaque gel a été consacré aux marqueurs de poids moléculaire : **Kit LMW Ge Healthcare UK** (Tableau II-2).

Tableau II-2 : Composition du Kit LMW.

| Protéine | Poids moléculaire (KDa) |
|---|--------------------------------|
| Phosphorylase b | 97 |
| Albumine sérique bovine | 66 |
| Ovalbumine | 45 |
| Carbonique anhydrase | 30 |
| Inhibiteur de la trypsine | 20.1 |
| α-Lactalbumine | 14.4 |

- **Révélation :**

La révélation a été faite par coloration et fixation pendant toute une nuit dans une solution contenant du TCA et du bleu de Coomassie R-250. (Voir annexe). La décoloration a été réalisée par plusieurs rinçages à l'eau distillée.

II-2-7-Traitement des données :

Les photos des gels obtenus ont été analysées par le logiciel *Photocapt 8*.

Il calcule le poids moléculaire de chaque bande détectée par comparaison de son rapport frontal à celui des bandes du marqueur de poids.

CHAPITRE III
RESULTATS & DISCUSSION

III-1-Résultats et discussion

PREMIERE PARTIE

III-1-1-Survie au stress des géotypes de tournesol étudiés :

Nous rappelons que cette première partie a pour but de caractériser une population de 100 géotypes de tournesol par rapport à la réponse au stress hydrique. Après levées, trois plantes ont été maintenues par pot. Le stress a été appliqué au stade 3^{eme} et 4^{eme} feuille par arrêt total de l'irrigation pendant une semaine. Le comportement des différents géotypes nous a permis de les répartir sur trois groupes (tableau III-1):

Groupe A: ce groupe est constitué de géotypes qui ont une survie totale (trois plantes semées-trois plantes ont survécues).

Groupe B : il est constitué de géotypes dont moins de trois plantes ont survécues (une ou deux).

Groupe C : ce sont les géotypes qui ne survivent pas.

Tableau III-1 Réponse des 100 géotypes de tournesol étudiés au stress hydrique appliqué

| Groupe | Géotypes |
|--------|---|
| A | C 137, C 144, C 146, C 42, C 83, C 91, C93, C 98a |
| B | C 100, C 101, C 103, C 107a, C 107b, C 112, C 121, C 122, C 125b, C 127, C 128, C 131, C 134a, C 139, C142, C 33, C 36, C 46a, C 80, C 82, C88, C 89, C 90, C 94, LR 53, PAC 2 |
| C | C 104, C105, C 106, C 108, C 113, C 115, C 120, C 123, C 124, C 125a, C 126, C 130b, C 133, C 135, C 138, C 141b, C 143, C 148, C 150, C 153b, C 34, C 39, C 40, C 41, C 43, C 54, C 55, C 59, C 60b, C 61, C 62, C 64, C 70, C 71, C 74, C 77, C 78, C 79, LR 1, LR 16b, LR 18b, LR 19, LR 20a, LR 25, LR 29, LR 32, LR 34, LR 35, LR 39, LR 4, LR 41a, LR 42, LR 44, LR 45, LR 5, LR 51, LR 54, LR 55, LR 59, LR 62, LR 63, LR 64, LR 67, LR 7, LR 8, RHA 266 |

Les résultats ainsi obtenus nous montrent que plus de la moitié de la population est constituée de génotypes dont on a une absence totale de survie et que seulement 8 % de cette population présentent une survie totale (fig. III-1).

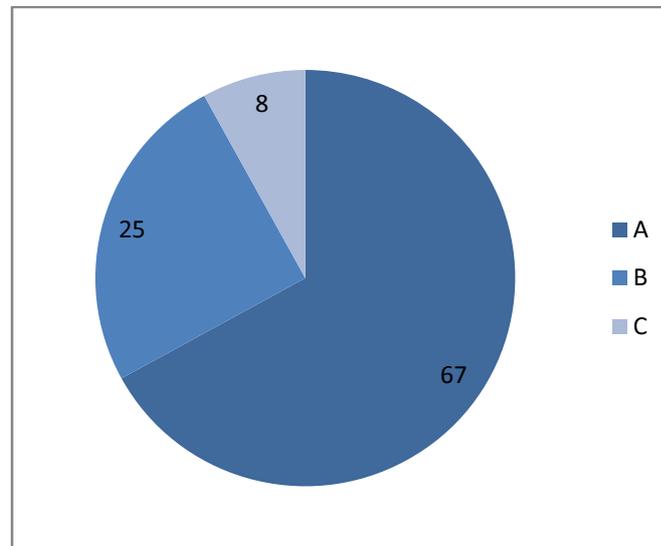


Fig. III-1 : Pourcentage de survie des génotypes de tournesol étudiés.

Les plantes répondent au déficit hydrique par des modifications morphologiques, physiologiques et métaboliques. Selon l'efficacité de la réponse les plantes peuvent ou pas survivre à la sécheresse (OUVRARD *et al.*, 1996). Dans le cas d'un stress dépassant la capacité de résistance de la plante, la dessiccation et la mort de celle-ci sera la conséquence (LAMAZE *et al.*, 1994).

L'effet du stress peut être quantifié par la mesure de la survie et des dommages causés (SCHULZE *et al.*, 2005)

Ainsi nous pouvons conclure que les génotypes du **Groupe A** sont tolérants au manque d'eau, ceux du **Groupe B** sont sensibles et ceux du **Groupe C** sont très sensibles. L'étude statistique des données ne portera que sur les génotypes du **Groupe A**.

III-1-2-Teneur Relative en Eau (TRE %) :

Les TRE enregistrées chez les génotypes du **groupe A** se situaient entre 92.94 ± 2.80 % chez **C 144** et 74.53 ± 3.98 % chez **C 64**. Les TRE des deux parents étaient de 86.64 ± 1.79 % chez **PAC 2** et 79.84 ± 2.40 % Chez **RHA 266** (tableau III-2).

Le stress hydrique a induit une baisse de la TRE chez tous les génotypes du **groupe A**. La diminution varie entre 23.59% chez **C 93** et 40.44% chez **C 42** (fig. III-2).

D'après le test de l'analyse de la variance effectué sur les individus du **groupe A**, les deux essais présentent une différence très hautement significative (voir Annexes).

La **TRE** est un indicateur très utilisé pour mettre en évidence l'état de la balance hydrique d'une plante. **MATIN *et al.*, (1989)** suggèrent que les géotypes qui arrivent à maintenir une **TRE** élevée sous stress hydrique sont des géotypes tolérant à la sécheresse, ainsi **LEVITT, (1980)** constate que la capacité de maintenir un potentiel hydrique élevé a été considérée comme un mécanisme qui permet à la plante d'esquiver la déshydratation.

III-1-3-Résistance stomatique (RS s.m⁻¹) :

En conditions de bonne alimentation hydrique, les géotypes de tournesol étudiés présentent un profil transpiratoire différent. Les valeurs de la résistance stomatique varient entre 2.35 ± 0.82 s.m⁻¹ pour le géotype **C 101** et 201.33 ± 33.70 s.m⁻¹ chez **C 55**. Les valeurs enregistrées chez les parents sont de l'ordre de 27.5 ± 6.45 s.m⁻¹ pour **PAC 2** et 17.83 ± 1.55 s.m⁻¹ pour **RHA 266**. Les lignées du **groupe A** présentent une **RS** allant de 07.23 ± 1.23 s.m⁻¹ chez **C 137** à 26.80 ± 0.60 s.m⁻¹ chez **C 93** (tableau **III-2**).

Après 8 jours de stress, on révèle un comportement transpiratoire spéciale pour les géotypes **C 98a** et **C 93**, chez ces derniers la **RS** est de 22.66 ± 03.45 s.m⁻¹ et 034.83 ± 00.76 s.m⁻¹ respectivement. La plus grande résistance stomatique observée dans ce groupe est de 256 ± 16 s.m⁻¹ chez **C 137**(tableau **III-2**).

Le test d'analyse de la variance effectué sur les individus du **groupe A** renseigne sur une différence très hautement significative entre les deux essais (voir Annexes).

La fermeture des stomates est une des réponses précoces au déficit hydrique, elle se fait en quelques minutes (**ASSMANN *et al.*, 2000**), elle a pour but la protection de la plante contre la déshydratation mais cause en même temps une diminution de l'assimilation du carbone ce qui perturbe la photosynthèse (**CECHIN *et al.*, 2006**).

KIANI *et al.*, (2007) ont démontrés qu'il existe une forte variabilité génotypique de la conductance stomatique (qui est l'inverse de la **RS**) chez le tournesol. **GRIEU *et al.*, (2008)** rapportent qu'il existe chez le tournesol une différence génétique de performance des géotypes en termes de contrôle du taux de transpiration. Les géotypes à faible conductance stomatique sont plus sensibles au déficit de vapeur de l'air et à la baisse du potentiel hydrique foliaire que les géotypes à forte conductance.

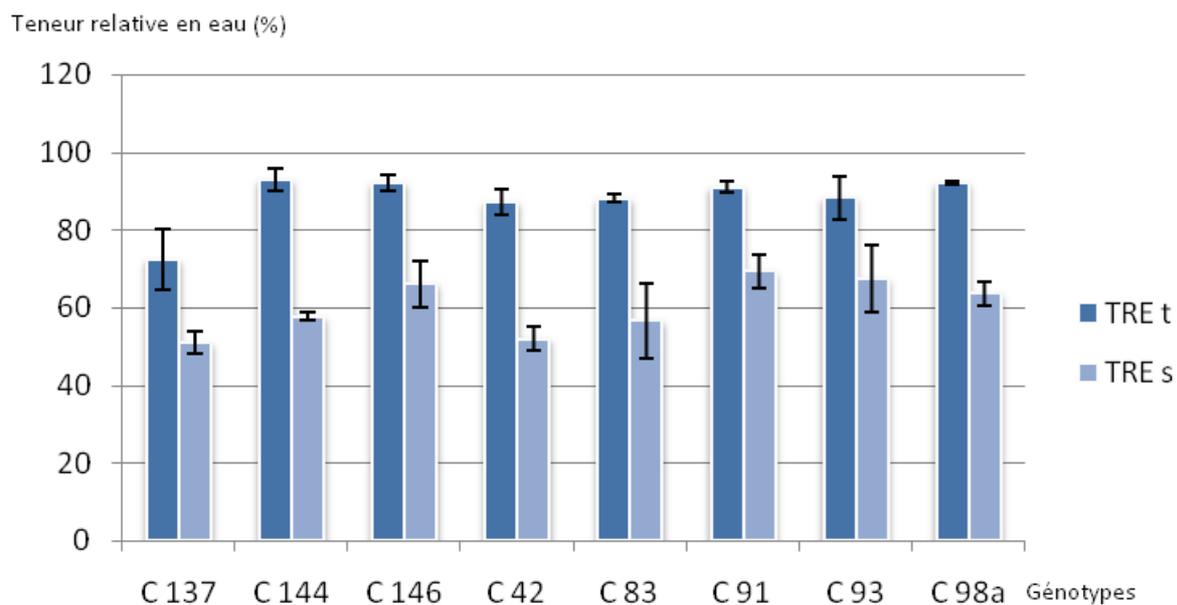


Fig. III-2 : Teneurs relatives en eau enregistrées chez les génotypes du **groupe A** (%)

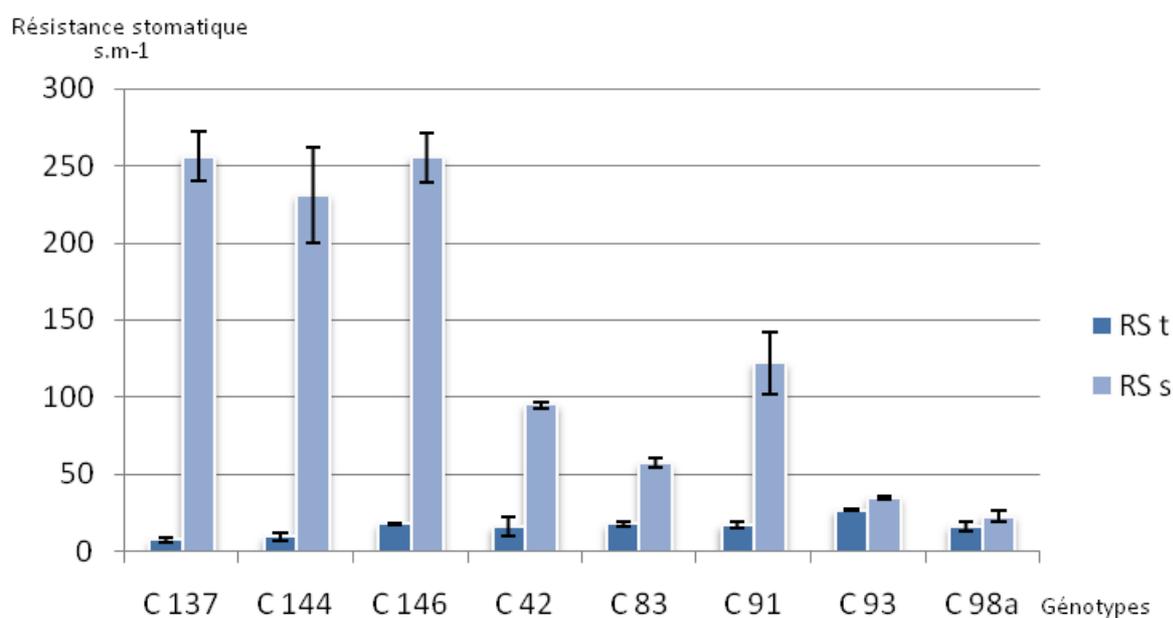


Fig. III-3 : Valeurs de la résistance stomatique enregistrées chez les génotypes du **groupe A** (s.m⁻¹)

III-1-4- Paramètres associés à la photosynthèse :

- **Teneur en chlorophylle totale (TCT SPAD) :**

Avant l'application du stress les génotypes étudiés présentent des TCT variées. La plus grande valeur est de $34,23 \pm 4,98$ SPAD enregistrée chez le génotype **C 127**. La plus petite valeur été de $21,9 \pm 3,20$ SPAD et qui a été enregistrée chez le parent **RHA 266**. Le parent **PAC 2** a enregistré une TCT de l'ordre de $31,33 \pm 4,40$ SPAD. Les teneurs en chlorophylle totale enregistrées chez les génotypes du **groupe A** varient entre 22.2 SPAD chez **C 42** et 31.93 SPAD chez **C 98a** (tableau III-2).

Après une semaine d'arrêt total de l'irrigation, on a observé une augmentation de la TCT chez la plus part des génotypes du **groupe A**. Cette augmentation varie de 31.35 % chez **C 91** à 083 % chez **C 98a**. Par contre, une diminution de 0,1 % la TCT été observées chez **C 144** (fig. III-4).

Le test d'analyse de la variance effectué sur les individus du **groupe A** renseigne sur des différences très hautement significatives entre les deux essais (voir annexes).

- **Rendement quantique du PS2 (Φ PS2) :**

Avant l'application du stress on observe des Φ PS2 allant de $0,442 \pm 0,081$ pour la lignée **LR 67** à $0,848 \pm 0,011$ pour la **C 100**. Les valeurs observées chez les deux parents sont de $0,491 \pm 0,044$ pour **PAC 2** et de $0,728 \pm 0,006$ pour **RHA 266**.

A l'intérieur du groupe A, les valeurs observées varient entre $0,449 \pm 0,021$ pour **C 144** et $0,773 \pm 0,048$ mesurée chez **C 98a**.

Après une semaine de stress, on a pu observer des valeurs supérieures aux témoins.

Ainsi les rendements quantiques du PS2 varient chez les génotypes du **groupe A** entre $0,707 \pm 0,056$ pour la lignée **C 42** et $0,835 \pm 0,014$ pour la **C137** (tableau III-2).

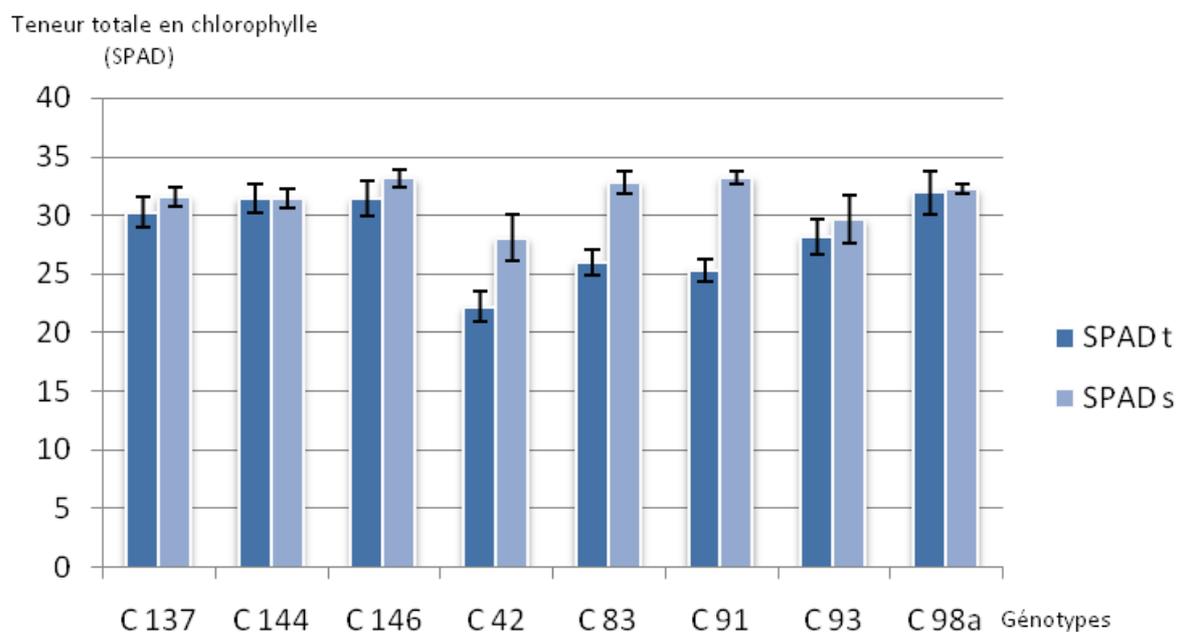


Fig. III-4 : Teneurs totales en chlorophylle enregistrées chez les génotypes du **groupe A** (SPAD)

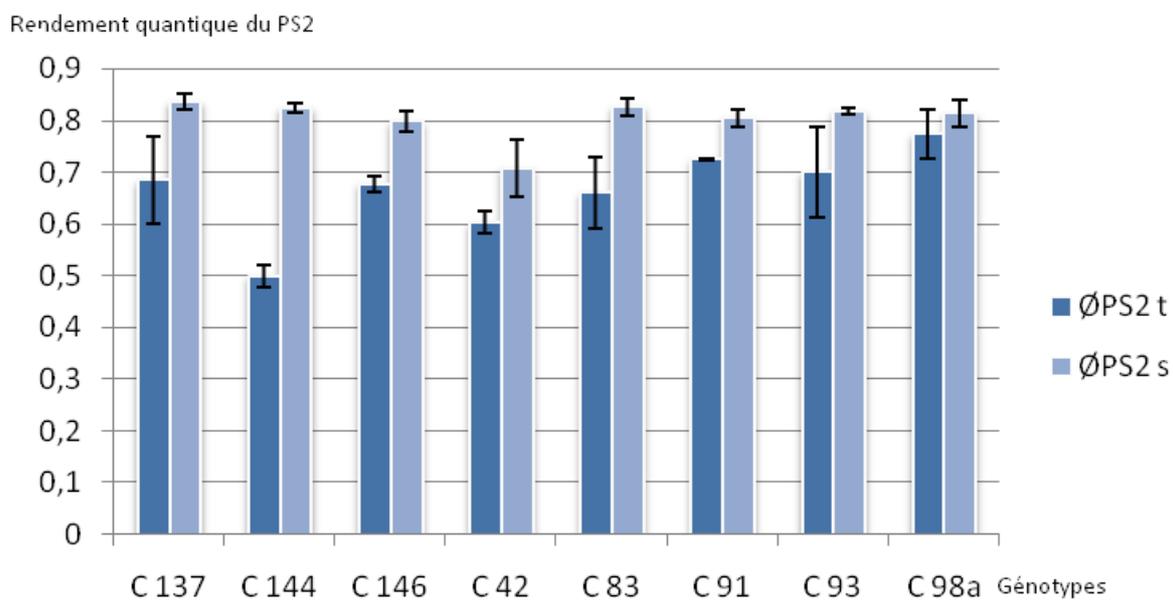


Fig. III-5 : Valeurs du rendement quantique du PSII (\emptyset PS2) enregistrées chez les génotypes du **groupe A**

CORNIC *et al.*, (2000) estiment que la survie des plantes au manque d'eau est en grande partie due à l'entretien de la capacité photosynthétique des feuilles.

Les résultats obtenus dans notre étude indiquent que la teneur en pigments photosynthétiques chez les géotypes du **groupe A** ne limite pas l'assimilation du dioxyde de carbone.

D'autre part, la comparaison des valeurs obtenues sous régime hydrique déficitaire avec celles rapportées par d'autres auteurs ((**FLEXAS *et al.* 1999**) ; **CECHIN *et al.*, (2006)**) renseigne sur un bon déroulement de la photosynthèse. **CECHIN *et al.*, (2006)** ont trouvé que le rendement quantique du PS2 (**Ø PS2**) n'a pas diminué chez des géotypes de tournesol après un stress hydrique de neuf jours.

Tableau III-2 : Valeurs de la TRE, RS, TCT et Ø PS2 enregistrés chez les géotypes du groupe A

| Géotypes | | Teneur relative en eau (TRE) % | Résistance stomatique (RS) s.m ¹ | Teneur en chlorophylle totale (TCT) : SPAD | Rendement quantique du PS2 (Ø PS2) |
|----------|---|--------------------------------|---|--|------------------------------------|
| C 137 | T | 72.37±7.96 | 07.23±1.23 | 30,233±1.28 | 0.684±0.08 |
| | S | 50.93±2.77 | 256.00±16.00 | 31,600±0.78 | 0.835±0.01 |
| C 144 | T | 92.94±2.80 | 09.36±2.37 | 30,233±1.28 | 0.499±0.02 |
| | S | 41.05±4.97 | 230.66±31.00 | 31,433±0.75 | 0.824±0.01 |
| C 146 | T | 92.18±2.15 | 17.60±0.80 | 31,433±1.44 | 0.677±0.01 |
| | S | 66.12±5.91 | 255.66±16.01 | 33,133±0.80 | 0.797±0.02 |
| C 42 | T | 87.21±3.32 | 16.00±6.00 | 22,200±1.30 | 0.602±0.02 |
| | S | 51.94±3.14 | 095.00±02.00 | 28,033±1.97 | 0.707±0.05 |
| C 83 | T | 88.12±1.05 | 17.53±2.19 | 26,000±1.04 | 0.659±0.06 |
| | S | 56.67±9.65 | 057.00±03.00 | 32.800±0.90 | 0.826±0.01 |
| C 91 | T | 90.98±1.40 | 16.90±0.01 | 25,300±0.88 | 0.724±0.00 |
| | S | 69.30±4.35 | 122.00±20.00 | 33,233±0.55 | 0.804±0.00 |
| C 93 | T | 88.24±5.40 | 26.80±0.60 | 28,200±1.47 | 0.699±0.08 |
| | S | 67.41±8.73 | 034.83±00.76 | 29,666±2.05 | 0.817±0.00 |
| C 98a | T | 92.13±0.38 | 16.33±2.97 | 31,933±1.81 | 0.773±0.04 |
| | S | 63.61±3.21 | 022.66±03.45 | 31,400±1.44 | 0.812±0.02 |

III-1-5-Surface foliaire (SF mm²) et Poids Spécifique Foliaire (PSF mg/mm²) :

- **Surface foliaire (SF mm²) :**

Avant l'application du stress, la surface foliaire de la population étudiée varie entre 205.94±58.82 mm² pour **LR 32** et 1096±48.42 mm² enregistrée chez le parent **PAC 2**. La surface foliaire enregistrée chez le parent **RHA 266** est de 242.68±22.26 mm². Les lignées du **Groupe A** présentent des SF allant de 396.72±44.12 mm² pour **C 42** à 710.35±33.17 mm² observée chez la lignée **C 144**.

Après une semaine de manque d'eau, les valeurs de la surface foliaire enregistrées chez les génotypes du **Groupe A** varient entre 389.65±51.47 mm² chez **C 42** et 720.98±44.55 mm² observé chez la lignée **C 144** (tableau III-3).

- **Poids Spécifique Foliaire (PSF mg/mm²) :**

Sous condition de bonne alimentation hydrique on observe des variations considérables du **PSF** entre les génotypes. La valeur la plus élevée est de 0,6244±0.009 mg/mm² révélée chez le génotype **C 41**, le génotype **C 101** présente le **PSF** le plus faible : 0,15893±0.002 mg/mm². Le **PSF** pour les deux parents était de 0,36217±0.05 mg/mm² pour **RHA 266** 0,26074±0.004 mg/mm² pour **PAC 2**. Pour les génotypes du **groupe A**, les valeurs enregistrées variaient entre 0,024795±0.001 mg/mm² pour **C 42** et 0,372±0.04 mg/mm² pour **C 137**(tableau III-3).

Le stress hydrique a causé une baisse du **PSF** chez tous les génotypes du **groupe A**. Cette diminution varie entre 2,83 % chez **C 91** et de 44,16 % **C 137** (fig. III-7).

Le test d'analyse de la variance effectué sur les individus du **groupe A** renseigne sur l'absence de différence entre témoins et stressés pour le paramètre surface foliaire et la présence de différence très hautement significative entre les deux essais pour le paramètre poids spécifique foliaire (voir Annexe).

Tableau III-3 : Valeurs de la surface foliaire et du poids spécifique foliaire enregistrés chez les géotypes du groupe A

| Géotypes | Surface foliaire (SF) mm ² | | Poids spécifique foliaire (PSF) mg/mm ² | |
|----------|---------------------------------------|--------------|--|--------------|
| | Témoins | Stressés | Témoins | Stressés |
| C 137 | 536,74±51,47 | 529,37±44,11 | 0.372±0.0054 | 0.207±0.0001 |
| C 144 | 710,35±33,17 | 720,98±58,82 | 0.280±0.0025 | 0.191±0.0060 |
| C 146 | 568,62±89,85 | 595,47±7,35 | 0.297±0.0002 | 0.268±0.0013 |
| C 42 | 396,72±44,12 | 389,65±51,47 | 0.247±0.0001 | 0.164±0.0024 |
| C 83 | 584,29±72,68 | 617,53±29,41 | 0.272±0.0029 | 0.240±0.0047 |
| C 91 | 431,37±37,00 | 426,47±25,47 | 0.291±0.0010 | 0.283±0.0017 |
| C 93 | 500.00±67,39 | 495,09±55,67 | 0.284±0.0016 | 0.257±0.0032 |
| C 98a | 616,196±28,57 | 577,43±9,47 | 0.329±0.0037 | 0.255±0.0021 |

WOLFE *et al.*, (1992) ont remarqué que la réduction de la surface foliaire suite à la réduction de l'élongation cellulaire est l'une des conséquences du déficit hydrique.

D'autre part, l'analyse de la variance nous indique qu'il n'y'a pas de différences entre **SF** témoins et **SF** stressés. Cela peut être justifié par le fait que huit jours de stress ne suffisent pas pour provoquer de remarquables changements des surfaces foliaires.

Ainsi nous pouvons conclure que les diminutions du poids spécifique foliaire enregistrées sont dues essentiellement au changement du statu hydrique des feuilles.

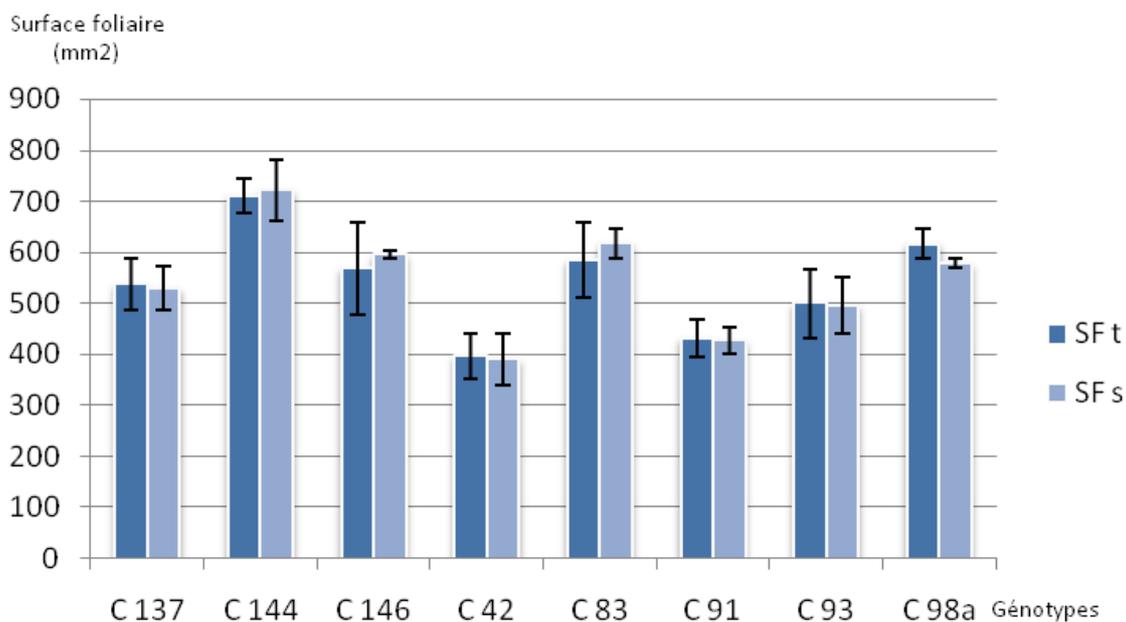


Fig. III-6 : Surfaces foliaires observées chez les génotypes du **groupe A** (mm²)

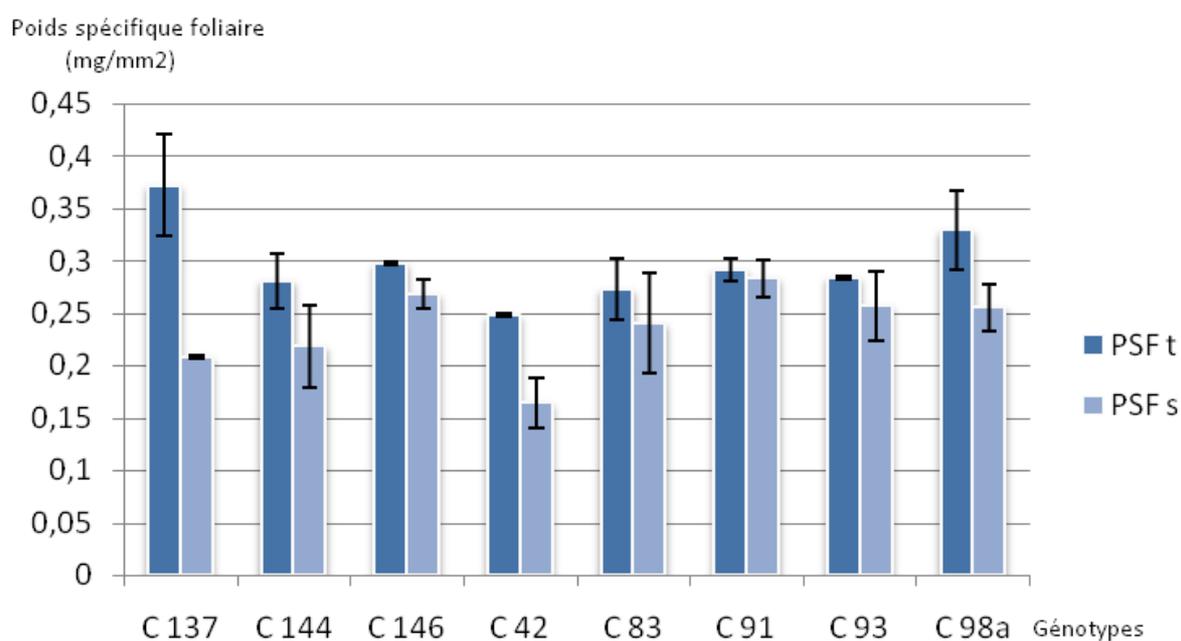


Fig. III-7 : Valeurs du poids spécifique foliaire (PSF) enregistrées chez les génotypes du **groupe A**

Conclusion Première Partie :

Cette partie avait pour but de rechercher dans une population de 100 lignées recombinantes de tournesol des individus ayant des comportements différents vis-à-vis du stress hydrique et qui serviront de matrice pour la deuxième partie.

Le taux de survie au stress causé par un arrêt total de l'irrigation pendant une semaine nous a fourni des informations globales sur le comportement des différents génotypes en conditions déficitaires en eau.

Ainsi, le taux de survie nous a permis de distinguer trois groupes : un groupe de génotypes tolérants au stress hydrique, un groupe de génotypes sensibles et un troisième groupe de génotypes très sensibles.

D'autre part, au sein du groupe des génotypes tolérants, peu de différence ont été observées par l'étude de l'état hydrique de la feuille et des paramètres liés à la photosynthèse la plus grande information nous a été fournie par l'étude de la résistance stomatique qui a révélée un comportement transpiratoire très particulier chez les génotypes **C 93 et C 98a**.

Deuxième Partie :

Après un mois de culture, plusieurs paramètres relatifs à la croissance ont été mesurés sur les vitroplants, une feuille est ensuite prélevées par génotype et par niveau et sera utilisée pour l'anal des protéines.



Fig. III-8 : Lot témoins des 8 génotypes testés *in vitro* :
De gauche à droite : RHA 266 ; C 93 ; C 98a ; LR 53 ; C 134a ; LR 67 ; LR 4 ; PAC 2



Fig. III-9 : Lot stressés des 8 génotypes testés *in vitro* :
De gauche à droite : RHA 266 ; C 93 ; C 98a ; LR 53 ; C 134a ; LR 67 ; LR 4 ; PAC 2

III-2-1-Paramètres relatifs à la croissance sur milieu MS additionné de PEG :

- **Longueur de la tige des vitroplants (mm):**

Sous alimentation hydrique normale, le suivi du développement de la tige chez les 8 génotypes étudiés montre un profil semblable. Les longueurs de la tige observées après un mois de développement varient entre 188.66 ± 8.08 mm pour **PAC 2** et 130.00 ± 2.00 mm pour **LR 4** (tableau III-4).

Sous contrainte hydrique une diminution de la longueur de la tige est observée chez tous les génotypes étudiés. Cette diminution varie entre 9.84 % pour le génotype **C 93** 85.88 % pour **LR 67**. La diminution de ce paramètre chez les deux parents était de 76.74 % chez **RHA 266** et de 74.03 % chez le **PAC 2** (fig. III-10).

- **Longueur de la racine des vitroplants (mm) :**

En condition normale, les longueurs de la racine observées varient entre 240.00 ± 10.00 mm pour **C134a** et 74.00 ± 5.29 mm chez **LR 4**. Ceux des deux parents sont de 175.66 ± 4.04 mm pour **RHA 266** et 92.00 ± 5.00 mm pour **PAC 2** (tableau III-4).

D'après les résultats obtenus, on constate que le stress hydrique a causé une diminution de la longueur de la racine chez tous les génotypes à l'exception du **C98a**. Cette diminution varie entre 75.26 % observée chez le parent **RHA 266** et 14.07 % chez le **C 93**. La longueur de la racine a diminué de 22.34 % chez le parent **PAC 2**.

Par ailleurs, l'augmentation observée chez **C98a** est de 15.66 % par rapport au témoin (fig. III-11).

- **Nombre de racines développées :**

Le nombre de racine varie chez les témoins de 105.66 ± 7.09 racines chez le génotype **C 134a** à 39.00 ± 3.78 racines comptées chez la lignée **LR 4**. Le système racinaire du parent **RHA 266** comporte 77.00 ± 0.00 racines et celui du **PAC 2** comporte 73.66 ± 8.50 racines (tableau III-4).

Dans le lot cultivé dans du milieu contenant le PEG, on observe des systèmes racinaires moins développés que chez les témoins.

Sauf pour le génotype **C 98a** où on a pu observer une augmentation de 4.35 % par rapport au témoin, le stress hydrique a causé une diminution du nombre de racine. Cette diminution va de 13.46 % chez **LR 53** à 62.39 % observée chez **LR 4**. La diminution enregistrée chez le deux parents est de 53.56 % pour **RHA 266** et 44.84 % pour le **PAC 2** (fig. **III-12**).

- **Poids frais total des vitroplants (mg):**

Le poids frais chez les témoins varie entre 3050.00±75.00 mg pour le génotype **C 134a** et 1980.00±100.00 mg chez **LR 67**. Le poids frais du parent **RHA 266** est de 2583.00±178.00 mg, celui du parent **PAC 2** est 2186.00±55.00mg (tableau **III-4**).

Le stress hydrique a diminué le poids frais chez tous les génotypes étudiés. La plus grande diminution a été observée chez le génotype **C 134a** (84.67 %). Le génotype le moins affecté est le **C 93** (62.00 %).

Le manque d'eau a diminué le poids frais de 81.55 % chez le parent **RHA 266** et de 76.22 % chez le parent **PAC 2** (fig. **III-13**).

- **Poids frais de la racine (mg) :**

Chez les témoins, le poids frais de la racine varie entre 1700±100 mg enregistré chez **C 98a** et 800±88 mg pour **LR 53**. Les racines des deux parents présentent des poids frais de 1173±40 mg pour **PAC 2** et de 1543±188 mg pour **RHA 266** mg (tableau **III-4**).

Le manque d'eau a causé une diminution du poids frais de la racine chez tous les génotypes étudiés. Cette diminution varie de à 54.40 % chez **C 93** à 85.96 % chez le parent **RHA 266**, le poids frais racinaire du parent **PAC 2** a diminué de 82.38 % (fig. **III-14**).

- **Rapport Poids de la racine/Poids de la tige (PT/PR) :**

Le rapport **PT/PR** varie chez les témoins entre 1.67±0.12 chez le génotype **C 98a** et 0.45±0.07 observé chez **LR 53**. Le rapport calculé pour les deux parents est de 1.48±0.19 chez **RHA 266** et 1.15±0.02 pour **PAC 2**.

Dans le lot stressé, les plus grandes valeurs de ce rapport ont été enregistrées chez les lignées **C 98a** : 1.16±0.11 et **C 93** : 1.03±0.04. Par contre, la lignée **LR 4** enregistre la plus

petite valeur 0.50 ± 0.04 . Les deux parents ont un rapport de 0.836 ± 0.03 pour **RHA 266** et 0.66 ± 0.05 pour **PAC 2** (tableau III-4).

- **Masse racinaire par unité de volume du milieu (mg/cm^3) :**

Chez les témoins la masse racinaire par unité de volume du milieu varie entre $85.00 \pm 5.00 \text{ mg}/\text{cm}^3$ chez la lignée **C134a** et $40.00 \pm 4.44 \text{ mg}/\text{cm}^3$ chez **LR 53**. Celle des deux parents est de $77.16 \pm 9.43 \text{ mg}/\text{cm}^3$ pour **RHA 266** et de $58.66 \pm 2.02 \text{ mg}/\text{cm}^3$ pour **PAC 2**.

Chez les individus stressés, les plus grandes valeurs de ce paramètres sont enregistrées chez **C 93** : $24.16 \pm 0.28 \text{ mg}/\text{cm}^3$ et **C 98a** : $20.16 \pm 0.76 \text{ mg}/\text{cm}^3$. Par ailleurs, les autres génotypes ont une masse racinaire de $8.00 \pm 0.50 \text{ mg}/\text{cm}^3$ pour **LR 4** à $10.33 \pm 0.57 \text{ mg}/\text{cm}^3$ pour **LR 53**, les valeurs calculées pour les deux parents sont de 10.83 ± 1.44 pour **RHA 266** et 10.33 ± 1.44 pour **PAC 2** (tableau III-4).

L'analyse de la variance nous indique qu'il y a une différence très hautement significative aussi bien entre génotypes qu'entre essais (voir annexe).

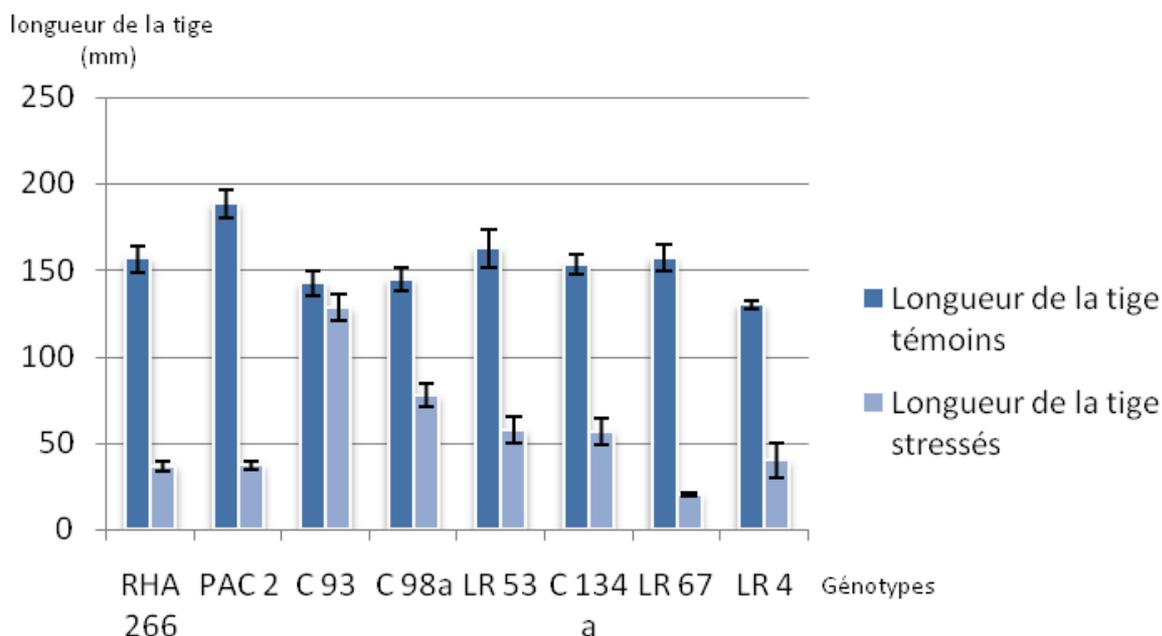


Fig. III-10 : Longueurs de la tige observées chez les génotypes de tournesol testés *in vitro*

(mm)

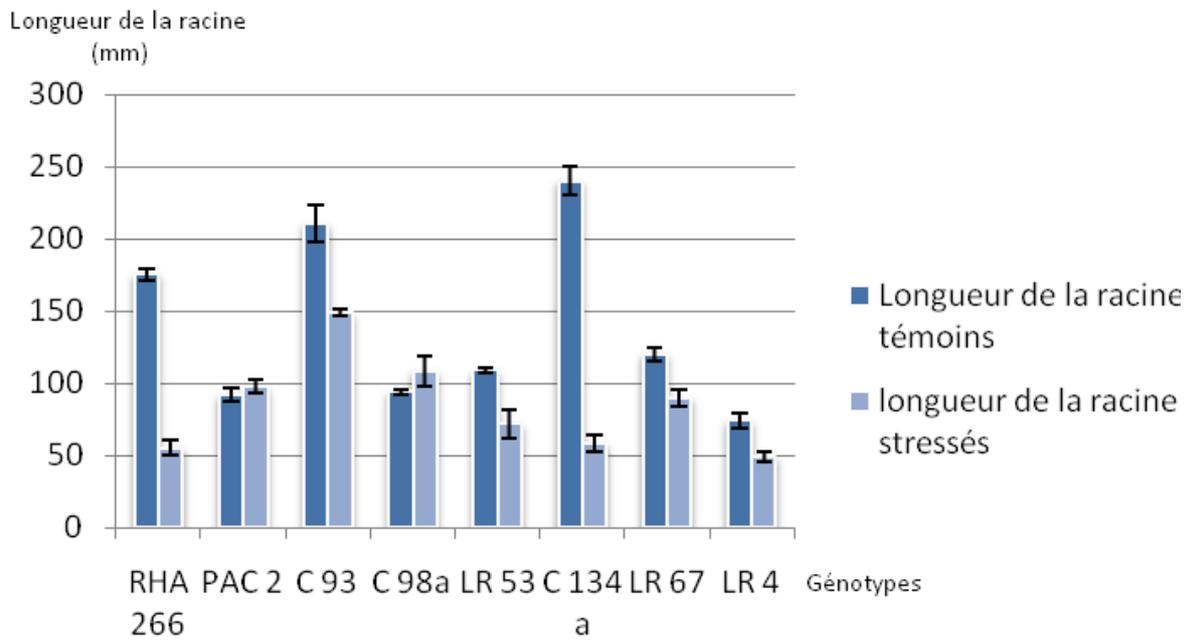


Fig. III-11 : Longueurs de la racine observées chez les génotypes de tournesol testés

in vitro (mm)

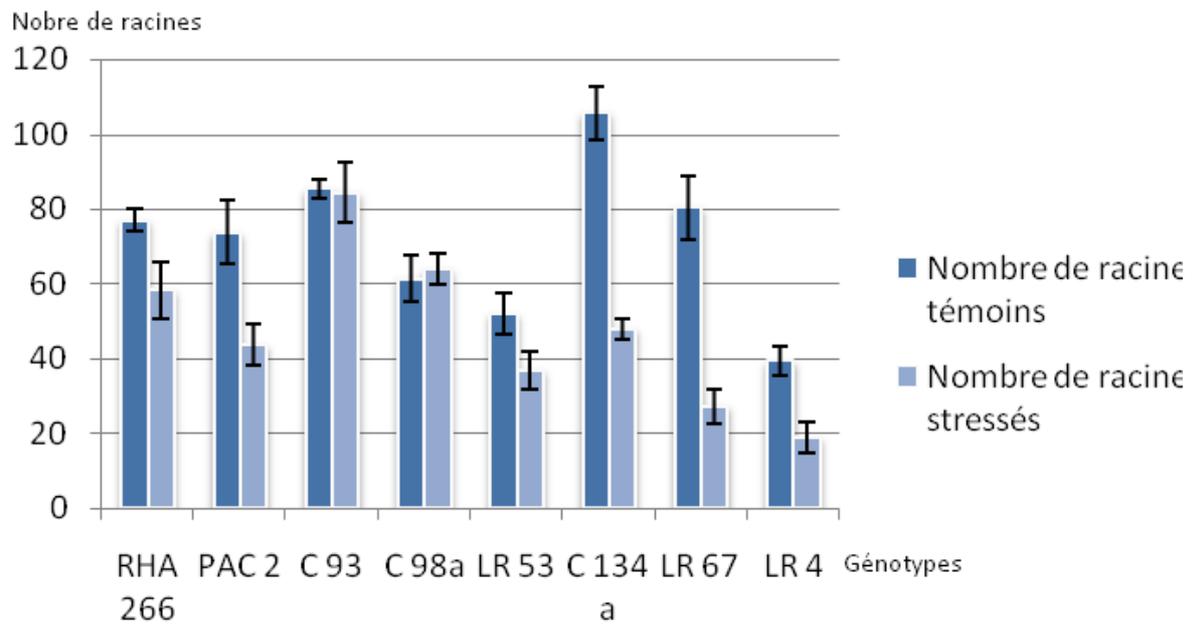


Fig. III-12 : Nombre de racines développées par les vitroplants

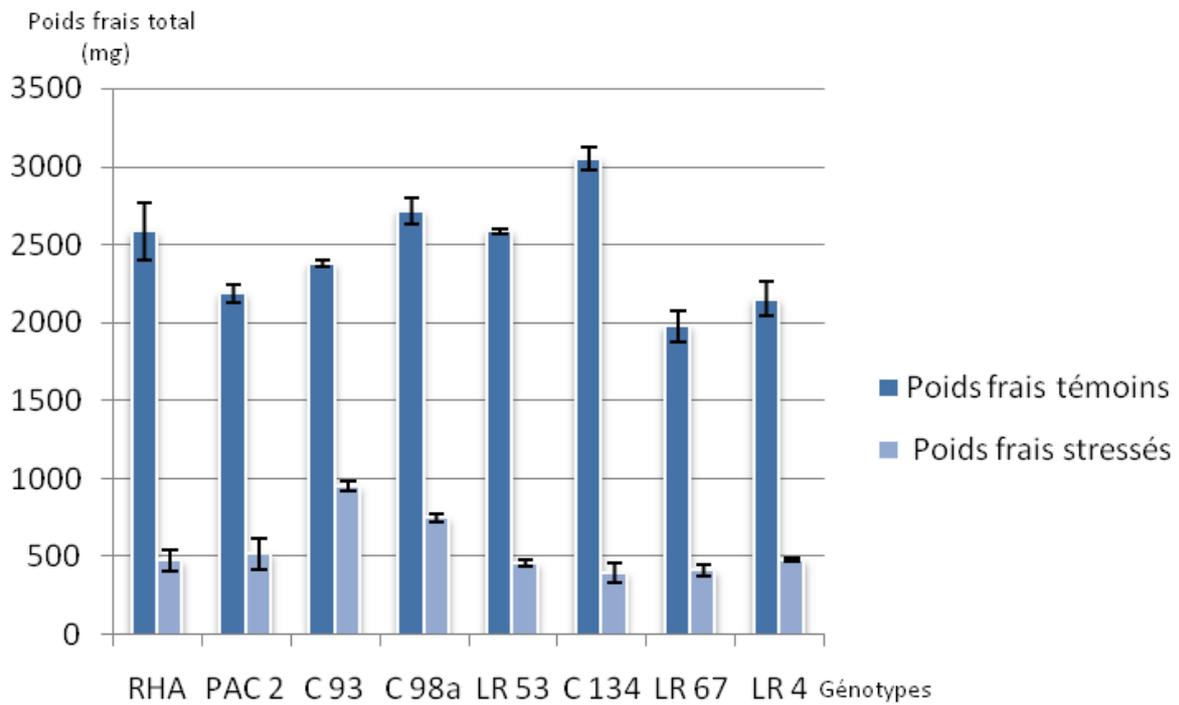


Fig. III-13 : Poids frais total des vitroplants (mg)

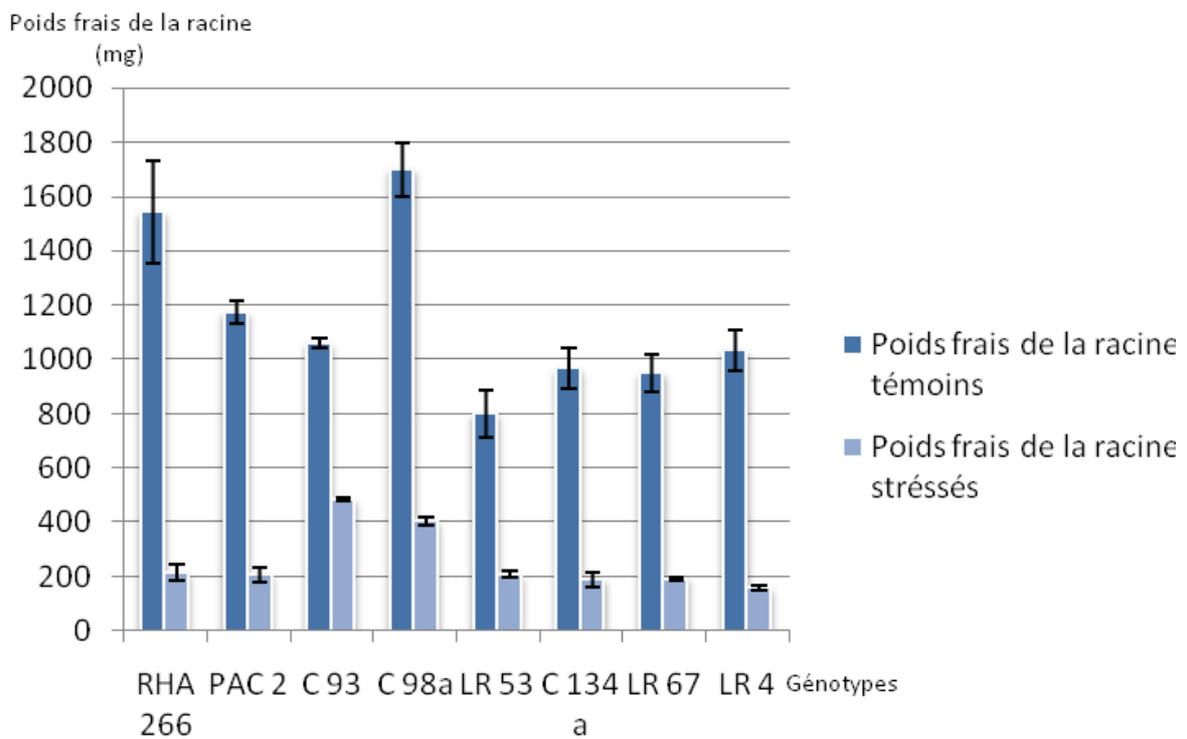


Fig. III-14 : Poids frais de la racine des vitroplants (mg)

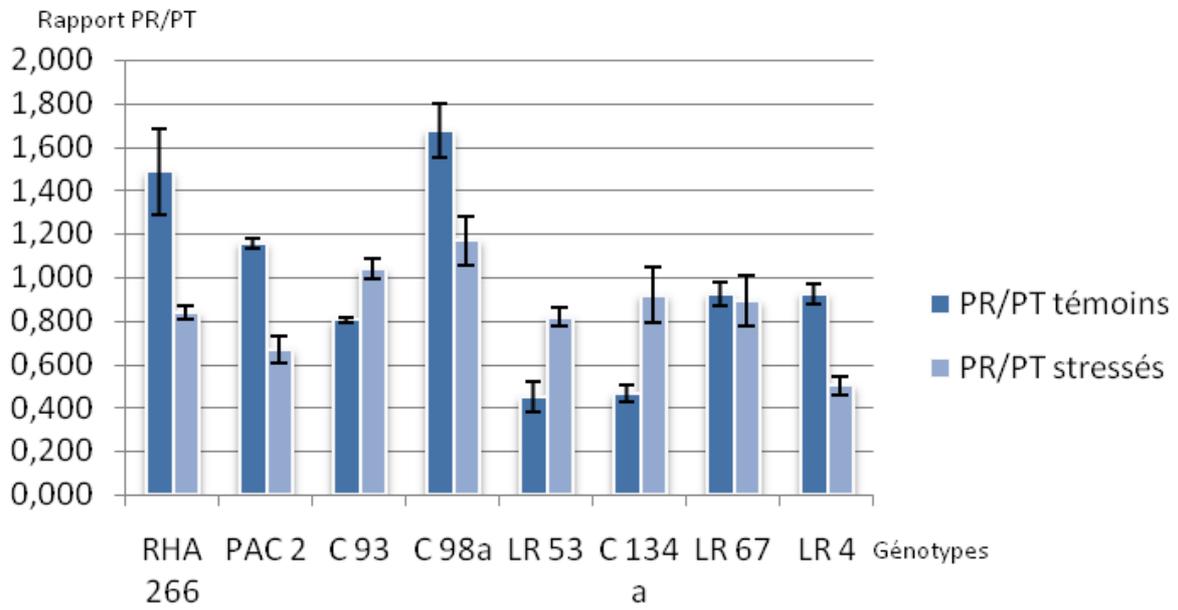


Fig. III-15 : Rapport Poids de la racine/Poids de la tige (PT/PR)

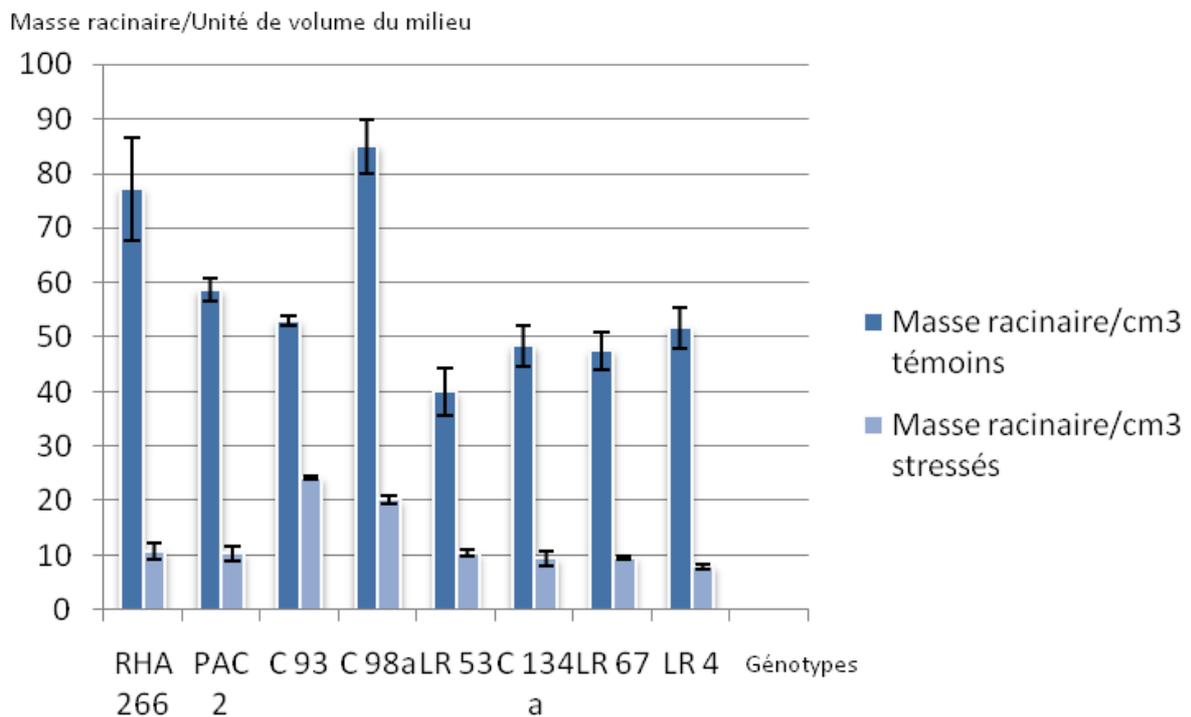


Fig. III-16 : Masse racinaire par unité de volume du milieu (mg/cm³)

La sécheresse a pour effet la réduction du potentiel hydrique autour des racines ce qui rend l'assimilation de l'eau difficile (**BOHNERT et SHEVELEVA, 1998**)

Le stress hydrique peut être induit in vitro par ajout de divers produits au milieu nutritif. Parmi ces produits le Polyéthylène glycol (PEG). Il a pour effet la réduction du potentiel hydrique du milieu (**JACKSON, 1962**) ; (**STEUTER, 1981**).

Les plantes répondent au déficit hydrique par des modifications morphologiques, physiologiques et métaboliques (**OVRARD et al., 1996**).

Selon **THAKUR et RAI, 1982**, le déficit hydrique entraîne un retard dans la croissance végétale. Il se traduit par une réduction de la hauteur et du diamètre de la tige, un raccourcissement des entre-nœuds et une diminution du nombre de feuilles et de la surface foliaire.

Selon **LEPS. (2000)**, les déficits hydriques longs se traduisent par des changements progressifs dans la structure de la plante qui visent à réduire sa surface transpirante, mais qui induisent également une baisse de sa production. Au début du cycle végétatif, la plante ajuste sa taille à l'eau disponible dans le milieu. Ainsi ses besoins en eau sont plus faibles et sa biomasse réduite.

Sous conditions de stress, l'assimilation de l'eau par la plante est directement liée au degré de développement du système racinaire (**HURD, 1974 ; RICHARD et PASSIOURA, 1981**).

Toutefois, les caractéristiques du système racinaire varient en fonction des conditions édaphiques et climatiques (**BALDY, 1973**) ; (**SOUTY, 1987**).

La relation entre le degré de développement du système racinaire et la tolérance de la sécheresse a été prouvée chez plusieurs espèces. **MATSUURA et al. (1996)** rapportent que sous stress hydrique la longueur totale de la racine diminue chez le maïs et augmente chez le millet et le sorgho. Ils estiment ainsi qu'il existe une relation positive entre la longueur de la racine et la tolérance à la sécheresse.

CRUIZIAT (1974), BENLARIBI et al. (1990), ALI DIB et MONNEVEUX (1992) et MATSUURA et al. (1996) suggèrent qu'un système racinaire long et extensif peut conférer un avantage en augmentant l'apport en eau de la partie aérienne.

VANNOZZI et PAOLINI (1982), considèrent que les géotypes de tournesol ayant un système racinaire bien développé résistent mieux à la sécheresse. Ils recommandent ainsi la longueur de la racine ainsi que la masse par unité de volume du sol comme paramètres utiles dans la sélection du tournesol pour la sécheresse. Par ailleurs, une grande diversité génétique de la racine a été observée chez le tournesol (**SEILER, 1994**).

Tableau III-4 : Paramètres relatifs à la croissance sur milieu MS additionné de PEG chez les géotypes de tournesol étudiés (T : Témoin, S : stressé)

| Géotypes | Longueur de la tige (mm) | Longueur de la racine (mm) | Nombre de racines | Poids frais total (mg) | Poids frais de la racine (mg) | Rapport poids frais racine/poids frais tige | Masse racinaire par unité de volume du milieu (mg/cm ³) |
|----------|--------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------------|---|---|
| RHA 266 | T 156,66±7,63 | 175,66±4,04 | 77,00±3,00 | 2583,33±178,97 | 1543,33±188,76 | 1.48±0.19 | 77.16±9.43 |
| | S 36,66±2,88 | 55,00±5,00 | 58,33±7,63 | 476,66±72,34 | 216,66±28,86 | 0.83±0.03 | 10.83±1.44 |
| PAC 2 | T 188,66±8,08 | 92,00±5,00 | 73,66±8,50 | 2186,66±55,075 | 1173,33±40,41 | 1.15±0.02 | 58.66±2.02 |
| | S 37,33±2,51 | 97,33±4,61 | 43,66±5,50 | 520,00±96,43 | 206,66±28,86 | 0.66±0.05 | 10.33±1.44 |
| C93 | T 142,33±6,80 | 210,33±12,50 | 85,33±2,51 | 2380,00±20,00 | 1060,00±20,00 | 0.80±0.01 | 53.00±1.00 |
| | S 24,16±0,28 | 148,66±2,30 | 84,33±8,02 | 950,00±30,00 | 483,33±5,77 | 1.03±0.04 | 128.33±12.58 |
| C98a | T 85,00±5,00 | 94,00±1,73 | 61,33±6,11 | 2716,66±85,04 | 1700±100 | 1.67±0.12 | 144.66±6.42 |
| | S 78,00±6,92 | 108,33±10,40 | 64,00±4,00 | 750,00±30,00 | 403,33±15,27 | 1.16±0.11 | 20.16±0.76 |
| LR53 | T 40,00±4,44 | 109,00±2,00 | 52,00±5,56 | 2586,66±15,27 | 800,00±88,88 | 0.45±0.07 | 162.66±10.78 |
| | S 10,33±0,57 | 71,66±10,40 | 37,00±5,00 | 460,00±20,00 | 206,66±11,54 | 0.81±0.04 | 57.33±7.50 |
| C134a | T 48,33±3,78 | 240,00±10,00 | 105,66±7,09 | 3053,33±75,05 | 966,66±75,71 | 0.46±0.03 | 153.33±5.77 |
| | S 9,5±1,32 | 58,33±5,77 | 48,00±2,64 | 400,00±62,44 | 190±26,45 | 0.91±0.12 | 56.66±7.63 |
| LR67 | T 47,50±3,50 | 120,00±5,00 | 80,33±8,50 | 1980,00±100,00 | 950,00±70,00 | 0.92±0.05 | 157.33±7.50 |
| | S 9,66±0,28 | 90,00±6,00 | 27,33±4,61 | 413,33±41,63 | 193,33±5,77 | 0.89±0.11 | 20.33±0,57 |
| LR4 | T 51,66±3,78 | 74,00±5,29 | 39,33±3,78 | 2150,00±111,35 | 1033,33±75,71 | 0.92±0.04 | 130.00±2.00 |
| | S 8,00±0,50 | 49,00±3,60 | 19,00±4,00 | 480,00±10,00 | 160,00±10,00 | 0.50±0.04 | 40.00±10.00 |

III-2-2-Analyse des protéines totales foliaires par SDS-PAGE :

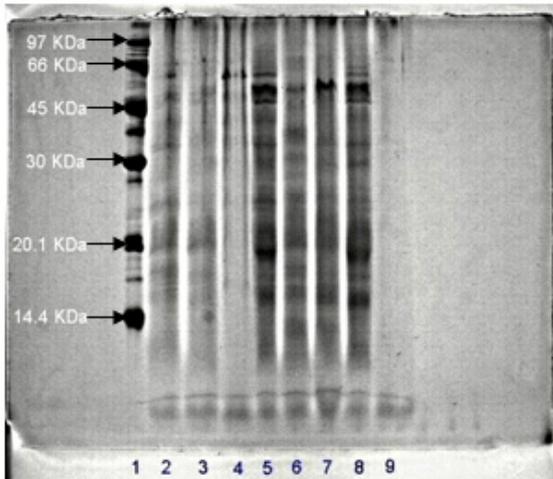


Fig. III-17 : Profil électrophorétique des protéines foliaire relevé par SDS-PAGE (témoins) : 1: LMW Kit; 2: PAC 2; 3: C 93; 4: C 98a; 5: LR 53; 6: C 134a; 7: LR 67; 8: LR 4; 9: RHA 266.

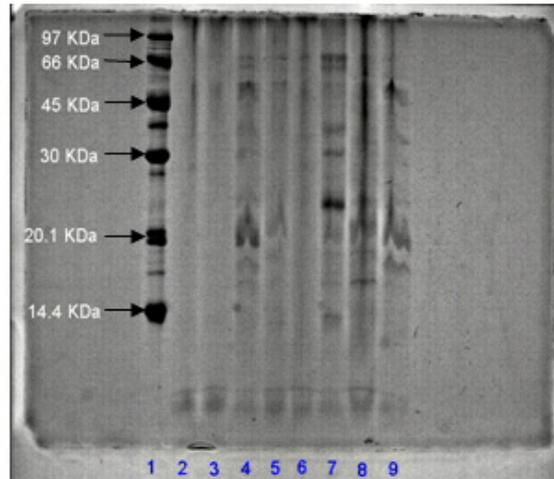


Fig. III-18 : Profil électrophorétique des protéines foliaire relevé par SDS-PAGE (stressés) : 1: LMW Kit; 2: PAC 2; 3: C 93; 4: C 98a; 5: LR 53; 6: C 134a; 7: LR 67; 8: LR4;9:RHA266.

Le traitement des gels obtenus par le logiciel *Soft Photocapt 8* permet une bonne visualisation des bandes ainsi que le calcul de leur poids moléculaires.

Ainsi, 31 bandes différentes ont été détectées (Tableau III-5). Leur poids moléculaire varie de 95.5 KDa à 13.5 KDa. 16 d'entre elles ont été observées aussi bien chez les témoins que chez les stressés. C'est le cas des bandes : 4,7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 21, 25, 26, 27, 29, 31. D'autre part, 8 bandes n'ont été observées que chez les témoins : 1, 2, 3, 5, 12, 13, 19, 30. Par contre, 7 bandes sont apparues chez les stressés. Cas des bandes : 6, 17, 18, 22, 23, 24, 28. Ces bandes correspondent à des poids moléculaires de 59,30, 28.5, 23, 22, 21 et 17 KDa.

Par ailleurs, on remarque une nette différence dans l'intensité des bandes (fig. III-17 et III-18)

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus :

Tableau III-5 : Présentation des bandes détectées chez les feuilles de tournesol (+ pour présence, - pour absence).

| | | Témoins | | | | | | | | Stressés | | | | | | | |
|----------|----------|---------|------|-------|-------|--------|-------|------|---------|----------|------|-------|-------|--------|-------|------|---------|
| N° Bande | PM (KDa) | PAC 2 | C 93 | C 98a | LR 53 | C 134a | LR 67 | LR 4 | RHA 266 | PAC 2 | C 93 | C 98a | LR 53 | C 134a | LR 67 | LR 4 | RHA 266 |
| 1 | 95.5 | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 86 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 73.5 | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 66 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 5 | 62 | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 59 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 7 | 55 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8 | 51 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 9 | 47 | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + |
| 10 | 45 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 11 | 42 | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| 12 | 40 | + | + | + | + | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 13 | 38 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 14 | 36 | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 15 | 34 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 16 | 31 | + | - | - | + | + | + | - | - | - | + | + | - | + | - | - | - |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 17 | 30 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 18 | 28.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + |
| 19 | 27 | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | 25 | + | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - |
| 21 | 24 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 22 | 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + | + | + |
| 23 | 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 24 | 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |
| 25 | 20 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | + |
| 26 | 19 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - |
| 27 | 18 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | + |
| 28 | 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| 29 | 16.5 | + | + | - | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | + | + |
| 30 | 15.5 | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 31 | 13.5 | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | + | - | - |

La séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide donne un profil caractéristique du génotype et reproductible si les techniques sont standardisées.

La différence entre profils réside dans l'intensité relative des bandes colorées ainsi que dans le nombre de bande obtenues.

Chaque bande d'un profil électrophorétique est composée de plusieurs protéines de structure différente mais de mobilité identique.

L'intensité de la bande est liée directement à la concentration de la protéine (**JASSO et al. 2002**). D'autre part, un minimum de 50 µg de protéines est requis pour qu'une bande soit visiblement colorée par le bleu de coomassie R-250.

Par ailleurs, la présence de bandes communes entre génotypes indique que les protéines contenues dans les feuilles de tournesol sont présentes à des concentrations variées dépendant du génotype (**JASSO et al. 2002**). Cette différence d'accumulation peut résulter d'une différence dans la régulation du gène ou dans l'organisation du génome par la présence d'un nombre élevé de copie de ce gène (**LABHILILI et al., 1995**).

Des changements dans le profil protéique (l'inhibition de certaines protéines, la surexpression de certaines d'autre et l'apparition de nouvelles protéines) interviennent suite à beaucoup de stress environnementaux parmi lesquels le manque d'eau. Ils ont une grande importance dans l'adaptation des plantes au stress. (**YORDANOVA et al., 2004**)

Une partie des protéines induites ont une fonction directe dans l'augmentation de la tolérance au stress (protéines fonctionnelles), d'autres ont une fonction dans la chaîne de transduction (protéines régulatrices) qui aboutiront à la production de protéines fonctionnelles (**SCHULZE et al., 2005**).

RICCARDI et al. (1998) ont analysés par électrophorèse 2D les protéines foliaires chez deux lignés recombinantes de maïs l'une tolérante à la sécheresse et l'autre sensible. Parmi 78 protéines dont le stress a affecté l'expression, 23 ont été partiellement inhibées, 40 ont été surexprimées, 10 n'ont été visibles que chez les individus stressés et 5 renseignent sur une interaction génotype x environnement.

Les protéines de stress jouent un rôle dans l'adaptation de la plante, et de ce fait, de nombreux chercheurs abordent la résistance au stress par l'isolement et l'étude de ces molécules. (**LAMAZE. et al, 1995**).

Conclusion Deuxième partie :

Cette partie a porté sur l'étude comparative de la réponse au manque d'eau chez des génotypes de tournesol qui ont présenté une variabilité dans la réponse au manque d'eau dans la première partie.

L'étude de la croissance sur milieu artificiel additionné de PEG montre que la tolérance au stress est en grande partie due au degré de développement du système racinaire.

Dans un deuxième temps, on a essayé de chercher une interprétation biochimique à cette variabilité par l'analyse électrophorétique des protéines foliaires, les résultats obtenus montrent que le manque d'eau a réprimé la majorité de protéines, d'autres ont été partiellement inhibées alors que d'autres ont été induites mais pas de bandes exprimées spécialement chez les génotypes tolérants.

CONCLUSION GENERALE

Le tournesol est la quatrième culture oléagineuse dans le monde. Elle est pratiquée dans les zones tempérées. La plus grande contrainte environnementale qui influe sur les rendements des cultures en Afrique du Nord est le déficit hydrique.

Notre étude a porté sur 100 génotypes de tournesol *Helianthus annuus. L.*, deux lignées parentales **PAC 2**, **RHA 266**, et 98 génotypes descendants.

Dans un premier temps, on a cherché de faire la distinction entre génotypes résistants et génotypes sensibles par étude de différents paramètres physiologiques. Les résultats obtenus montrent qu'il y a une grande variabilité dans le comportement des différentes lignées de cette population sous condition de manque d'eau. Ainsi, dans une descendance issue du même croisement, on a pu observer des lignées tolérantes et d'autre non. Aucun des deux parents n'appartient au groupe des lignées qui ont résistées aux conditions défavorables, ce qui indique que les individus qui ont pu supporter le manque d'eau présentent des combinaisons de caractères plus performantes que les parents. Chez ces génotypes résistants, bien que le stress hydrique a plus ou moins affecté le statut hydrique de la feuille, la photosynthèse semble ne pas être inhibée. D'autre part, la comparaison de la résistance stomatique de ces génotypes nous a permis d'identifier deux lignées dont ce paramètre n'a été que très peu affecté, soit les lignées **C 93** et **C 98a**. On les a alors considérés comme les mieux tolérantes au manque d'eau.

La deuxième partie de ce travail a consisté en l'étude comparative de quelques paramètres morphologiques relatifs à la croissance sous contrainte hydrique artificielle stimulée *in vitro* par le PEG. Les résultats obtenus confirment l'hypothèse émise dans la première partie, les génotypes choisis se sont comportés d'une manière plus ou moins proche de la première partie. En effet, on a pu caractériser chez le génotype **C98a** un système racinaire qui renseigne sur de grandes performances sous conditions déficitaires en eau. Ce génotype présente un système racinaire plus développé en conditions de manque d'eau qu'en conditions normales.

A l'issue de la deuxième partie, on a tenté de trouver une explication biochimique à cette variabilité par analyse des protéines foliaires exprimées sous contrainte hydrique, la comparaison des profils électrophorétiques obtenus dévoile 6 bandes exprimées en condition déficitaires en eau de 21, 22, 23, 28.5, 30 et 59 KDa et dont la présence et le degré d'accumulation varie d'un génotype à l'autre mais pas de bandes exprimées spécialement chez les génotypes résistants.

Une étude plus avancée permettra peut-être de mieux caractériser les protéines impliquées dans les processus de résistance au déficit hydrique à savoir une électrophorèse bidimensionnelle des protéines combinée avec une analyse du transcriptome.

D'autre part, les génotypes présentant une grande sensibilité au manque d'eau sont d'équivalente valeur pour la recherche que ceux dotés d'une grande résistance.

A la fin nous pouvons dire que le tournesol est une culture qui a de grande potentialité pour être optimisée et que sa relance en Algérie doit être assistée par des programmes de sélection et de recherche.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **ACIA, (2005).** Document de biologie BIO2005-01. La biologie de *Helianthus annuus L* (Tournesol). Agence canadienne d'inspection des aliments.
- **ALI DIB T et MONNEVEUX P, (1992)** Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. I. Caractères morphologiques d'enracinement. *Agronomie* **12**: 371-379.
- **ALLISA A. JONARD R. SERIEYS H et VINCOURT P. (1986)** La culture d'embryons isolés *in vitro* dans un programme d'amélioration du tournesol. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **302** : 161-164.
- **AMEROUN R, (2002)** La relance des cultures oléagineuses en Algérie : quel plan directeur de recherche et de développement adopter pour leur relance ?, Atelier sur l'introduction et le développement des cultures oléagineuses en système de production diversifiés-Guelma- pp 15-25.
- **ANASHCHEENKO A. V, (1979)** Filogeneticheskia sviyasi v rode *Helianthus L.* Tr. Prikl. Bot. Genet. Sel. Leningrad, 64 (2): 146-156 (in Russian) . In: **SCORIC D, (1990).**
- **ANONYME a, (2008).** Système racinaire du tournesol.membres.lycos.fr/elasri/guid/desc/rac/.htm.
- **ANONYME b, (2008).** Après l'or noir voici l'or vert. [http : Univers-nature.com/dossiers/biocarburants1](http://Univers-nature.com/dossiers/biocarburants1).
- **ANONYME c, (2008).** La santé de l'abeille. [Http// : apisite.online.fr/flore-t.htm](Http://:apisite.online.fr/flore-t.htm)
- **ARUMUGANATHAN K et EARLE E. D, (1991)** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol Biol Rep.* **9**:208–218.
- **ASSMANN S. M. SNYDER J. A et LEE Y. J. (2000)** ABA-deficient (*aba1*) and ABA-insensitive (*abi1-1, abi2-1*) mutants of *Arabidopsis* have a wild-type stomatal response to humidity. *Plant Cell Environ.* **23**: 387-395.
- **BALDY C, (1973)** Progrès récents concernant l'étude du système racinaire du blé (*Triticum sp*). *Ann. Agron.* **24**: 241-276.
- **BENLARIBI M. MONNEVEUX P et GRIGNAC P. (1990)** Etude des caractères d'enracinement et de leur rôle dans l'adaptation au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *Agronomie* **10**: 305-322.
- **BERRIOS E.F. GENTZBITTEL L. MOKRANI L. ALIBERT G. et SARRAFI A. (2000)** Genetic control of early events in protoplast division and regeneration pathways in sunflower. *Theor. Appl. Genet.*, **101**: 606-612.
- **BIDNEY D. SCELONGE C et WANG L. (1998)** Recovery of transformed plants without selectable markers by nodal culture and enrichment of transgenic sectors. WO 98/51806.

- **BOHNERT H J; SHEVELEVA. E (1998)** Plant stress adaptations--making metabolism move. *Current opinion in plant biology*;1 (3):267-74.
- **BOUARROUDJ R, (2003)** Température et transpiration foliaire en conditions de manque d'eau chez quelques graminées. Thèse d'ingénieur. Université Frères Mentouri Constantine. pp :18.
- **BURKE J. M et RIESEBERG L. H, (2003)** Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflower. *Science*. **300**:1250 in : (LU *et al.*, 2007).
- **CAI H. BISWAS D. K. SHANG A. Q. ZHAO L. G. et LI W. D. (2007)** Photosynthetic response to water stress and changes in metabolites in *Jasminum sambac*. *PHOTOSYNTHETICA*. **45** (4): 503-509.
- **CAMPBELL S. A et CLOSE T. J. (1997)** Dehydrins:Genes, proteins and association with phenotypic traits. *New Phytol*. **137** :61-74.
- **CATTIVELLI L, RIZZA F, BADECK F-W, MAZZUCOTELLI E, MASTRANGELO A. M, FRANCIA E, MARE C, TONDELLI A, STANCA A. M. (2008)** Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research* **105** : 1–14.
- **CECHIN I. ROSSI S.C. OLIVEIRA V.C et FUMIS T.F. (2006)** Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. *PHOTOSYNTHETICA* **44** (1): 143-146.
- **CELLIER F. CONEJERO G. BREITLER J. C et CASSE F. (1998)** Molecular and physiological responses to water deficit in drought tolerant and drought sensitive lines of sunflower. *Plant physiol*. **116**, pp: 319-328.
- **CHANDLER J. M. et BEARD B. H, (1983)** Embryo culture of *Helianthus* hybrids. *Crop Sci.*, **15**: 77-78.
- **CHARRIERE J. D. IMDORF A. KOENIG C. GALLMANN S et KUHN R. (2006)** Cultures de tournesol et développement des colonies d'abeilles mellifères. *Revue suisse Agric.*, **38** (5): 269-274.
- **CIDES (1999)** : Cahier de références techniques. Micropropagation pour l'entreprise sericole.
- **CLARK et MAC-GAIG, (1982)** Existed leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Can. J. Plant. Sci.* **62**: 571-578.
- **CLOSE T. J. (1996)** Dehydrins : Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Plant Physiol*. **97**: 795-803.
- **CORNIC G. BUKHOV N. G. WIESE C. BLIBNY R et HEBER U. (2000)** Flexible coupling between light dependent electron and vectorial proton transport in illuminated leaves of C3 plants. Role of photosystem I-dependent proton pumping. *Planta*. **210**: 468-477.

- **CRUIZIAT P, (1974)** Détermination des pertes en eau subies par les différents organes d'une plante soumise au dessèchement. *Ann. Agron.* **25**: 539-554.
- **DE LEONARDIS A. M. MARONE D. MAZZUCOTELLI E. NEFFAR F. RIZZA F. DI FONZO N. CATTIVELLI L et MASTRONGELO A. M. (2007)** Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Science* **172** : 1005-1016.
- **DEGLENE L. LESIGNES P. ALIBERT G et SARRAFI A. (1997)** Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, **48**: 127-130.
- **Demol, J et al., (2002)** L'amélioration des plantes : Application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. *Les presses agronomiques de Gembloux.* : 213-221.
- **DEVI P et RANI S, (2002)** *Agrobacterium rhizogenes*-induced rooting of in vitro regenerated shoots of the hybrid *Helianthus annuus* x *Helianthus tuberosus*. *Sci Hort.* **93**:179–186.
- **DICKO M. H, (2006)** Travaux pratique biochimie structurale et enzymologie. Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles. Université de Ouagadougou.
- **DORE C. VAROQUAUX F, (2006).** Histoire et amélioration de 50 plantes cultivées. *Ed. Inra* : 711-727.
- **DURANTE M. PAOLO VANNOZZI G. PUGLIESI C et BERNARDI R. (2002)** The role of biotechnology in the development of sunflower culture in the world. *HELLIA*, **25**, Nr. 36 : 1-28
- **EBRAHIMI A. MAURY P. BERGER M. SHARIATI F. GRIEU P et SARRAFI A. (2008)** genetic improvement of oil quality in sunflower mutants under water stressed conditions. *17th International Sunflower Conference*, cordoba, Spain.
- **EL AASRI M. KAYAF M et EL FACHTALI M, (2002)** Effet de la précocité du stress hydrique durant la phase reproductive du tournesol. *Actes du Premier Symposium sur le développement de la filière des oléagineux au Maroc.* Société Marocaine d'Agronomie (SMA), mai 2002 : 211-215.
- **EL ASRI M. BAMOUH A. TAHIRI I et KAYAF M (2002)** Maîtrise de la répartition :de l'eau de l'irrigation entre la phase végétative et la phase reproductive. *Mémoire de 3^{ème} cycle de l'Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II (Rabat).*
- **EL ASRI M. ESSAHAT A et KAYAF M (2001)** Irrigation du tournesol. *Premier Colloque de l'Agriculture sur le thème « Développement Agricole et Recherche Agronomique dans la région du Gharb-Chrarda-Bni Hssen. Bilan et perspectives. Kénitra, 23 et 24 juillet 2001.*
- **FAO, (2004)** Importation et exportation de certains produits agricoles, Groupe III. Site Web de la FAO : www.fao.org.

- **FAO, (2006)** La production agricole groupe II. . Site Web de la FAO : www.fao.org.
- **FAURE N. SERIEYS H. BERVILLE A. CAZAUX E et KAAAN F. (2002)** Occurrence of partial hybrids in wide crosses between sunflower (*Helianthus annuus*) and perennial species *H. mollis* and *H. orgyalis*. *Theor Appl Genet.* **104**:652–660.
- **FIGLIORE M. C. TRABACE T et SUNSERI F. (1997)** High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* **16**:295–298.
- **FLEXAS J, ESCALONA J.M et MEDRANO H. (1999)** Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines. *Plant Cell Environ.* **22**: 39-48.
- **FRIEDT W, (1992)** Present state and future prospects of biotechnology in sunflower breeding. *Field Crops Research.*, **30** : 425-442.
- **GAST K. L. B, (1995)** Production and post harvest evaluation of fresh-cut sunflowers. *Report of progress* **751**. Agricultural experiment station. Kansas State University.
- **GRIEU P, MAURY P, DEBAEKE P, SARRAFI A. (2008)** Améliorer la tolérance à la sécheresse du tournesol : apports de l'écophysiologie et de la génétique. *Innovations Agronomiques (2)* : 37-51.
- **HOPKINS W. G, (2003)** Physiologie végétale. *Editions De Boeck Université* : 451
- **HORVAT D , MIJIC A, KRIZMANIC M, LIOVIC I, BILANDZIC M, DUVNJAK T , ZDUNIC Z , KRIZMANIC G (2006)** Combining abilities and gene effect for 1000 seed weight and hectoliter mass in sunflower (*Helianthus annuus L.*) *Seed Science Journal*, Vol.23 No.4
- **HU X. BIDNEY DL. YALPANI N. DUVICK J. P. CRASTA O. FOLKERTS O et LU G. (2003)** Overexpression of a hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase gene evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol* **133**:170–181.
- **HURD E.A, (1974)** Phenotype and drought tolerance in wheat. *Agric. Meteorol.*, **14**: 39-55.
- **IFEN, (2002)** in : PricewaterhouseCoopers/Écobilan, 2002. [http :Univers-nature.com/dossiers/biocarburants1](http://Univers-nature.com/dossiers/biocarburants1).
- **JACKSON WT, (1962)** use of carbowaxes (polyethylene glycols) as osmotic agents. *Plant physiol.* **37**: 513-519.
- **JAMBHULKAR S. J. (1995)** Rapid cycling through immature embryo culture in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Helia* **18**:45–49
- **JASSO D. DE RODRIGUEZ. ROMERO-GARCIA J. RODRIGUEZ-GARCIA R et SANCHEZ J. L. (2002)** Characterisation of proteins from sunflower leaves and

seeds:Relationship of biomass and seed yield. *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA.

- **JONES H. G, (1992)** Plant and Microclimates (Ed): A quantitative approach to environmental plant physiology, *Cambridge University Press*, London. In : **(KIANI, 2007)**.
- **KASRAOUI M. F. BRAHAM M. DENDEN M. MEHRI H. GARCIA M. LAMAZE T et ATTIA F, (2006)** Effet du déficit hydrique au niveau de la phase photochimique du PSII chez deux variétés d'olivier. *C. R. Biologies*. **329** : 98–105.
- **KATZ F, (1997)** The move towards genetically improved oils. *Food Technol.* **51**:66.
- **KIANI P, (2007)** Analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol (*Helianthus annuus L.*) soumis à la sécheresse. Thèse Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **KNITTEL, N. ESCANDON A.S. et HAHNE, G. (1991)** Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. *Plant Sci.* **73**: 219-226.
- **KOZIK A. CHAN B. et MICHELMORE R. (2003)** Lettuce/sunflower EST CGPDB project: DNA analysis, assembly visualization and validation. *Plant Anim Genomes Conf.* **9**:886.
- **KUMAR A, BHATLA S. C.(2006)** Polypeptide markers for low temperature stress during seed germination in sunflower. *Biologica Plantarum.* **50 (1)**: 001–160
- **LABHILILI M. JOURDIER P et GAUTIER M.F. (1995)** Characterization of cDNAs encoding Triticum durum dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant sci.* **112** :219-230.
- **LACOMBE1 S. KAAAN F.GRIVEAU F et BERVILLE A (2004)** The prevents high oleic mutation: methodological studies. *Helia*, **27**, Nr. 40 : 41-54.
- **LAMAZE T. TOUSCH D. SARDA X. GRIGNON C. DEPIGNY-THIS D. MONNEVEUX P et BELHASSEN E. (1994)** Résistance de plantes a la sécheresse : mécanismes physiologiques. *Le sélectionneur Français* **45** : 75-85.
- **LARCHER W, (1995)** Plant under stress. In, *Physiological Plant Ecology*. Third edition. *Springer.* :321-448.
- **LEPS, (Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous stress environnementaux). (2000)** La résistance des plantes à la sécheresse. INRA Montpellier.
- **LEVITT J, (1980)** Responses of Plants to Environmental Stresses. Volume II, 2nd ed. *Academic Press*, New York.
- **LIU X. N et BAIRD W. V, (2003)** Differential expression of genes regulated in response to drought orsalinity stress in sunflower. *Crop Sci* **43**:678–687.
- **LOPEZ C. G. BANOWETZ G. M. JAMES P. C et KRONSTAD W. E. (2003)** Dehydrin expression and drought tolerance in seven wheat cultivars. *Crop Sci.* **43.**,: 577-583.

- **LU G. HU. X et BIDNEY D.L. (2007).** *Sunflower Biotechnology in Agriculture and forestry*, Vol. 61.
- **LUCAS O. KALLERHOFF J. et ALIBERT G, (2000)** Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Breed.* **6**: 479-487.
- **MADHAVA RAO K.V, (2006)** Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. *Springer edition*. pp:1-14.
- **MASSINGA RA. AL-KHATIB K. S. AMAND P et MILLER JF (2003)** Gene flow fromimidazolinone-resistant domesticated sunflower to wild relatives.*Weed Sci.* **51**:854–862.
- **MATIN M. JARVIS H. HAYDEN F. (1989)** Leaf water potential, relative water content, and diffusive resistance in Barley. *Agron. J.* **81**: 100-105.
- **MATSUURA A. INANAGA S. et SUGIMOTO, Y. (1996)** Mechanism of interspecific differences among four graminaceous crops in growth response to soil drying. *Japanese J. of Crop Science.* **65**: 352-360.
- **MERITET S, (2006)** Déterminants des prix des hydrocarbures. Notre Europe. Site web : www.notre-europe.eu
- **MITRA J, (2001)** Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science.* **80** : 758-763.
- **MONEY N. P, (1989)** Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols: Relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant physiol.* **91**: 766-769.
- **MOROZOV V. K, (1947).** Sunflower selection in USSR. Pishchepromizdat, Moscow, pp. 1-272 (in Russian) . *In: SCORIC D (1990).*
- **MOTT K. A. et PARKHURST D. F, (1991)** Stomatal responses to humidity in air and helox. *Plant Cell Environ.* **14**: 509-515.
- **OGREN E et OQUIST G, (1985)** Effects of drought on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition susceptibility in intact willow leaves. *Planta.* **166**: 380-388
- **OGREN E, (1990)** Evaluation of Chlorophyll Fluorescence as a Probe forDrought Stress in Willow Leaves1. *Plant Physiol.* **93** :1280-1285.
- **OUVRARD O. CELLIER F. FERRARE K. TOUSCH D. LAMAZE T. DUPUIS J. M. et CASSE-DELBART F. (1996).** Identification and expression of water stress and abscisic acid-regulated genes in a drought-tolerant sunflower genotype. *Plant molecular biology.*, **31**:819-829.
- **PAUL M. PLANCHON C. et ECOCHARD R, (1979)** Etude des relations entre le développement foliaire, le cycle de développement à la productivité chez le soja. *Ann Amélio. Plantes.* **29 (5)** : 479-492.

- **PLOMIN D, DEFRIES J. C, MCCLEARN G E, ARECCHI P (1998)** Des gènes au comportement: introduction à la génétique comportementale De Boeck Université.
- **POZZI G. LOPEZ M. COLE G. SOSA-DOMINGUEZ G. BIDNEY D. SCELONGE C. WANG L. GUIHAU L. MÜLLER-COHN J et BRADFISH G (2000)** Bt-mediated insect resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: *Proceedings of the 15th International Sunflower Conference*, 12-15 June 2000. Toulouse, France :46-50.
- **RAO M. SHARP R.E. BOYER J.S. (1987)** Leaf magnesium alters photosynthetic response to low water potentials in sunflower. *Plant Physiology* **84** : 1214-1219.
- **RICCARDI F. GAZEAU P. DE VIENNE D et ZIVY M (1998)** Protein changes in response to progressive water deficit in maize. Quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiol* **117**:1253–1263.
- **RICHARD R.A. et PASSIOURA J.B. (1981)** Seminal root morphology and water use of wheat. II. Genetic variation. *Crop Sci.* **21**: 253-255.
- **ROMMENS C.M et Kishore G.M. (2000)** Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. *Curr Opin Biotechnol.* **11**:120–125.
- **ROSSIGNOL M. (2001)** Analysis of the plant proteome. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:131–134.
- **SCELONGE C.J. WANG L. BIDNEY D. LU G. HASTINGS C. COLE G. MANCL M. D’HAUTEFEUILLE J-L. SOSA-DOMINGUEZ G et COUGHLAN S (2000)** Transgenic *Sclerotinia* resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proc Int Sunflower Conf* **15**: 66–71.
- **SCHULZE E. BECK E et HOHENSTEIN K. M. (2005).** Plant ecology. *Springer* Berlin : 117-140.
- **SEILER G. J. (1994)** Primary and lateral root elongation of sunflower seedlings. *Environmental and Experimental Botany.* **34**: 409-418.
- **SHINOZAKI et YAMAGUCHI-SHINOZAKI, (1997)** Genes expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiol.* **115**:327-334.
- **SOLTNER D, (2005)** La culture du tournesol. *Les grandes productions végétales. 20^{ème} Edition.*;303-308.
- **SOUTY N. (1987)** Aspect mécanique de la croissance des racines. I. Mesure de la force de pénétration. *Agronomie.* **7**: 623-630.
- **STEUTER A. A, (1981)** Water potential of aquius polyethylene glycol. *Plant Physio.*, **67**: 64-67.
- **SUJATHA M. et PRABAKARAN A. J, (2001)** High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **65**:23–29.

- **TANG S Y. SLABAUGH M.B. SHINTANI D.K et KNAPP S.J. (2002)** Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor Appl Genet.* **105**:1124–1136.
- **TANKSLEY S. D. YOUNG N. D. PATERSON A. H et BONIERBALE M. W. (1998)** RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *BioTechnology* **7**:257–264.
- **THAKUR PS ET RAI VK. (1982)** Effect of water stress on protein content in two maize cultivars differing in drought resistance. *Biologia Plant (Praha)*; **24** : 96-100.
- **TOIVONEN P et VIDAVER W, (1988):** Variable chlorophyll fluorescence and CO₂ uptake in water-stressed white spruce seedlings. *Plant Physiol.* **86**: 744-748.
- **TONDELLI A et MICHELE STANCA A, (2008)** Drought tolerance improvement in crop plants: An integrated view from breeding to genomics. *Field Crops Research.* **105**:1-14.
- **VANNOZZI, G.P. et PAOLINI, R. (1982).** Taking advantage of variability in *Helianthus* genus for sunflower breeding. In: *Proc. Workshop on Sunflower*, Athens, Greece, pp. 105-14 I.
- **VEDELE F et LOUDET O (2001)** Un exemple de la dissection génétique d'un caractère complexe : lignées recombinantes et recherche de QTLs. Ecole thématique Biologie végétale.
- **VESELOVSKY H, (1985)** Sunflower growing. J. Selyskoe Hozayaystvo I lesovodstvo. T.O.-XLVIII (In Russian) . In: **SCORIC D, (1990).**
- **VITAMVAS P, KOSOVA K AND PRASIL I. T. (2007)** Proteome Analysis in Plant Stress Research. *Czech J. Genet. Plant Breed.*, **43, (1)**: 1–6.
- **WOLFE D. W. SARDAS V. O. VILLALOBOS J et FERRERES E. (1992)** Photosynthesis recovery from drought in relation to stress effects on leaf osmotic potential and nitrogen content. In: *Proceeding of the 13 th international sunflowers. Pisa, Italy*, **1**: 658-663.
- **XU D, DUAN X, WANG B, HONG B, HO T. H. (1996)** Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA, from barley confer tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**: 249-257.
- **XU H. BIDNEY D. L. YALPANI N. DUVICK J. P. CRASTA O. FOLKERTS O et LU G. (2003)** Overexpression of a Gene Encoding Hydrogen Peroxide- Generating Oxalate Oxidase Evokes Defense Responses in Sunflower1. *Plant Physiology.* **133**: 170–181.
- **YEKHELEF N, (2001)** Photosynthèse, Activité photochimique et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* ; Desf). Thèse de Doctorat d'Etat. Université Frères Mentouri Constantine. pp 38-43.
- **YOKOTA A. TAKAHARA K et AKASHI K. (2006)** Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. *Springer.* pp: 15–39.

- **YORDANOVA R. Y. KOLEV K. G. STOINOVA Z. G et POPOVA P. L. (2004)** Change in the leaf polypeptide patterns of barley plants exposed to soil flooding. *Biologica Plantarum* **48** (2): 301-304.

ANNEXES

STADES REPÈRES DU TOURNESOL

Un stade est atteint lorsque 50% des plantes sont à ce stade.
Les codes "lettres" ou "chiffres" sont équivalents.

Germination-levée



Stade A1 (1.0)
Apparition des hypocotyles en crosse.



Stade A2 (1.1)
Emergence des cotylédons et premières feuilles visibles.



Stade B3-B4 (2.3-2.4)
La seconde paire de feuilles opposées apparaît et a environ 4 cm de long ; les pétioles sont visibles du dessus.



Stade E1 (3.1)
Apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : STADE BOUTON ÉTOILE.

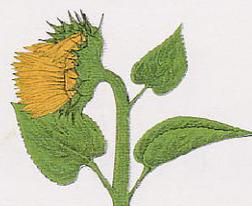
Phase bouton floral



Stade E2 (3.2)
Le bouton se détache de la couronne foliaire, les bractées sont nettement distinguables des feuilles. Son diamètre varie de 0,5 à 2 cm.



Stade E4 (3.4)
Le bouton est nettement dégagé des feuilles, son diamètre varie de 5 à 8 cm, il demeure horizontal. Une partie des bractées se déploie.



Stade F1 (4.1)
Le bouton floral s'incline; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.



Stade F3.2 (4.3)
Les trois cercles de fleurons les plus externes ont leurs anthères visibles et dégagées et leurs stigmates déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées.

Floraison

Maturation



Stade M0 (5.0)
Chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.



Stade M2 (5.2)
Le dos du capitule est jaune. Les bractées sont aux 3/4 brunes. L'humidité de la graine avoisine 20-25%.



Stade M3 (5.3)
Le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine 15%.



Stade M4 (5.4)
Tous les organes de la plante sont bruns foncés. L'humidité de la graine avoisine 10%.

Solutions utilisées :

- **Composition du milieu MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) additionné ou non de PEG 600.**

| Macro-elements: | Concentration (mg/l) |
|------------------------|-----------------------------|
|------------------------|-----------------------------|

| | |
|---------------------------------|------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 |
|---------------------------------|------|

| | |
|------------------|------|
| KNO ₃ | 1900 |
|------------------|------|

| | |
|--|-----|
| CaCl ₂ - 2 H ₂ O | 440 |
|--|-----|

| | |
|--|-----|
| MgSO ₄ - 7 H ₂ O | 370 |
|--|-----|

| | |
|---------------------------------|-----|
| KH ₂ PO ₄ | 170 |
|---------------------------------|-----|

Micro-éléments :

| | |
|--------------------------------------|------|
| MnSO ₄ - H ₂ O | 22.3 |
|--------------------------------------|------|

| | |
|--|-----|
| ZnSO ₄ - 7 H ₂ O | 8.6 |
|--|-----|

| | |
|--------------------------------|-----|
| H ₃ BO ₃ | 6.2 |
|--------------------------------|-----|

| | |
|----|------|
| KI | 0.83 |
|----|------|

| | |
|---|------|
| Na ₂ MoO ₄ - 2 H ₂ O | 0.25 |
|---|------|

| | |
|--|-------|
| CuSO ₄ - 5 H ₂ O | 0.025 |
|--|-------|

| | |
|--|-------|
| CoCl ₂ - 6 H ₂ O | 0.025 |
|--|-------|

Fer :

| | |
|----------------------|-------|
| Na ₂ EDTA | 37.30 |
|----------------------|-------|

| | |
|---------------------------------------|-------|
| Fe SO ₄ -7H ₂ O | 27.80 |
|---------------------------------------|-------|

Acides aminée et vitamines :

| | |
|---------|-----|
| Glycine | 2.0 |
|---------|-----|

| | |
|-------------------|-----|
| Acide nicotinique | 0.5 |
|-------------------|-----|

| | |
|----------------|-----|
| Pyridoxine HCl | 0.5 |
|----------------|-----|

| | |
|--------------|-----|
| Thiamine HCl | 0.1 |
|--------------|-----|

Sucres:

| | |
|--------------|-----|
| Myo-inositol | 100 |
|--------------|-----|

| | |
|------------|--------|
| Saccharose | 30 000 |
|------------|--------|

| | |
|---------------------------------------|--------|
| Agar : | 10 000 |
| PEG 600 (Pour le lot traité) : | 70 000 |

• **Solutions utilisées pour l'extraction des protéines :**

Solution A : Solution de précipitation

| | |
|-------------------|-----------|
| TCA 100% | 10 ml |
| b-mercaptoethanol | 70 µl |
| Acétone | qsp 100ml |

Solution B : Solution de rinçage

| | |
|-------------------|-----------|
| b-mercaptoethanol | 70 µl |
| Acétone | qsp 100ml |

***Laemmli Buffer* : Tampon de dénaturation**

| | |
|----------------------|------------|
| Tris HCl pH 6.8 (1M) | 6.25 ml |
| SDS 10% | 10 ml |
| b-mercaptoethanol | 1 ml |
| Glycerol | 5 ml |
| H ₂ O | qsp 50 ml. |

• **Solutions utilisées pour la SDS-PAGE :**

Solution mère d'acrylamide à 35% (à préparer avec gants et masque)

| | |
|---------------|------------|
| Acrylamide | 35 g |
| Eau distillée | qsp 100 ml |

Solution mère de bis acrylamide à 2% (à préparer avec gants et masque)

| | |
|----------------|--------|
| Bis acrylamide | 2 g |
| Eau distillée | 100 ml |

Solution stock de SDS à 10%

| | |
|------------------------|------------|
| Sodium Dodécyl Sulfate | 10 g |
| Eau distillée | qsp 100 ml |

Solution d'APS (Ammonium Persulfate) à 1% : à préparer ex tempore

| | |
|---------------|-----------|
| APS | 0.1 g |
| Eau distillée | qsp 10 ml |

Tampon Tris HCl pH 8.8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Tris (hydroxyméthyl aminomethan) | 60.57g |
| Eau distillée | qsp 400 ml |
| Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant | 8 à 10 ml |
| Eau distillée | qsp 500 ml |

Tampon Tris HCl pH 6.8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Tris (hydroxyméthyl aminomethan) | 30.285 g |
| Eau distillée | qsp 200 ml |
| Ajuster à pH 6.8 avec du HCl fumant | 19.5 ml |
| Eau distillée | qsp 250 ml |

Tampon d'électrophorèse

| | |
|----------------------------------|-------------|
| Glycine | 70.55 g |
| Tris (hydroxyméthyl amino Ethan) | 15 g |
| SDS | 5 g |
| Eau distillée | qsp 5000 ml |

Solution de coloration (pour deux gels)

| | |
|---|------------|
| TCA 60% | 100 ml |
| Solution mère de Bleu de Coomassie R250 | 25 ml |
| Eau distillée | qsp 500 ml |

Solution mère de bleu de Coomassie R250

| | |
|------------------------|-------------|
| Bleu de Coomassie R250 | 10 g |
| Ethanol 95° | qsp 1000 ml |

L'éthanol doit être mis en agitation dans l'éprouvette, avec un barreau aimanté. Le bleu de Coomassie est ensuite ajouté (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant). Laisser en agitation au moins deux heures, puis filtrer la solution.

- **Composition du gel de polyacrylamide T= 15 %, C = 0.027 (quantités pour une cuve de 2 gels)**

| Gel de séparation | | Gel de concentration | |
|-------------------|----------|----------------------|----------|
| Solution | Quantité | Solution | Quantité |
| Acrylamide 35% | 33.37 ml | Acrylamide 35% | 2 ml |
| Bis acrylamide 2% | 16.20 ml | Bis acrylamide 2% | 0.6 ml |
| Tris HCl pH 8.8 | 18.8 ml | Tris HCl pH 6.8 | 3.4 ml |
| Eau distillée | 8.83 ml | Eau distillée | 20.4 ml |
| SDS 10% | 0.8 ml | SDS 10% | 0.28 ml |
| APS 1 % | 2.5 ml | APS 1 % | 1.4 ml |
| TEMED | 0.05 ml | TEMED | 0.03 ml |

Test de l'AV₂ pour les différents paramètres mesurés :

- Paramètres mesurés lors de la première partie :

Surface foliaire (SF):

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|--------|----------|----------|-------|-------|
| var | 7 | 451252 | 451252 | 64465 | 26,72 | 0,000 |
| dose | 1 | 11 | 11 | 11 | 0,00 | 0,946 |
| var*dose | 7 | 5380 | 5380 | 769 | 0,32 | 0,940 |

Poids spécifique foliaire (PSF) :

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|------------|----|-----------|-----------|-----------|-------|-------|
| var1 | 7 | 0,0395565 | 0,0395565 | 0,0056509 | 6,49 | 0,000 |
| dose1 | 1 | 0,0481967 | 0,0481967 | 0,0481967 | 55,33 | 0,000 |
| var1*dose1 | 7 | 0,0267621 | 0,0267621 | 0,0038232 | 4,39 | 0,002 |

Teneur relative en eau (TRE) :

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|---------|----------|----------|--------|-------|
| var | 7 | 1619,33 | 1619,33 | 231,33 | 9,95 | 0,000 |
| dose | 1 | 9113,52 | 9113,52 | 9113,52 | 392,06 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 380,68 | 380,68 | 54,38 | 2,34 | 0,048 |

Résistance stomatique (RS) :

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|--------|----------|----------|---------|-------|
| var | 7 | 95387 | 95387 | 13627 | 111,22 | 0,000 |
| dose | 1 | 167820 | 167820 | 167820 | 1369,78 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 111905 | 111905 | 15986 | 130,48 | 0,000 |

Teneur en chlorophylle totale (TCT) :

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|---------|----------|----------|-------|-------|
| var | 7 | 220,199 | 220,199 | 31,457 | 18,33 | 0,000 |
| dose | 1 | 112,853 | 112,853 | 112,853 | 65,76 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 112,747 | 112,747 | 16,107 | 9,38 | 0,000 |

Rendement quantique du PS2 (ØPS2) :

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|----------|----------|----------|--------|-------|
| var | 7 | 0,086836 | 0,086836 | 0,012405 | 6,66 | 0,000 |
| dose | 1 | 0,256376 | 0,256376 | 0,256376 | 137,61 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 0,073598 | 0,073598 | 0,010514 | 5,64 | 0,000 |

- Paramètres mesurés lors de la deuxième partie :

Longueur de la tige

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|----------|----------|----------|---------|-------|
| var | 7 | 10660,1 | 10660,1 | 1522,9 | 28,42 | 0,000 |
| dose | 1 | 114367,7 | 114367,7 | 114367,7 | 2134,39 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 19508,5 | 19508,5 | 2786,9 | 52,01 | 0,000 |

Longueur de la racine

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|--------|----|---------|----------|----------|--------|-------|
| var | 7 | 56611,0 | 56611,0 | 8087,3 | 182,68 | 0,000 |

| | | | | | | |
|----------|---|---------|---------|---------|--------|-------|
| dose | 1 | 35752,1 | 35752,1 | 35752,1 | 807,58 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 46025,9 | 46025,9 | 6575,1 | 148,52 | 0,000 |

Nombre de racines

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|---------|----------|----------|--------|-------|
| var | 7 | 13177,6 | 13177,6 | 1882,5 | 56,69 | 0,000 |
| dose | 1 | 6984,2 | 6984,2 | 6984,2 | 210,31 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 5060,0 | 5060,0 | 722,9 | 21,77 | 0,000 |

Poids frais de la racine

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|---------|----------|----------|---------|-------|
| var | 7 | 1450192 | 1450192 | 207170 | 44,29 | 0,000 |
| dose | 1 | 9630208 | 9630208 | 9630208 | 2059,02 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 868125 | 868125 | 124018 | 26,52 | 0,000 |

Poids frais total

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|----------|----------|----------|---------|-------|
| var | 7 | 1692025 | 1692025 | 241718 | 41,39 | 0,000 |
| dose | 1 | 43244033 | 43244033 | 43244033 | 7405,33 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 1658067 | 1658067 | 236867 | 40,56 | 0,000 |

Masse racinaire/Unité de volume du milieu (Mr/UVM)

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|---------|----------|----------|---------|-------|
| var | 7 | 3625,5 | 3625,5 | 517,9 | 44,29 | 0,000 |
| dose | 1 | 24075,5 | 24075,5 | 24075,5 | 2059,02 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 2170,3 | 2170,3 | 310,0 | 26,52 | 0,000 |

Rapport Poids racine/Poids tige (Pr/Pt)

| Source | DL | SC séq | SC ajust | CM ajust | F | P |
|----------|----|---------|----------|----------|-------|-------|
| var | 7 | 2,92654 | 2,92654 | 0,41808 | 56,53 | 0,000 |
| dose | 1 | 0,20493 | 0,20493 | 0,20493 | 27,71 | 0,000 |
| var*dose | 7 | 2,03162 | 2,03162 | 0,29023 | 39,24 | 0,000 |