

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE  
ENSA/Alger



THESE

Présentée Pour l'obtention du grade de

**Docteur en sciences Agronomiques**

Spécialité : Amélioration des plantes

par : **Mohamed Amine MAROK**

**Implication des mécanismes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la tolérance au stress hydrique chez deux variétés d'orge, Saïda et Express.**

Soutenue publiquement le 27 mai 2014 devant le jury constitué de :

Mr. OUNANE S.M.	Pr ENSA/Alger	Président
Mme ABROUS-BELBACHIR O.	Pr FSB USTHB/Alger	Directrice de thèse
Mr. REY P.	Chercheur(HDR) ,CEA Cadarache	Co-Directeur de thèse
Mme KHELIFI M.	Pr ENSA/Alger	Examineur
Mr.DJEBBAR R.	MCA FSB USTHB/Alger	Examineur

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE  
ENSA/Alger



THESE

Présentée Pour l'obtention du grade de

**Docteur en sciences Agronomiques**

Spécialité : Amélioration des plantes

par : **Mohamed Amine MAROK**

**Implication des mécanismes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans la tolérance au stress hydrique chez deux variétés d'orge, Saïda et Express.**

Soutenue publiquement le 27 mai 2014 devant le jury constitué de :

Mr. OUNANE S.M.	Pr ENSA/Alger	Président
Mme ABROUS-BELBACHIR O.	Pr FSB USTHB/Alger	Directrice de thèse
Mr. REY P.	Chercheur(HDR) ,CEA Cadarache	Co-Directeur de thèse
Mme KHELIFI M.	Pr ENSA/Alger	Examineur
Mr.DJEBBAR R.	MCA FSB USTHB/Alger	Examineur

## **Remerciements**

*Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements les plus sincères au professeur ABROUS pour avoir dirigé cette thèse. Je tiens particulièrement à la remercier de la liberté d'action qu'elle m'a donnée à chaque étape de ce travail. J'espère avoir été digne de la confiance qu'elle m'a accordée et que ce travail est finalement à la hauteur de ses espérances.*

*Mes remerciements s'adressent ensuite à mon co-encadreur de thèse Docteur REY pascal, qui m'a accueilli dans son laboratoire et m'a permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance, MERCI pascal.*

*Mes remerciements s'adressent au Monsieur OUNANE qui m'a porté honneur en acceptant de présider le jury de ce travail et d'y apporter l'éclairage du scientifique. Qu'il me soit permis de vous exprimer mon estime et ma sincère reconnaissance. Je remercie également les membres du jury Professeur KHELIFI et Docteur DJEBBAR d'avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Je tiens à remercier Michel Havaux pour m'avoir accueillie dans son laboratoire CEA de Cadarache, DSV, IBEB. Mes sincères remerciements vont à tous les membres du laboratoire dans lequel j'ai effectué ce travail.*

*J'adresse un très grand merci à tous les membres du Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire des Plantes, CEA, je suis venu et j'ai trouvé une véritable famille.*

*Ce travail de thèse est l'accomplissement de plusieurs années de dur labeur et il est coutume d'adresser un certain nombre de remerciements aux personnes ayant participé de près ou de loin (voir pas du tout) à l'aboutissement et au succès de celui-ci. Si je dois exprimer ma gratitude envers toutes ces personnes, il y aurait probablement plus de pages de remerciements que de rapport scientifique.*

*Merci à mes parents, mon frère et ma soeur pour leur soutien sans oublier mes cher neveux et nièces.*

*Pour mes beaux parents et ma femme, ma meilleure amie, qui me supporte, soutient, écoute, encourage et ..... Ma vie à ses cotés m'a procuré joie, paix et force.*

*Mes pensées vont spécialement à ma défunte mère. Ainsi, je tiens à lui adresser un hommage et lui dédie ce modeste travail. Ton souvenir restera à jamais gravé dans ma mémoire. Paix à ton âme. Pour le reste, c'est avec mon enthousiasme le plus vif que je voudrais rendre mérite à tous ceux qui a leur manière m'ont aidé à mener à bien ce travail de thèse et ont contribué à le rendre possible.*

## ملخص

حساسية النباتات لنقص الماء يعبر عنه بلينخفاض في مردود المحاصيل الزراعية، كمية هذا الانخفاض تختلف باختلاف التراكيب الوراثية. الشعير يتمتع بتنوع وراثي كبير، هذا الأخير يمثل قاعدة ثمينة لتحسين قدرة هذه الأنواع من النباتات على التكيف مع معوقات البيئية. معظم هذه المعوقات يحفز إنتاج أنواع الاكسجين التفاعلية ( ROS )، مما يتسبب في الإجهاد المؤكسد. في هذا العمل، درسنا مستوى الإجهاد المؤكسد وطرق التحقيق في مشاركة مختلف النظم المضادة للأكسدة في الاستجابة للإجهاد المائي باستعمال صنفين من الشعير: اكسبرس، صنف حساس يتأثر للإجهاد المائي و سعيدة، صنف الجزائري المحلي يتحمل الإجهاد المائي. عرضنا النباتات التي نمت لمدة 15 يوما للإجهاد المائي وإعادة سقي في ظروف خاضعة للرقابة. لاحظنا انخفاضا أكبر للمحتوى النسبي المائي في الأوراق خلال مرحلة الإجهاد المائي و مستوى أعلى من الاكسدة تم قياسها عن طريق كروماتوغرافيا السوائل عالية الأداء ( HPLC ) و التصوير التي أظهرت بيروكسيد الدهون عند الصنف الحساس اكسبرس. تم العثور على كميات أعلى بكثير من الجلوتاثيون و أسكوربات عند الصنف الحساس اكسبرس مقارنة بالصنف المحلي سعيدة خلال مرحلة الإجهاد المائي وإعادة سقي. الصنف اكسبرس يظهر أيضا خلال مرحلة الإجهاد المائي زيادات أكبر في وفرة من المواد المضادة للأكسدة ذات الوزن الجزيئي المنخفض مثل  $\alpha$ -توكوفيرول و مادة الكاروتينويد الذين ينتمون الى مجموعة كزانتوفيل. فيما يخص الإنزيمات المرجعة من نوع ثيول التي تحد من الضرر التأكسدي، لاحظنا أن بعض أشكال البيروكسيدوكسين ( Prx ) هي نسبيا أكثر وفرة عند الصنف اكسبرس خلال مرحلة الإجهاد المائي و التي لم يكن هناك اختلاف بين الصنفين فيما يتعلق بكمية ونشاط أنزيم الميثيونين سلفوكسيد ريجكتاز ( MSR ). في المقابل في ظروف الإجهاد المائي، يعرض الصنف سعيدة مستويات أعلى للنشاط للكاتالاز و سوبر أكسيد ديسميوتاز أنزيمات إزالة السموم الناتجة من أنواع الاكسجين التفاعلية. عموما، تظهر هذه البيانات ردود متميزة في آليات مضادة للأكسدة لصنفين الشعير. في الواقع، يرتبط تحمل الإجهاد المائي للصنف سعيدة مقارنة مع اكسبرس بسعة الأنزيمية أعلى لإزالة السموم الناتجة من أنواع الاكسجين التفاعلية ( ROS ). النمط الجيني لصنف الشعير الحساس للإجهاد المائي اكسبرس يسلك كميات أعلى بكثير من المركبات المضادة للأكسدة من الوزن الجزيئي المنخفض. هذه المركبات يمكن أن تمثل خطوط دفاع الثانوية ضد الضرر التأكسدي الناتج عن قدرة أقل من الانزيمات المضادة للأكسدة.

الكلمات الرئيسية: الآليات المضادة للأكسدة؛ الشعير؛ الاكسدة؛ الحساسية للإجهاد المائي.

## Résumé

La sensibilité des plantes au déficit hydrique, qui s'exprime en terme agronomique par une diminution des récoltes, varie fortement d'un génotype à l'autre. L'orge affiche une grande diversité génétique, qui constitue une base précieuse de ressources génétiques vis-à-vis des capacités d'adaptation aux contraintes environnementales. La plupart de ces contraintes stimulent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans les plantes, provoquant ainsi un stress oxydant. Dans ce travail, nous avons estimé le niveau de stress oxydant et la participation de systèmes antioxydants lors de la réponse au manque d'eau de deux génotypes d'orge : Express, une variété sensible et Saïda, une variété locale algérienne sélectionnée pour sa tolérance au déficit hydrique. Les plantes âgées de 15 jours ont été soumises à un déficit hydrique de huit jours puis réhydratées dans des conditions contrôlées. Une diminution plus importante du contenu relatif en eau en condition de déficit hydrique et un niveau plus élevé de stress oxydant évalué par des méthodes HPLC et d'imagerie de la peroxydation lipidique ont été observés chez Express. Nous avons mesuré des teneurs beaucoup plus élevées en glutathion et en ascorbate chez Express par rapport à Saïda en condition de manque d'eau et après réarrosage. Express montre également lors d'un déficit hydrique de plus fortes augmentations des quantités d'antioxydants lipophiles comme l' $\alpha$ -tocophérol et les caroténoïdes de type xanthophylles. Concernant les enzymes de type réductases à thiol qui limitent les dommages oxydants, nous avons remarqué que certaines formes de peroxyrédoxines sont un peu plus abondantes chez Express lors du déficit hydrique et n'avons pas noté de différences importantes entre les 2 génotypes pour la quantité et l'activité des méthionine sulfoxyde réductases. En revanche, le cultivar Saïda présente des niveaux supérieurs des activités catalase et superoxyde dismutase, enzymes détoxiquant les espèces réactives de l'oxygène. Dans l'ensemble, les résultats montrent des réponses distinctes relatives aux mécanismes d'antioxydants chez les deux génotypes d'orge. En effet, la tolérance de Saïda par rapport à Express est associée à une capacité enzymatique d'élimination des ERO plus élevée. Le génotype sensible présente des quantités beaucoup plus fortes de composés antioxydants de faible poids moléculaire. Ces composés pourraient constituer une ligne de défense secondaire contre les dommages oxydants résultant d'une capacité plus faible des systèmes antioxydants enzymatiques.

Mots-clés: mécanismes antioxydants; orge; Stress oxydant; sensibilité au déficit hydrique

## Abstract

The sensitivity of plants to water deficit, which leads to decreased crop yields, varies greatly among genotypes. Barley displays a great diversity, which is a valuable genetic resource for improving the capacity of this species to adapt to environmental constraints. Most of these constraints stimulate the production of reactive oxygen species (ROS) in plants, causing oxidative stress. In this work, we studied the level of oxidative stress and investigated the participation of various antioxidant systems in the response to water deficit of two barley genotypes: Express, a susceptible variety and Saïda, a local Algerian variety tolerant to water deficit. 15-day old plants were subjected to water shortage and rewatered in controlled conditions. We observed a greater decrease in the leaf relative water content in Express during water deficit and a higher level of oxidative stress assessed by HPLC and imaging methods compared to Saïda. Substantially higher amounts of glutathione and ascorbate were found in Express during water deficit and after rewatering. Express also shows during water shortage greater increases in the abundance of lipophilic antioxidants like  $\alpha$ -tocopherol and carotenoids. Concerning enzymes related to thiol reductases that limit oxidative damage, we noticed that some forms of peroxiredoxins are slightly more abundant in Express during water deficit and that there was no difference between the two genotypes regarding the amount and activity of methionine sulfoxide reductases. In contrast, in water deficit conditions, the cultivar Saïda displays higher activity levels, than Saïda, for catalase and superoxide dismutase, enzymes detoxifying reactive oxygen species. Overall, these data show distinct responses in antioxidant mechanisms in the two contrasted barley genotypes. Indeed, the tolerance of Saïda is associated with a higher enzymatic capacity of ROS detoxification. The susceptible genotype exhibits much higher amounts of antioxidant compounds of low molecular weight. These compounds could constitute a secondary line of defense against oxidative damage resulting from the lower capacity of antioxidant enzymes.

Keywords: Antioxidant mechanisms ; Barley ;Oxidative stress; Sensitivity Water deficit

## Liste des abréviations

---

<b>ABA :</b>	acide abscissique	<b>NAD(P)H :</b>	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
<b>ACA :</b>	Acide aminocaproïque	<b>NBT :</b>	nitro-blue-tetrazolium
<b>APS :</b>	ammonium persulfate	<b>NHS</b>	N-hydroxysuccinimide
<b>APx :</b>	ascorbate peroxydase	<b>npq :</b>	non photochemical quenching
<b>ASC :</b>	acide L-ascorbique	<b>NTA :</b>	nitrilo triacetic acid
<b>ATP :</b>	adénosine triphosphate	<b>NTR :</b>	NADPH thiorédoxine réductase
<b>ATPase :</b>	ATP synthase	<b>PAGE :</b>	polyacrylamide gel electrophoresis
<b>BAM :</b>	benzamidine	<b>PC :</b>	plastocyanine
<b>BAP :</b>	benzyl amino purine	<b>PEG :</b>	polyéthylène glycol
<b>BCIP :</b>	5-bromo-4-chloro-3-indoylphosphate	<b>pI :</b>	point isoélectrique
<b>BEt :</b>	bromure d'éthydiium	<b>PMSF :</b>	fluorure de phényl méthyl-sulfone
<b>BSA :</b>	bovine serum albumine	<b>PQ :</b>	plastoquinone
<b>Cab :</b>	chlorophyll a/b binding protein	<b>Prx :</b>	peroxirédoxine
<b>CDSP :</b>	chloroplastic drought-induced stress protein	<b>PS I et PS II :</b>	photosystème I et photosystème II
<b>chl :</b>	chlorophylle	<b>Q<sub>A</sub> :</b>	quinone A
<b>COR :</b>	cold regulated	<b>q<sub>E</sub> :</b>	extinction non photochimique de la fluorescence de la chlorophylle
<b>2-CP :</b>	peroxyrédoxine à deux cystéines	<b>RAB :</b>	responsive to ABA
<b>CRE :</b>	contenu relatif en eau	<b>RubisCo :</b>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
<b>cyt :</b>	cytochrome	<b>RuBP :</b>	ribulose 1,5 bisphosphate
<b>DHA</b>	déshydroascorbate	<b>SDS :</b>	dodécyl sulfate de sodium
<b>DHAR :</b>	DHA réductase	<b>SOD :</b>	superoxyde dismutase
<b>DO :</b>	densité optique	<b>TBE :</b>	Tris borate EDTA
<b>DRE :</b>	dehydration responsive element	<b>TBST :</b>	Tris buffer saline Tween 20
<b>DSP :</b>	dessiccation stress protein	<b>t-BOOH :</b>	tert-butyl hydroperoxide
<b>DTNB :</b>	di-thio-bis nitro benzoic acid	<b>Temed :</b>	N, N, N', N'-tétra méthyl éthylène diamine
<b>DTT :</b>	dithiothréitol	<b>TL :</b>	thermoluminescence
<b>ERO :</b>	espèce réactive de l'oxygène	<b>TR :</b>	thiorédoxine réductase
<b>EDTA :</b>	ethylene diamine tetra acetic acid	<b>Trx :</b>	thiorédoxine
<b>FNR :</b>	ferrédoxine NADP réductase	<b>Tricine :</b>	N-Tris [hydroxyméthyl] méthylglycine
<b>FPLC :</b>	fast performance liquid chromatography	<b>Tris :</b>	Tris [hydroxyméthyl] aminométhane ou trizma base
<b>GSH :</b>	glutathion réduit	<b>TS :</b>	type sauvage
<b>GSSG :</b>	glutathion oxydé	<b>Tween 20 :</b>	polyoxyéthylène-sorbitan monolaurate 20
<b>GR :</b>	glutathion réductase	<b>U :</b>	unité enzymatique
<b>15-HEDE :</b>	15-hydroxy-11,13(Z,E)-eicosadienoic acid	<b>UA :</b>	unité arbitraire
<b>HODE :</b>	hydroxy octodecadienoic acid	<b>UV :</b>	ultra violet
<b>HOTE :</b>	hydroxy octodeca trienoic acid	<b>v :</b>	volume
<b>HPLC :</b>	high performance liquid chromatography		
<b>IEF :</b>	isoélectrofocalisation		
<b>LB :</b>	Luria Broth		
<b>LHC :</b>	light harvesting complex		
<b>m :</b>	masse		
<b>MDHA :</b>	mono déhydroascorbate		
<b>NAD(P)<sup>+</sup> :</b>	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)		

# Liste des Tableaux et Figures

---

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Solution nutritive de Coïc et Lesaint (1971) à pH 5,8.....	<b>70</b>
<b>Tableau 2:</b> Composition du milieu A .....	<b>83</b>
<b>Tableau 3:</b> Composition du tampon de stockage hypotonique des chloroplastes. ....	<b>83</b>
<b>Tableau 4:</b> Composition du gel de concentration à 5% d'acrylamide (m/v) (pour 4 gels d'épaisseur 1 mm).....	<b>85</b>
<b>Tableau 5:</b> Composition du gel de séparation à 13% d'acrylamide (m/v) (pour 4 gels d'épaisseur de 1 mm).....	<b>85</b>
<b>Tableau 6:</b> Contenu relatif en eau des tissus foliaires des génotypes d'orge Saïda et Express soumis à un déficit hydrique et un réarrosage. ....	<b>90</b>
<b>Tableau 7:</b> Nombre de feuilles présentant au moins 50% de la surface sèche ou nécrosée dans des plantes d'orge des variétés Saïda et Express soumises à un déficit hydrique pendant 8 jours, puis réarrosées pendant 9 jours.....	<b>90</b>
<b>Tableau 8:</b> Tableau récapitulatif des teneurs en chlorophylles, caroténoïdes et tocophérols ( $\mu\text{g.g}$ poids $\text{sec}^{-1}$ ) dans les tissus foliaires de plants d'orge des variétés Saïda et Express normalement arrosés, soumis à un déficit hydrique ou soumis à un déficit hydrique et réarrosés. ....	<b>99</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Fonctions des gènes inductibles par le déficit hydrique dans les mécanismes de tolérance d'après Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki (2007).....	<b>20</b>
<b>Figure 2 :</b> Les niveaux de transfert d'énergie générant les principaux types d'espèces réactives de l'oxygène d'après Halliwell (2006).....	<b>25</b>
<b>Figure 3 :</b> La gestion de la production d' $^1\text{O}_2$ chez les plantes d'après Triantaphylidès et Havaux (2009). ....	<b>28</b>
<b>Figure 4:</b> Les principaux sites de production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ dans les cellules photosynthétiques selon Mhamdi et al. (2010).....	<b>29</b>

<b>Figure 5:</b> Sites de génération des ERO dans la chaîne photosynthétique. Les ERO sont formées au niveau du complexe de dissociation de l'eau (1), des sites accepteurs du PSII (2) et donneurs d'électrons du PSI (3), de la ferrédoxine réduite (4) et des antennes collectrices d'énergie lumineuse (5). .....	<b>32</b>
<b>Figure 6:</b> Les produits de la peroxydation lipidique chez les plantes d'après Møller et al, (2007). .....	<b>38</b>
<b>Figure 7:</b> Les produits d'oxydation des acides aminés de type cystéine et méthionine par les ERO d'après Møller et al, (2007). .....	<b>40</b>
<b>Figure 8:</b> Représentation schématique des systèmes de dissipation des photons et des électrons en excès au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse selon Niyogi (2000). .....	<b>41</b>
<b>Figure 9:</b> Cycle et voie de biosynthèse des xanthophylles chez les plantes selon Davison et al. (2002) .....	<b>42</b>
<b>Figure 10 :</b> Importance physiologique du glutathion d'après Noctor et al. (2012). .....	<b>47</b>
<b>Figure 11 :</b> Les principales réactions du cycle ascorbate-glutathion (Foyer et Noctor, 2008)	<b>50</b>
<b>Figure 12:</b> Cycle catalytique de la superoxyde réductase d'après Niviere et Fontecave (2004). .....	<b>55</b>
<b>Figure 13:</b> Structure tridimensionnelle de la thiorédoxine d'épinard d'après Capitani et al. (2000). .....	<b>59</b>
<b>Figure 14:</b> Mécanisme catalytique des thiorédoxines. Nter et Cter désignent respectivement les Cys situées en N-terminal et C-terminal du site actif (Meyer et al., 1999). .....	<b>60</b>
<b>Figure 15:</b> Localisation subcellulaire des principales thiorédoxines végétales (Vieira Dos Santos et Rey, 2006). .....	<b>61</b>
<b>Figure 16 :</b> Oxydation et suroxydation des Prx : ROOH et ROH peroxyde lipidique et alcool correspondant, Trx(SS) et Trx(SH) <sub>2</sub> thiorédoxine respectivement oxydée et réduite, Red (réducteur), Srx (sulfirédoxine). .....	<b>64</b>
<b>Figure 17 :</b> Localisation subcellulaire des Prxs chez <i>A. thaliana</i> . (Dietz, 2011). .....	<b>65</b>
<b>Figure 18:</b> Mécanismes catalytiques des MSRs à deux cystéines rédox-actives (A) et à une cystéine rédox-active d'après Tarrago et al. (2009). .....	<b>67</b>
<b>Figure 19:</b> Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, des chlorophylles et caroténoïdes extraits de disques foliaires d'orge. ....	<b>72</b>
<b>Figure 20:</b> Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, des tocophérols extraits de disques foliaires d'orge. $\gamma$ -t : $\gamma$ -tocophérol, $\alpha$ -t : $\alpha$ -tocophérol. ....	<b>73</b>
<b>Figure 21:</b> Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, du glutathion extrait de disques foliaires d'orge. ....	<b>74</b>
<b>Figure 22:</b> Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, de l'acide ascorbique extrait de disques foliaires d'orge. ....	<b>75</b>

<b>Figure 23:</b> Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, des différents hydroxy acides extraits de disques foliaires d'orge.....	<b>77</b>
<b>Figure 24:</b> Phénotype des plantes de deux variétés d'orge, Express et Saïda, soumises à un déficit hydrique et après réarrosage. ....	<b>91</b>
<b>Figure 25 :</b> Teneurs en chlorophylles chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique .....	<b>93</b>
<b>Figure 26:</b> Teneurs en violaxanthine, anthéroxanthine et zéaxanthine chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique .....	<b>95</b>
<b>Figure 27:</b> Teneurs en lutéine et en $\beta$ -carotène chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique .....	<b>96</b>
<b>Figure 28:</b> Teneurs en $\alpha$ -tocophérol et $\gamma$ -tocophérol chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique.....	<b>98</b>
<b>Figure 29:</b> Teneur en glutathion chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique. ....	<b>101</b>
<b>Figure 30:</b> Teneur en ascorbate chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique. ....	<b>102</b>
<b>Figure 31:</b> Activité de décomposition du peroxyde d'hydrogène et abondance de la catalase dans des feuilles de deux variétés d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique.....	<b>105</b>
<b>Figure 32:</b> Activité superoxyde dismutase chez les génotypes d'orge Saïda et Express dans différentes conditions de régime hydrique .....	<b>106</b>
<b>Figure 33:</b> Analyse-de l'activité des isoenzymes de la SOD sur gel à partir d'extraits de feuilles de deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises à différentes conditions de régime hydrique	<b>108</b>
<b>Figure 34:</b> Intensité relative par rapport au témoin des deux bandes SOD révélées sur gel à partir d'extraits de feuilles de deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises au déficit hydrique et au réarrosage. ....	<b>108</b>
<b>Figure 35:</b> Analyse de l'abondance foliaire des Prx plastidiales par Western blot chez deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises à différentes conditions de régime hydrique.....	<b>110</b>
<b>Figure 36 :</b> Analyse de l'abondance foliaire des MSR's plastidiales par Western blot dans les deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises à différentes conditions de régime hydrique....	<b>111</b>
<b>Figure 37:</b> Activité MSR dans des extraits de feuilles de deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises à différentes conditions de régime hydrique .....	<b>113</b>
<b>Figure 38:</b> Teneur en hydroperoxydes de lipides (HOTE) générés par des ERO chez les deux génotypes d'orge, Saïda et Express, soumis à différentes conditions de régime hydrique....	<b>114</b>

**Figure 39:** Teneur en hydroperoxydes de lipides générés par des LOX chez les deux génotypes d'orge, Saïda et Express, soumis à différentes conditions de régime hydrique. ....**115**

**Figure 40:** Imagerie du stress oxydant par autoluminescence chez les feuilles des deux génotypes d'orge, Saïda et Express, soumis à un déficit hydrique pendant 8 jours et après réarrosage durant 3 jours. .... **117**

Introduction.....	15
Synthèse bibliographique.....	17
1. Présentation de l'espèce.....	17
2. Effets du déficit hydrique sur la plante et stratégies d'adaptation... 18	18
2.1. MECANISMES D'ADAPTATION D'UNE PLANTE SOUMISE AU DEFICIT HYDRIQUE.....	20
2.1.1. L'échappement ou esquive.....	20
2.1.2. L'évitement de la déshydratation.....	21
2.1.3. La tolérance à la déshydratation.....	21
2.2. EFFETS DU DEFICIT HYDRIQUE SUR L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE .....	22
3. Les réponses moléculaires des plantes face aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées lors d'un déficit hydrique.....	23
3.1. DEFICIT HYDRIQUE, OXYGENE ET STRESS OXYDANT .....	24
3.2. GENERATION DES ERO ET CONSEQUENCES LIEES A LEUR ACCUMULATION .....	26
3.2.1. Le superoxyde $O_2^{\cdot -}$ .....	27
3.2.2. L'oxygène singulet ( $^1O_2$ ).....	28
3.2.3. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) .....	29
3.2.4. Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ).....	30
3.3. LE METABOLISME CELLULAIRE ET LES ZONES DE PRODUCTION DES ERO .....	31
3.3.1. Au niveau du chloroplaste .....	31
3.3.2. Au niveau de la mitochondrie.....	32
3.3.3. Au niveau du peroxyosome .....	33
3.3.4. Au niveau du réticulum endoplasmique.....	34
3.4. ROLE DES ERO DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE .....	35
3.5. TOXICITE DES ERO .....	35
3.5.1. Oxydation des acides nucléiques .....	35
3.5.2. Oxydation des lipides.....	36
3.5.3. Oxydation des protéines .....	39
4. Les mécanismes de protection et de défense contre les ERO.....	40
4.1. EVITEMENT DE PRODUCTION DES ERO.....	40
4.1.1. La réduction de l'absorption lumineuse par la dissipation physique .....	41
4.1.2. La photorespiration.....	43
4.1.3. La chlororespiration.....	43
4.1.4. La respiration mitochondriale.....	45
4.2. DETOXICATION DES ERO.....	46
4.2.1. Les systèmes antioxydants non enzymatiques de bas poids moléculaire.....	47
4.2.1.1. Le glutathion .....	47
4.2.1.2. L'ascorbate (acide ascorbique ou vitamine C) .....	49
4.2.1.3. L'alpha-tocophérol (vitamine E) .....	51
4.2.1.4. Les flavonoïdes .....	52
4.2.1.5. Les caroténoïdes .....	53
4.2.2. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	54
4.2.2.1. Superoxyde dismutase et superoxyde réductase .....	54
4.2.2.2. Catalase et enzymes du cycle ascorbate-glutathion .....	55
4.2.2.3. Les glutathion S-transférases .....	58
4.2.2.4. Les thiorédoxines (TRX) et glutarédoxines (GRX).....	59
4.2.2.5. Les cibles des thiorédoxines végétales impliquées dans la protection contre le stress oxydant 63	63
A. Les peroxydases à thiol.....	63

B. Les méthionines sulfoxyde réductases (MSR) .....	66
<b>Objectifs de la thèse</b> .....	<b>69</b>
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>70</b>
<b>1. Matériel végétal, conditions de culture et traitements expérimentaux</b>	<b>70</b>
1.1. MATERIEL VEGETAL ET CONDITIONS DE CULTURE .....	70
1.2. TRAITEMENTS EXPERIMENTAUX.....	71
<b>2. Analyses biochimiques</b> .....	<b>71</b>
2.1. DOSAGE DES CHLOROPHYLLES, DES CAROTENOÏDES ET DE LA VITAMINE E .....	72
2.2. DOSAGE DU GLUTATHION .....	73
2.3. DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE.....	74
2.4. MESURE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE PAR HPLC.....	75
2.5. IMAGERIE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE PAR AUTOLUMINESCENCE.....	77
2.6. MESURE DE LA DECOMPOSITION ENZYMATIQUE DU PEROXYDE D'HYDROGENE (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	78
2.7. MESURE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE TYPE SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD) ..	78
2.7.1. <i>Dosage par spectrophotométrie</i> .....	78
2.7.2. <i>Révélation de l'activité SOD sur gel natif</i> .....	79
2.8. DOSAGE DE L'ACTIVITE METHIONINE SULFOXYDE REDUCTASE .....	81
<b>3. Analyse et détection des protéines</b> .....	<b>82</b>
3.1. EXTRACTION DES PROTEINES .....	82
3.1.1. <i>Extraction des protéines solubles foliaires</i> .....	82
3.1.2. <i>Extraction des protéines chloroplastiques solubles</i> .....	82
3.2. DOSAGE DES PROTEINES .....	83
3.3. ELECTROPHORESE SDS-PAGE EN CONDITIONS DENATURANTES .....	84
3.4. IMMUNODETECTION SUR MEMBRANE (OU WESTERN BLOT).....	85
3.4.1. <i>Electrotransfert</i> .....	85
3.4.2. <i>Immunodétection sur membrane (ou Western blot)</i> .....	86
3.4.2.1. Révélation chromogénique avec le système phosphatase alcaline .....	86
3.4.2.2. Révélation basée sur la fluorescence (système Licor) .....	86
<b>Résultats et Discussion</b> .....	<b>88</b>
<b>1. Résultats</b> .....	<b>88</b>
1.1. EFFETS PHYSIOLOGIQUES DU DEFICIT HYDRIQUE SUR LES PLANTES DE DEUX VARIETES D'ORGE SAÏDA ET EXPRESS .....	88
1.2. CONTENUS EN CHLOROPHYLLES, CAROTENOÏDES ET TOCOPHEROLS .....	92
1.2.1. <i>Composition en chlorophylles</i> .....	92
1.2.2. <i>Composition en caroténoïdes</i> .....	93
1.2.3. <i>Composition en tocophérols</i> .....	96
1.3. CONTENU EN GLUTATHION .....	100
1.4. CONTENU EN ASCORBATE .....	101
1.5. DECOMPOSITION DU PEROXIDE D'HYDROGENE ET ACTIVITE CATALASE.....	103
1.6. ACTIVITE SUPEROXYDE DISMUTASE .....	106
1.6.1. <i>Mesure par spectrophotométrie</i> .....	106
1.6.2. <i>Séparation des isoformes SOD par électrophorèse</i> .....	107
1.7. CONTENU EN OXYDOREDUCTASES A THIOL ET ACTIVITE METHIONINE SULFOXYDE REDUCTASE (MSR) .....	109
1.7.1. <i>Contenu en oxydoréductases à thiol</i> .....	109
1.7.1.1. Abondance des peroxirédoxines (Prx) .....	109
1.7.1.2. Abondance et activité des méthionine sulfoxyde réductases (MSR) .....	110
A. Abondance des MSR .....	110
B. Quantification de l'activité MSR par HPLC .....	112
1.8. MESURES DU NIVEAU DE PEROXYDATION LIPIDIQUE .....	113

1.8.1.	<i>Quantification des différents hydroxy acides gras par dosage HPLC</i> .....	113
1.8.2.	<i>Evaluation du niveau de peroxydation lipidique par imagerie</i> .....	116
2.	<b>Discussion</b> .....	118
	<b>Conclusions et Perspectives</b> .....	125
	<b>Publication scientifique</b> .....	127
	<b>Références bibliographiques</b> .....	142

En raison de leur incapacité à se déplacer, les végétaux sont très dépendants des facteurs climatiques. Les contraintes environnementales abiotiques comme la sécheresse et la chaleur sont les principaux déterminants limitant la croissance et le rendement des plantes à travers le monde (Wang *et al.*, 2003 ; Ceccarelli, 2010).

La disponibilité en eau pour les plantes est un facteur crucial pour l'agriculture. Cette disponibilité est principalement influencée par des facteurs liés au sol et au climat (Blum, 2005; Neumann, 2008).

Parmi les céréales, l'orge (*Hordeum vulgare*) est l'une des espèces les plus largement cultivées dans le monde. Grâce à sa diversité génétique, l'orge présente une remarquable faculté d'adaptation à un large éventail d'environnements qui s'étend de l'Arctique aux régions tropicales, et qui comprend également les hautes altitudes (von Bothmer *et al.*, 2002).

Cette diversité est une source précieuse pour l'amélioration des cultures. Elle constitue une base fondamentale pour étudier les processus d'adaptation et identifier les gènes et les régions génomiques impliquées dans les mécanismes de tolérance au stress.

L'orge est largement cultivée dans les régions méditerranéennes, qui sont caractérisées par un régime de précipitations très variables et souvent faibles (Baum *et al.*, 2007). L'adaptation des plantes comme l'orge au manque d'eau est réalisée aux niveaux moléculaires, biochimiques, physiologiques et anatomiques.

La tolérance à la sécheresse est la résultante de nombreux mécanismes anatomiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires complexes. De nombreuses études ont démontré que des mécanismes liés à la conductance stomatique, à l'absorption des nutriments, aux hormones, aux osmolytes et aux antioxydants jouent un rôle important dans la tolérance des plantes à la sécheresse ; ces mécanismes couplés à des systèmes antioxydants efficaces, sont souvent les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique (Ingram et Bartels, 1996 ; Tardieu, 2005).

La croissance cellulaire et la photosynthèse sont parmi les processus affectés en premier lieu par le déficit en eau (Chaves, 1991). En effet, les conditions de sécheresse conduisent généralement à des dommages oxydants importants (Smirnoff, 1993), qui résultent en partie de l'affaiblissement de la machinerie photosynthétique. Une diminution de l'activité photosynthétique est généralement observée dès les premiers stades de manque d'eau du fait de la diffusion limitée du CO<sub>2</sub> à travers les

stomates (Flexas *et al.*, 2004). En conséquence, les plantes sont exposées à un excès d'énergie lumineuse, qui ne peut être convertie en énergie biochimique. Ceci conduit à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Demmig-Adams et Adams, 1992; Foyer et Noctor, 2005).

Le stress oxydant survient lorsque la capacité antioxydante des cellules végétales est saturée par des niveaux élevés en ERO. Ceci aboutit à des effets d'altération et des dommages sur toutes les macromolécules.

Les plantes ont développé un ensemble complexe de systèmes antioxydants pour prévenir les dommages oxydants. En effet, elles possèdent de nombreux composés antioxydants de bas-poids moléculaire, soit solubles comme l'ascorbate et le glutathion, soit lipophiles tels les caroténoïdes et les tocophérols (Noctor et Foyer, 1998; Havaux et Niyogi, 1999; Havaux *et al.*, 2005).

Elles possèdent également divers types d'enzymes antioxydantes bien caractérisées comme les superoxyde dismutases (SOD), les catalases (CAT) et les peroxydases (Apel et Hirt, 2004). De nombreuses études ont démontré que ces systèmes participent aux réponses des céréales au déficit hydrique. Par exemple, Loggini *et al.*, (1999) ont rapporté, chez un cultivar de blé sensible, une teneur plus élevée en zéaxanthine, un caroténoïde qui participe à la protection contre l'oxydation des lipides par la dissipation non radiative de l'énergie en excès, par rapport à des cultivars tolérants.

En utilisant les séquences EST générées à partir d'une banque d'ADNc, Gorantla *et al.*, (2007) ont identifié des gènes induits par la sécheresse dans des plants de riz et observé que les gènes codant pour les isoformes SOD et CAT sont régulés en réponse au déficit hydrique. Chez le blé, la sécheresse provoque l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'expression du gène CAT et une augmentation de l'activité CAT (Luna *et al.*, 2005).

En ce qui concerne l'orge, relativement peu de données sont disponibles concernant le rôle des systèmes antioxydants dans les réponses de cette espèce à des conditions de déficit hydrique. Parmi les 34 gènes exprimés spécifiquement dans deux cultivars d'orge résistant à la sécheresse, plusieurs codent pour des protéines impliquées dans la détoxification des composés de type ERO comme une aldéhyde déshydrogénase, une glutathion-S-transférase et une ascorbate oxydoréductase (Guo *et al.*, 2009).

Il paraît donc important de caractériser et d'utiliser chez l'orge des ressources génétiques caractérisées par une tolérance marquée au déficit hydrique et de comprendre les mécanismes et les bases moléculaires qui contribuent à leur capacité d'adaptation face à cette contrainte. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail de thèse de doctorat.

## 1. Présentation de l'espèce

---

Depuis des siècles, les êtres humains ont recours à l'orge (*Hordeum vulgare* L.) dans leur alimentation ou pour l'alimentation animale. La production d'orge occupe le quatrième rang au niveau mondial parmi les céréales après le maïs, le riz et le blé (FAO 2013).

L'orge est la culture la plus fréquente dans les régions sèches qui adoptent l'agriculture pluviale, car cette céréale est bien adaptée aux contraintes abiotiques (Baum *et al.*, 2007).

En Afrique du Nord, l'orge est une culture typique des zones marginales, elle est souvent soumise à des conditions de sécheresse extrême qui affectent de manière significative sa production (Ceccarelli, 1994; Ceccarelli *et al.*, 2007).

Les variétés locales ont été définies par Zeven (1998) comme des variétés autochtones présentant une grande capacité à tolérer des stress biotique et abiotique. Ces variétés se caractérisent par un niveau de rendement intermédiaire dans un système agricole à faibles intrants.

Après avoir évolué durant des milliers d'années dans une multitude d'environnements, les variétés locales ont développé des modèles nombreux de variabilité qui leur ont permis de s'adapter à un large éventail d'environnements. Elles représentent un réservoir en grande partie inexploité de gènes utiles pour l'adaptation aux contraintes biotiques et abiotiques (Brosse, 1995).

Cette adaptation est attribuée à la plasticité de caractères morphologiques tels que la production de biomasse, la croissance de la plante et le nombre de talles (Shakhatreh *et al.*, 2010).

De plus, l'orge est caractérisée par une variabilité génétique importante pour des paramètres physiologiques tels que la teneur relative en eau et les niveaux de fluorescence de la chlorophylle, qui reflètent l'activité photosynthétique, sous contrainte environnementale (Oukarroum *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2013).

Cette variabilité est révélatrice de différences dans les mécanismes de tolérance au stress qui permettent à la plante de maintenir les activités cellulaires en situation de contrainte environnementale (Bartels et Sunkar, 2005).

Cependant, les connaissances sur l'expression du génome en condition de contraintes et sur les mécanismes impliqués dans la capacité d'adaptation restent encore très limitées chez l'orge. Étudier les mécanismes de tolérance à la sécheresse de l'orge pourrait faciliter une meilleure compréhension chez cette espèce des bases génétiques de la tolérance au déficit hydrique, et ainsi permettre l'utilisation efficace des approches génétiques et génomiques chez d'autres céréales pour la tolérance au déficit hydrique.

## 2. Effets du déficit hydrique sur la plante et stratégies d'adaptation

Les plantes perçoivent et réagissent rapidement aux modifications de la quantité d'eau dans les cellules à travers une série d'événements parallèles d'ordres anatomique, physiologique, cellulaire et moléculaire (Chaves *et al.*, 2009).

L'adaptation des plantes à des environnements hostiles implique une multitude de réponses métaboliques et de modifications physiologiques qui peuvent permettre leur acclimatation et leur survie (Lawlor, 2009).

Il existe des régions où la sécheresse est quasi-permanente (climat désertique) ou intense et régulière au gré des saisons (climat méditerranéen). Les plantes qui peuplent ces milieux sont adaptées à ces conditions.

Ainsi, il existe de nombreuses et diverses adaptations métaboliques (métabolismes de types C4 ou CAM), anatomiques (cuticules épaisses, feuilles modifiées, surface réduite, plantes succulentes, présence d'un caudex) et physiologiques (cycles de développement courts) permettant aux plantes de se développer et de se reproduire dans les milieux secs.

Dans les autres régions, au contraire, les périodes sèches sont souvent courtes et parfois imprévisibles. Les plantes qui peuplent ces milieux non extrêmes (mésophytes) ont développé des mécanismes permettant de répondre ponctuellement à ces périodes de déficit hydrique afin d'éviter la déshydratation cellulaire.

La plupart des plantes supérieures se trouvent donc fréquemment confrontées au cours de leur cycle à des périodes plus au moins longues, où les apports d'eau sont inférieurs à leurs besoins, qui sont définies comme des périodes de déficit hydrique.

Cependant, les réponses des plantes au déficit hydrique varient en fonction de la sévérité de la contrainte et de sa durée (Bray, 1997; Chaves *et al.*, 2003; Kim et van Iersel, 2011).

De nombreuses études ont rapporté les réactions physiologiques, moléculaires et biochimiques des plantes face à la sécheresse (Chaves *et al.*, 2003).

Ces réponses comprennent la fermeture des stomates déclenchée par la production d'acide abscissique (ABA), une phytohormone qui provoque la fermeture de ces pores et induit l'expression de gènes liés au stress et une répression de la croissance cellulaire et de la photosynthèse avec une activation de la respiration (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2005).

Aux niveaux cellulaires et moléculaires, une accumulation d'osmolytes ou osmorégulateurs qui sont des composés solubles de bas poids moléculaire se produit ; en s'accumulant à une concentration élevée, ces osmolytes permettent le maintien du volume cellulaire sans altérer le métabolisme.

Ce sont essentiellement des acides aminés et leurs dérivés (proline, glycine bêtaïne) des sucres et des divers alcools. Des protéines spécifiquement impliquées dans la tolérance à la déshydratation cellulaire sont également synthétisées (Shinozaki *et al.*, 2003; Bartels et Sunkar, 2005).

Ainsi, des gènes avec des fonctions diverses sont induits ou réprimés par le déficit hydrique ou d'autres contraintes osmotiques (Bartels et Sunkar, 2005; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2005; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2007) (Figure 1).

D'un point de vue expérimental, la complexité des réponses entraîne la nécessité de définir et de contrôler le déficit en eau en termes de disponibilité dans le substrat, d'activité photosynthétique, d'état hydrique des plantes, ainsi que le rayonnement auquel les plantes sont exposées (Jones, 2007; Dehryolos, 2010).

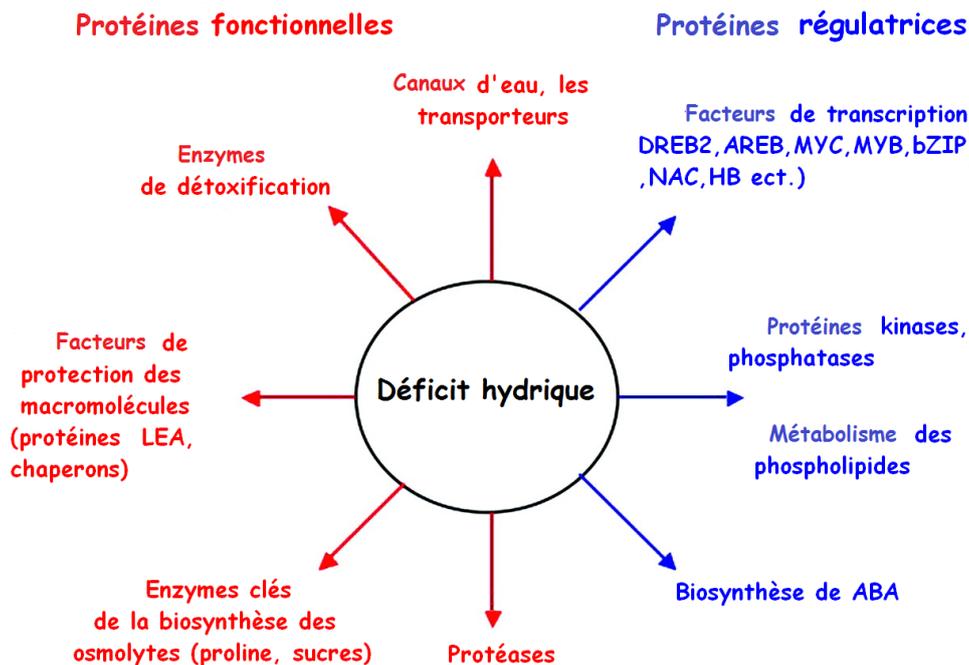


Figure 1: Fonctions des gènes inductibles par le déficit hydrique dans les mécanismes de tolérance d'après Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki (2007).

## 2.1. Mécanismes d'adaptation d'une plante soumise au déficit hydrique

D'un point de vue agronomique, la tolérance à la sécheresse est la capacité de la plante à croître et donner des rendements satisfaisants dans des zones sujettes à des déficits hydriques épisodiques (Chaves et Oliveira, 2002).

Jones (1992) a défini et établi une classification des 'stratégies' d'adaptation des plantes au déficit hydrique. La première consiste à « éviter » toute déshydratation générée par l'environnement extérieur et inclut l'échappement ou esquivé et l'évitement. La deuxième stratégie consiste à développer une capacité à « tolérer cette déshydratation ».

### 2.1.1. L'échappement ou esquivé

L'esquivé fait intervenir le cycle de la plante afin de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adéquation de son cycle de culture à la longueur de la saison des pluies pour éviter au maximum les périodes sèches. La variabilité génétique pour la longueur de

cycle est généralement importante chez les plantes. La sélection de variétés plus précoces permet d'éviter le déficit hydrique dans des périodes critiques pour la plante.

Le rendement de nombreuses variétés a été amélioré par une sélection basée sur le raccourcissement des longueurs de cycle (précocité), ceci chez pratiquement toutes les espèces cultivées annuelles (Tuner *et al.*, 2001) comme les légumineuses (Subbarao 1995) et les céréales (Fukai *et al.*, 1999; Fukai et Cooper 1995).

### 2.1.2. L'évitement de la déshydratation

Deux grands types de réponses permettent à la plante d'éviter ou, plus exactement, de supporter une sécheresse significative tout en limitant la déshydratation de ses tissus (Tuner *et al.*, 2001). Ce mécanisme est appelé « évitement », en anglais « avoidance » ou parfois « dehydration postponement ».

Le premier type de réponse est lié à l'efficacité de l'extraction de l'eau du sol par les racines. En augmentant la densité et la profondeur de leurs racines, les plantes peuvent améliorer l'exploitation des réserves en eau du sol en condition de manque d'eau. Ceci constitue une réponse particulièrement efficace pour la production de graines en fin de cycle (Passioura 1977).

Le deuxième type concerne la régulation de l'ouverture et fermeture des stomates, pores foliaires conditionnant les échanges en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O et par conséquent la croissance et la productivité des cultures (Ludlow et Muchow 1990 ; Turner 1997).

La régulation de la conductance stomatique joue un rôle important dans cet aspect, car elle dépend du potentiel hydrique foliaire et de l'humidité de l'air au champ (Turner 1997). Une faible conductance est généralement proposée comme un trait favorable à l'adaptation à la sécheresse (Bunce 2006).

### 2.1.3. La tolérance à la déshydratation

La tolérance à la déshydratation cellulaire correspond à la capacité de la plante à assurer ses fonctions physiologiques malgré l'abaissement de son potentiel hydrique.

L'ajustement osmotique est un processus majeur de l'adaptation des plantes à la déshydratation. Il consiste en une accumulation active de solutés ou osmolytes dans le compartiment cellulaire, de façon à maintenir la pression de turgescence lorsque le potentiel hydrique décroît (Turner 1986).

Le maintien de la turgescence lors d'un déficit hydrique permet de retarder la fermeture des stomates (Passioura, 1996), de maintenir le volume chloroplastique et de réduire le flétrissement foliaire.

Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance à la déshydratation cellulaire et permet un maintien de l'activité métabolique. Une autre conséquence du maintien du métabolisme carboné sera une diminution de la fréquence des épisodes de photoinhibition (Blum et Ebercon, 1981 ; Medrano *et al.*, 2003). Les produits carbonés peuvent alors être utilisés autant pour l'ajustement osmotique que pour la croissance racinaire.

## 2.2. Effets du déficit hydrique sur l'activité photosynthétique

---

Le manque d'eau est considéré comme une des contraintes abiotiques les plus dommageables en termes de croissance et de productivité pour les plantes (Boyer, 1982). En effet, lors d'un déficit hydrique, l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse, est affectée.

En tant que processus-clé du métabolisme primaire, la photosynthèse joue un rôle central dans le maintien de la performance des plantes en cas de déficit hydrique (Chaves *et al.*, 2003, 2009; Flexas *et al.*, 2004, 2006; Lawlor et Tezara, 2009).

Le manque d'eau inhibe la photosynthèse en deux étapes (Flexa *et al.*, 2006). Dans la première, la photosynthèse est principalement limitée par la diffusion du CO<sub>2</sub>. Lors de la deuxième étape, lorsque la déshydratation cellulaire devient plus sévère, l'inhibition de la phase métabolique se produit. Associée à cette déficience métabolique, une augmentation de l'activité des mécanismes antioxydants est observée (Cho *et al.*, 2008).

Lorsque la diminution de la conductance stomatique provoque des perturbations du transfert d'électrons photosynthétique, les feuilles sont soumises à un excès d'énergie lumineuse capturée qui peut dépasser son taux de transfert et/ou d'utilisation sous forme chimique par le cycle de Calvin lors de la phase métabolique (Foyer *et al.*, 2009).

Dans de telles circonstances, les mécanismes de régulation et de protection de la photosynthèse sont essentiels, de façon à limiter les dommages dans les structures photosynthétiques, par exemple par des phénomènes de photoinhibition.

Cette protection est réalisée par notamment un processus de dissipation thermique qui implique les caroténoïdes du cycle des xanthophylles (Demmig-Adams *et al.*, 2006) et du cycle de la lutéine (Garcia-Plazaola *et al.*, 2003).

Quant à l'impact de la déshydratation cellulaire sur la RubisCO, enzyme responsable de la fixation du CO<sub>2</sub>, il a été généralement constaté que son activité et sa quantité sont affectées sous déficit hydrique sévère (Parry *et al.*, 2002 ; Flexas *et al.*, 2006).

### **3. Les réponses moléculaires des plantes face aux espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées lors d'un déficit hydrique**

---

Il est actuellement bien établi que la plupart des contraintes environnementales biotiques et abiotiques induisent un stress oxydant. La capacité des plantes à contrôler l'homéostasie redox est souvent fortement corrélée avec la tolérance à ces contraintes.

La déshydratation cellulaire induit une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et augmente ainsi la charge oxydante dans les feuilles. Ceci conduit à des modifications marquées du métabolisme afin de maintenir un équilibre entre la production et la consommation de ces ERO (Foyer et Noctor 2009).

Une augmentation des niveaux en ERO induit des changements de l'état redox des molécules et peut ainsi provoquer une oxydation partielle ou sévère des composants cellulaires. Le métabolisme des ERO est d'une importance capitale en ce qui concerne le contrôle de la physiologie des plantes (Pfannschmidt *et al.*, 2009; Noctor *et al.*, 2007).

L'homéostasie rédox dépend en grande partie d'un réseau de signalisation complexe qui coordonne trois des processus métaboliques les plus importants pour la vie des plantes : la photosynthèse, la photorespiration et la respiration mitochondriale.

### 3.1. Déficit hydrique, oxygène et stress oxydant

---

Lorsque les organismes photosynthétiques ont acquis la capacité de produire l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) il y a environ 2,7 milliards d'années, ils ont sensiblement modifié l'atmosphère terrestre et les formes de vie.

La molécule d' $O_2$  est un radical libre et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont été les compagnons indésirables, mais inévitables de la vie aérobie (Blankenship *et al.*, 1998; Halliwell, 2006).

La forme stable de dioxygène est dite triplet. Sous cette forme, l'oxygène moléculaire est avide d'électrons, car il possède deux électrons non appariés qui ont le même nombre de quantum spins (spins parallèles) (Figure 2).

Cependant, en vertu des règles de restriction de spin de Wigner, et du fait de sa structure électronique, l'oxygène fondamental possède une forte inertie vis-à-vis des molécules biologiques, pour la plupart non radicalaires.

Sa réactivité est limitée aux molécules capables d'apporter un ou deux électrons non appariés, et dont le spin est antiparallèle aux siens, menant à la génération de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) du radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ), de l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ), des peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ) ou des alkoxydes ( $RO^{\cdot}$ ) par transfert d'énergie.

La réactivité des espèces chimiques qui dérivent du dioxygène est elle aussi, relative. En effet, l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont très sélectifs dans leurs réactions avec les molécules biologiques et vont préférentiellement interagir avec des protéines. Au contraire, le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) réagit avec toutes les molécules présentes à proximité (Cheeseman, 2006; Pitzschke *et al.*, 2006; Møller *et al.*, 2007).

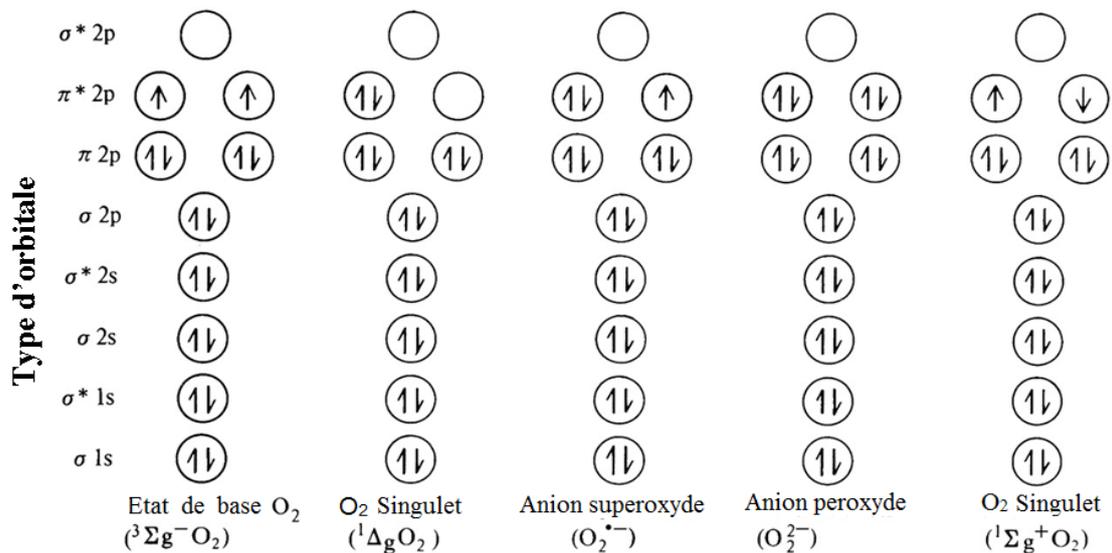


Figure 2 : Les niveaux de transfert d'énergie générant les principaux types d'espèces réactives de l'oxygène d'après Halliwell (2006).

Hautement réactives et toxiques, les ERO causent des dommages aux protéines, lipides, glucides et acides nucléiques. A une concentration élevée, elles peuvent conduire à la mort cellulaire (Apel et Hirt, 2004; Asada, 1999 ; Asada ,2006).

Au niveau cellulaire, les ERO sont également produites sans interruption à un niveau basal non toxique comme sous-produits des diverses voies métaboliques localisées dans les différents compartiments cellulaires tels que le chloroplaste, les mitochondries et les peroxysomes (Del Rio *et al.*, 2006 ; Navrot *et al.*, 2007).

Dans les cellules végétales, la plupart des ERO produites proviennent des chloroplastes ou des peroxysomes, mais dans les tissus non verts, ou à l'obscurité, la production mitochondriale d'ERO devient prédominante (King *et al.*, 2004).

Les molécules de type ERO sont éliminées par les divers mécanismes de défense antioxydants (Foyer et Noctor, 2005).

L'acclimatation des plantes aux changements dans leur environnement nécessite un nouvel état d'homéostasie rédox cellulaire réalisé par un équilibre délicat entre les multiples voies métaboliques des différents compartiments cellulaires. Un niveau élevé de coordination métabolique est donc nécessaire pour maintenir les flux d'énergie à travers les organites de la cellule dans toutes les

conditions de croissance pour éviter la production excessive des ERO et les dommages oxydants (Baxter *et al.*, 2007).

Cette coordination est cependant perturbée lors de contraintes biotique ou abiotique comme un déficit hydrique, une exposition au sel, un rayonnement UV, des métaux lourds, des températures extrêmes, une carence en nutriments, la pollution atmosphérique, des herbicides ou des attaques de pathogènes. (Mittler *et al.*, 2006).

Des déséquilibres métaboliques peuvent alors induire un stress oxydant dans les cellules en favorisant la production et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène, ce qui provoque l'oxydation des composants cellulaires, entrave les activités métaboliques et attente à l'intégrité des organelles et des cellules (Møller *et al.*, 2007; Møller & Sweetlove 2010).

Ces déséquilibres proviennent généralement de modifications dans les activités des chaînes de transfert des électrons et dans les taux d'utilisation de substrats, de réducteurs et de l'énergie disponible (Noctor, De Paepe & Foyer 2007; Foyer & Noctor 2009; Foyer *et al.*, 2009; Pfannschmidt *et al.*, 2009).

### 3.2. Génération des ERO et conséquences liées à leur accumulation

Les voies métaboliques au niveau des plantes sont sensibles aux changements des conditions environnementales. Les déséquilibres métaboliques engendrés peuvent induire un stress oxydant, ce qui provoque l'oxydation des composants cellulaires, des modifications métaboliques et des perturbations de la croissance (Mueller et Berger 2009; Møller et Sweetlove 2010).

Chaque compartiment de la cellule contient un certain nombre de systèmes destinés à limiter l'accumulation des ERO, mais en condition de stress, l'activité de ces systèmes peut être limitée du fait d'une accumulation excessive d'ERO entraînant une augmentation des dommages cellulaires (Møller *et al.*, 2007 ; Foyer et Noctor 2009).

L'oxygène singulet et le radical anion superoxyde sont des espèces réactives de l'oxygène très abondantes dans les cellules. L' $O_2^{\cdot-}$  est la principale source de toutes les autres ERO (Scandalios, 2005).

Les ERO peuvent réagir avec certaines espèces azotées pour créer des espèces activées de l'azote telles que l'oxyde nitrique radicalaire ( $NO^{\cdot}$ ) ou le peroxydinitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ). Ces espèces ont des propriétés et des effets similaires aux ERO. Cependant, il est à noter qu'en conditions optimales de

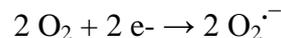
croissance, les ERO remplissent des rôles bénéfiques à un niveau basal. En effet, ces dernières années, plusieurs rôles pour les ERO ont été identifiés: le contrôle et la régulation des processus biologiques, tels que la croissance, le cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée, la signalisation, les réponses hormonales lors de stress biotiques et abiotiques et du développement (Mittler 2002 ; Foreman *et al.*, 2003).

### 3.2.1. Le superoxyde $O_2^{\cdot-}$

Chez les plantes, un des principaux sites de production d' $O_2^{\cdot-}$  se situe dans les membranes thylacoïdiennes du chloroplaste, au niveau du site primaire de l'accepteur d'électrons du photosystème I (PSI).

La fermeture des stomates lors d'un manque d'eau provoque une diminution de la concentration interne en  $CO_2$  au niveau du cycle de Calvin-Benson et un déséquilibre entre l'activité réduite de ce cycle et celle toujours élevée de la chaîne de transfert d'électrons.

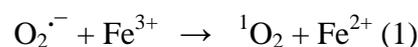
En cas de surcharge de la chaîne de transfert d'électrons (CTE), la ferrédoxine (Fd) réduit directement l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) en anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) au cours de la réaction de Mehler (1951).



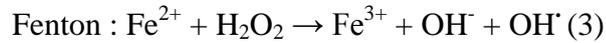
Une production de superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) est également possible au niveau du photosystème II (PSII), avec la réduction de l'oxygène moléculaire par les plastoquinones,  $Q_A$  et  $Q_B$  (Zhang *et al.*, 2003). Mais, cette source d' $O_2^{\cdot-}$  au niveau du PSII ne semble pas causer de dommages directs (Liu *et al.*, 2004).

La génération d' $O_2^{\cdot-}$  peut déclencher la formation d'ERO plus réactives comme le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) et l'oxygène singlet ( $^1O_2$ ) qui peuvent causer la peroxydation des lipides membranaires et la mort cellulaire (Halliwell, 2006).

L'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) peut également céder un électron au fer ( $Fe^{3+}$ ) pour le réduire sous la forme ( $Fe^{2+}$ ) (1).



La réaction par laquelle  $O_2^{\cdot-}$  et  $H_2O_2$  génèrent de  $l'OH^{\cdot}$  est appelée réaction de Haber-Weiss(2), tandis que celle qui implique l'oxydation de  $Fe^{2+}$  par  $H_2O_2$  est appelée réaction de Fenton (3):



### 3.2.2. L'oxygène singlet ( $^1O_2$ )

La dissipation d'énergie insuffisante du fait d'une activité photochimique réduite peut conduire à la formation de chlorophylle à l'état triplet ( $^3Chl$ ). La  $^3Chl$  à l'état triplet peut réagir avec l' $O_2$ , majoritairement sous forme triplet ( $^3O_2$ ), produisant ainsi le très réactif  $^1O_2$  (oxygène singlet).

La durée de vie de  $l'^1O_2$  dans une cellule a été mesurée à environ 1  $\mu s$  avec une distance de diffusion sur des distances de plusieurs dizaines de nanomètres, de l'ordre de 30nm (Fischer *et al.*, 2007; Møller *et al.*, 2007).

La formation d'oxygène singlet  $^1O_2$  lors de la photosynthèse peut donc être très nocive pour l'ensemble de l'appareil photosynthétique notamment au niveau des photosystèmes I et II (Figure 3).

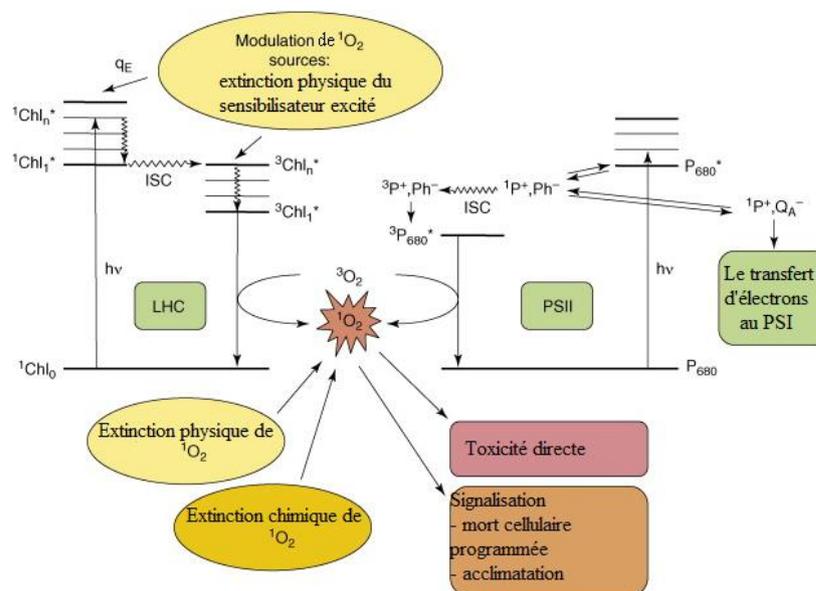


Figure 3 : La gestion de la production de  $^1O_2$  chez les plantes d'après M. Han et al. (2009).

L'oxygène singulet est un agent oxydant pour une large gamme de molécules biologiques, il peut réagir avec les protéines, les pigments, les acides nucléiques et les lipides, et il est même considéré comme l'ERO responsable de la perte de l'activité PSII (Krieger-Liszkay *et al.*, 2008).

Il a été rapporté que dans des conditions de croissance optimales, l' $^1\text{O}_2$  était responsable de plus de 80% de la peroxydation lipidique non enzymatique dans les tissus foliaires d'*Arabidopsis* (Triantaphylides *et al.*, 2008). Il s'additionne directement sur les doubles liaisons des acides gras, ce qui conduit à la formation d'hydroperoxydes, qui pourront se décomposer en radicaux libres et initier les réactions en chaîne (Dix and Aikens, 1993).

Il faut aussi noter que l' $^1\text{O}_2$  est actif dans l'induction de l'expression de gènes impliqués dans les réactions de défense moléculaire contre le stress photo-oxydant (Krieger-Liszkay *et al.*, 2008 ; Ramel *et al.*, 2012a).

### 3.2.3. Le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

La réduction univalente de l'anion superoxyde produit du peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La formation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est directement catalysée par certaines oxydases, peroxydases, ou par les chaînes de transport d'électrons photosynthétiques et respiratoires ou indirectement par réduction ou dismutation par la superoxyde dismutase (SOD) (Foyer et Noctor, 2000; Mittler *et al.*, 2004; Bindschedler *et al.*, 2006; Sagi et Fluhr, 2006). Ces réactions génèrent de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans plusieurs compartiments de la cellule (Figure 4).

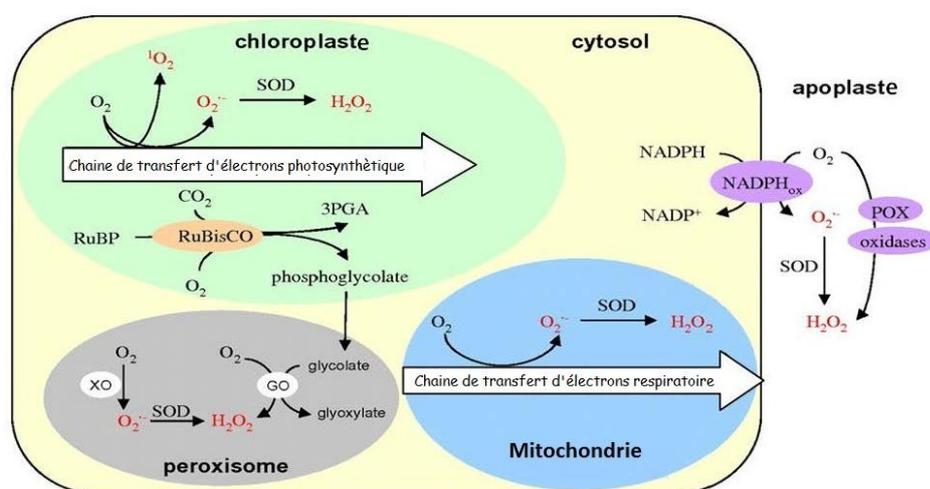


Figure 4: Les principaux sites de production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les cellules photosynthétiques selon Mhamdi *et al.* (2010).

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est modérément réactif, mais il présente une relativement longue demi-vie (1 ms) par comparaison avec les autres ERO tels que  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$  et  $HO^{\cdot}$  dont les durées de vie sont beaucoup plus courtes (Pitzschke *et al.*, 2006; Møller *et al.*, 2007).

Bien que présentant une réactivité assez limitée, l'une des caractéristiques essentielles d' $H_2O_2$  est sa réactivité spécifique avec les résidus cystéine ou méthionine des protéines (Gilbert, 1990). Il est établi que l'excès d' $H_2O_2$  dans les cellules végétales conduit à l'apparition d'un stress oxydant notamment par l'inactivation des enzymes par oxydation de leurs groupements thiols (Tewari *et al.*, 2006).

Le peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$ , joue un rôle double chez les plantes: à de faibles concentrations, il agit comme une molécule signal impliquée dans la signalisation et le déclenchement de phénomènes d'acclimatation et de tolérance lors de différentes contraintes biotiques et abiotiques. A forte concentration, il conduit à la mort cellulaire programmée (Quan *et al.*, 2008).

L'expression de nombreux gènes de stress est régulée par des voies de signalisation utilisant  $H_2O_2$  comme messenger (Møller et Sweetlove 2010). Ainsi, il a été montré que le peroxyde d'hydrogène agit comme un régulateur clé dans un large éventail de processus physiologiques tels que la sénescence (Peng *et al.*, 2005), la photorespiration et la photosynthèse (Noctor *et al.*, 1998), le mouvement stomatique (Bright *et al.*, 2006), le cycle cellulaire (Mittler *et al.*, 2004), la croissance et le développement (Foreman *et al.*, 2003).

#### 3.2.4. Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ )

Le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) est une des ERO les plus réactives. En présence de métaux de transition appropriés, en particulier le Fe, le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) peut être produit à partir de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à pH neutre et température ambiante par la réaction de Fenton (cf. 3.2.1).

Le radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ) peut potentiellement réagir avec toutes les molécules biologiques comme l'ADN, les protéines, les lipides, et presque tous les constituants des cellules. Il possède une durée de vie de l'ordre d'1 ns et peut parcourir des distances de l'ordre de 1 nm (Møller *et al.*, 2007).

En raison de l'absence de tout mécanisme enzymatique connu pour l'élimination du radical hydroxyle ( $\text{HO}^\bullet$ ), une production en excès de ce composé conduit finalement à la mort cellulaire (Vranova *et al.*, 2002).

### 3.3. Le métabolisme cellulaire et les zones de production des ERO

---

Lors de la période lumineuse dans les cellules végétales, les chloroplastes et les peroxysomes sont la principale source de production d'ERO (Foyer et Noctor 2003) du fait d'une part de la présence concomitante au sein du chloroplaste d'une chaîne de transfert photosynthétique d'électrons et d'oxygène moléculaire, et d'autre part de l'activité photorespiratoire. Dans les conditions de lumière, ces organites produisent 20 fois plus d'ERO que les mitochondries (Rhoads *et al.*, 2006).

A l'obscurité, en absence de photosynthèse, les mitochondries semblent être les principaux sites de production d'ERO (Bartoli *et al.*, 2004 ; Rhoads *et al.*, 2006).

Bien que les mitochondries ne soient pas le principal site de génération d'ERO dans les plantes, elles constituent néanmoins une cible primaire pour les dommages provoqués par les ERO (Bartoli *et al.*, 2004).

Il est à noter que dans les tissus animaux, les mitochondries constituent le site principal de production des ERO et qu'au sein de ces organites, 1 à 5% de la consommation en  $\text{O}_2$  peut être convertie en ERO (Møller. 2001).

D'autres sources importantes de production d'ERO dans les plantes sont localisées dans le cytoplasme, le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique et l'apoplaste (Gill & Tuteja, 2010).

#### 3.3.1. Au niveau du chloroplaste

Le chloroplaste est l'organite le plus sujet à des dommages oxydants en raison de la présence d'oxygène divalent, d'une chaîne de transfert d'électrons et des risques d'excitation lumineuse excessive au niveau des photosystèmes (Baier et Dietz 2005).

Dans les situations de surcharge du transfert photosynthétique d'électrons, par exemple lors de contraintes environnementales, une partie du flux d'électrons est dévié des ferrédoxines vers l' $O_2$ , le réduisant en  $O_2^{\cdot-}$  par la réaction de Mehler (Wise et Naylor 1987; Elstner, 1991).

Le côté accepteur de la chaîne de transfert d'électrons (CTE) du PSII peut également générer des électrons au niveau des plastoquinones  $Q_A$  et  $Q_B$ , qui vont être transférés vers l'oxygène pour produire de l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  (Takahashi *et al.*, 1988).

L' $^1O_2$  est un sous-produit naturel de la photosynthèse, principalement formé au niveau des antennes chlorophylliennes du PSII même sous conditions de faible lumière (Buchert et Forreiter 2010).

Par conséquent, l'ensemble des centres de production d'ERO comme la chlorophylle triplet ( $^3O_2$ ), la chaîne de transfert d'électrons (ETC), et les photosystèmes I (PSI) et photosystème II (PSII) font des chloroplastes un site majeur de production de ces espèces ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $^1O_2$  et  $H_2O_2$ ) (Figure 5).

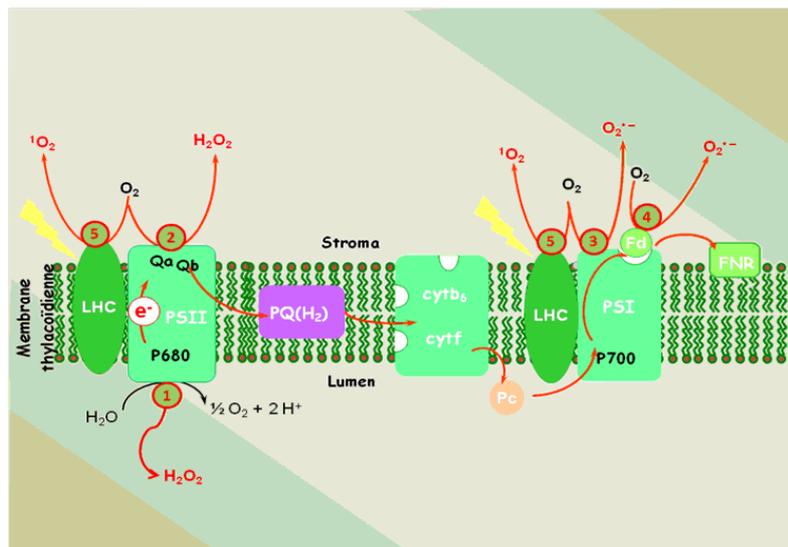


Figure 5: Sites de génération des ERO dans la chaîne photosynthétique. Les ERO sont formées au niveau du complexe de dissociation de l'eau (1), des sites accepteurs du PSII (2) et donneurs d'électrons du PSI (3), de la ferrédoxine réduite (4) et des antennes collectrices d'énergie lumineuse (5).

### 3.3.2. Au niveau de la mitochondrie

Les mitochondries sont des « usines » à énergie ; elles sont considérées comme un site important de production d'ERO en dehors des chloroplastes (Rasmusson *et al.*, 2004).

L'environnement cellulaire de la mitochondrie végétale se distingue essentiellement par la présence de chloroplastes où se déroule le métabolisme photosynthétique source d'oxygène ( $O_2$ ) et de glucides (Noctor *et al.*, 2006).

La production d'ERO dans les mitochondries se produit à un niveau basal dans des conditions de respiration normales. Cette production peut être augmentée en réponse à diverses contraintes biotiques et abiotiques. Les complexes I, II et III de la chaîne de transfert d'électrons (CTE) mitochondriale sont les sites très connus de production d' $O_2^-$  (Puntarulo *et al.*, 1988; Turrens, 1997).

L'anion superoxyde ainsi produit, peut à son tour être réduit par dismutation par la SOD en  $H_2O_2$  (Möller 2001 ; Quan, 2008).

### 3.3.3. Au niveau du peroxysome

Les peroxysomes sont de petits organites subcellulaires sphériques généralement limités par une membrane lipidique bicouche unique, capables de se reproduire par scissiparité (Johnson et Olsen 2001; Yan *et al.*, 2005).

Ils ne contiennent pas d'ADN, ni d'appareil d'expression des gènes, et sont très probablement dérivés du réticulum endoplasmique (Hoepfner *et al.*, 2005; Titorenko et Mullen 2006).

Chez les plantes, il existe plusieurs types de peroxysomes qui sont spécialisés dans certaines fonctions métaboliques. Toutefois, étant donné que les différences entre ces types de peroxysomes ne sont pas très marquées et afin d'éviter toute confusion, il est recommandé d'utiliser le terme général "peroxysomes» pour décrire tous ces types de peroxysomes spécialisés (Pracharoenwattana et Smith, 2008).

Comme les mitochondries et les chloroplastes, les peroxysomes produisent des radicaux superoxydes  $O_2^-$  comme une conséquence de leur métabolisme normal au niveau de deux sites (Del Rio *et al.*, 2003b).

Le premier site se situe dans la matrice de cet organite, où la xanthine oxydase (XOD) catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine en acide urique (Corpas *et al.*, 2001 ; Del Rio *et al.*, 2002).

Le second site se trouve dans les membranes des peroxysomes, il implique une NAD(P)H oxydase et des monodéhydroascorbate réductases MDHAR qui participent à la production d' $O_2^{\cdot-}$  (Del Rio *et al.*, 2003b).

Il existe plusieurs sources d' $H_2O_2$  dans les peroxysomes. Le principal processus métabolique responsable de cette production est la réaction photorespiratoire qui implique la glycolate oxydase. La  $\beta$ -oxydation des acides gras, la réaction enzymatique des flavines oxydases et la dismutation des radicaux superoxydes  $O_2^{\cdot-}$  conduisent également à la production d' $H_2O_2$  dans ces organites (del Rio *et al.*, 2006; Nyathi and Baker, 2006; del Rio *et al.*, 2002).

Il a été démontré que les radicaux  $NO^{\cdot}$  sont également produits dans les peroxysomes (Hu, 2007).

#### 3.3.4. Au niveau du réticulum endoplasmique

D'autres sources importantes de production d'ERO dans les cellules végétales ont reçu moins d'attention, comme par exemple le réticulum endoplasmique.

Il existe deux types de réticulum : le réticulum rugueux recouvert sur sa surface externe de ribosomes, et le réticulum lisse, qui joue un rôle important dans la synthèse des lipides et des stéroïdes, dans le métabolisme des glucides, ainsi que dans les mécanismes de détoxification. Ces derniers font intervenir de nombreux processus oxydants, la majorité de ces réactions sont catalysées par des cytochromes P450 mono-oxygénases dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique. Elles catalysent ainsi l'oxydation de nombreuses substances toxiques, telles que des pesticides, par l'introduction dans la molécule d'un atome d'oxygène (Dybing *et al.*, 1976 ; Coleman *et al.*, 1997 ; Korte *et al.*, 2000). Le complexe oxygéné ainsi formé peut être une source d'anion superoxyde.

Des conditions ou agents déstabilisant l'environnement cellulaire altèrent souvent le repliement des protéines au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Suivant son intensité, ce phénomène peut induire une agrégation irréversible des protéines et entraîner la mort des cellules (Howell, 2013).

Dans des conditions environnementales défavorables (stress salin et hautes températures), la demande pour le repliement des protéines dans le RE est supérieure à la capacité du système, ce qui

déclenche la réponse de type « protéines dépliées ». C'est un mécanisme cellulaire de défense contre cette atteinte à l'intégrité des protéines qui comporte deux voies de signalisation, la première comporte deux facteurs de transcription associés à la membrane du RE (Che *et al.*, 2010 ; Howell, 2013). La deuxième voie qui implique une double protéine kinase (Howell, 2013).

### 3.4. Rôle des ERO dans la signalisation cellulaire

Les ERO contrôlent l'expression d'un certain nombre de gènes et sont impliquées dans différentes voies de transduction des signaux. Ceci indique que les cellules ont développé des stratégies pour utiliser les ERO comme stimuli biologiques ou signaux activant et régulant différentes réponses géniques liées au développement et aux réponses aux stress (Dalton *et al.*, 1999).

Il a été suggéré que l' $^1\text{O}_2$  agit comme un signal qui active plusieurs voies de réponse aux stress comme un traitement photo-oxydant (op den Camp *et al.*, 2003 ; Ramel *et al.*, 2012b).

$\text{H}_2\text{O}_2$  a aussi été proposé comme un messenger essentiel pour les signaux générés par des ERO en raison de sa durée de vie relativement longue et de sa haute capacité de diffusion à travers les membranes (Quan *et al.*, 2008). Chez Arabidopsis, le peroxyde d'hydrogène peut moduler l'expression d'au moins 175 gènes (Desikan, 2001).

Les peroxysomes sont considérés comme des compartiments cellulaires avec la capacité de produire et de libérer des molécules de signalisation importantes telles que  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{NO}^{\cdot}$  dans le cytosol. Ils participent ainsi à un système de communication intégrant différents compartiments cellulaires (Corpas *et al.*, 2001).

### 3.5. Toxicité des ERO

#### 3.5.1. Oxydation des acides nucléiques

Bien que le génome de la plante soit très stable, l'ADN peut être endommagé en raison de son exposition à des espèces toxiques générées par des contraintes biotiques et abiotiques, qui peuvent exercer ainsi un stress génotoxique (Tuteja 2009).

Ces dommages endogènes générés à l'ADN que l'on appelle dommages spontanés à l'ADN, sont produits notamment par les ERO (Valko *et al.*, 2006).

Le radical hydroxyle  $\text{OH}^\cdot$  est le plus réactif, il peut causer des dommages à tous les composants de la molécule d'ADN, en modifiant à la fois les bases puriques et pyrimidiques et le désoxyribose.

L'oxygène singulet attaque principalement la guanine (Wiseman et Halliwell 1996; Evan *et al.*, 2004) alors que le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde semblent moins nocifs pour les acides nucléiques (Møller *et al.*, 2007).

Outre les effets génétiques (génération de mutations), les dommages causés à l'ADN résultent en divers effets physiologiques, tels que la réduction de la synthèse des protéines et la perturbation du cycle cellulaire, ce qui affecte la croissance et le développement de tout l'organisme (Britt 1999; Cooke 2003).

Un certain nombre de mécanismes permettent la réparation des lésions à l'ADN. Il s'agit notamment de la réparation directe des dommages, le remplacement des bases ou des nucléotides (Tuteja *et al.*, 2009).

### 3.5.2. Oxydation des lipides

La peroxydation des lipides est considérée comme le processus d'oxydation des macromolécules le plus dommageable connu pour tous les organismes vivants, elle est déclenchée par les lipoxygénases (LOX) ou les espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Les LOX oxydent les acides gras libres dans le cytosol ou les chloroplastes, initiant avec les hydroperoxyde lyases, plusieurs voies de production d'oxylipines. Les oxylipines sont des molécules de signalisation lipophiles dérivés de l'oxydation des acides gras polyinsaturés, elles comprennent les phytohormones, l'acide jasmonique, et un certain nombre d'autres molécules comme les acides gras hydroxy-, oxo-ou céto- (Mosblech *et al.*, 2009).

Les ERO sont d'autres acteurs essentiels dans les processus de peroxydation lipidique. L'oxygène singlet  $^1\text{O}_2$  est un facteur majeur impliqué dans l'oxydation des lipides dans les feuilles (Triantaphylides *et al.*, 2008).

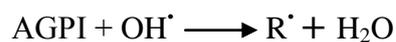
La peroxydation lipidique non-enzymatique est une réaction en chaîne entraînée par des radicaux libres, dans lequel un radical peut induire l'oxydation d'un grand nombre de molécules de lipides, principalement de phospholipides contenant des acides gras polyinsaturés (AGPI). La peroxydation

des AGPI diminue la fluidité de la membrane, augmente la perméabilité, et provoque des dommages secondaires aux protéines membranaires (voir ci-dessous) (Halliwell, 2006).

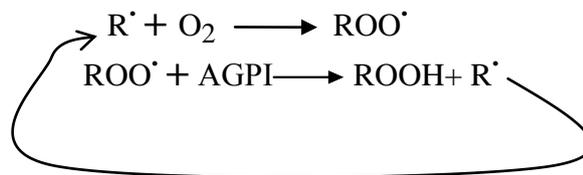
Les dommages aux membranes thylacoïdiennes sont considérés comme un des paramètres essentiels pour déterminer le niveau de destruction des lipides dans les cellules de plantes soumises à différentes contraintes environnementales. La membrane thylacoïdienne est composée principalement par des galactolipides riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) avec, majoritairement l'acide linoléique (18:2), d'acide linoléique (18:3) et d'acide hexadécatriénoïque (16:3) (Ohlrogge et Browse, 1995; Montillet et *al.*, 2004). Ces acides gras sont particulièrement sensibles à l'attaque par l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et par les radicaux hydroxyles ( $\text{HO}^\bullet$ ). Ces réactions génèrent des hydroperoxydes lipidiques (Dix and Aikens, 1993 ; Halliwell et Gutteridge, 1999).

Le processus global de la peroxydation lipidique comporte trois étapes distinctes: initiation, progression ou propagation et terminaison.

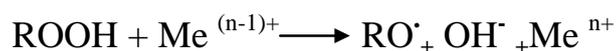
L'étape d'initiation comprend une réaction entre un acide gras polyinsaturé (AGPI) et un radical hydroxyl ( $\text{OH}^\bullet$ ). Elle conduit à une déshydrogénation de l'acide gras sur un carbone placé entre deux doubles liaisons (liaison hydrogène-carbone plus faible) formant ainsi un nouveau radical alkyle ( $\text{R}^\bullet$ ) centré sur l'atome de carbone possédant un électron libre (Barclay, 1981; Catalá, 2009).



Une fois initié, ce dernier réagit facilement avec l'oxygène moléculaire pour former le radical peroxyde ( $\text{ROO}^\bullet$ ), qui peut propager la réaction de peroxydation en chaîne en réagissant avec un atome d'hydrogène des chaînes latérales d'autres AGPI adjacents. C'est l'étape de propagation (Davies 2000).



De plus, l'hydroperoxyde ( $\text{ROOH}$ ) est relativement instable et peut, en présence d'un ion métallique ( $\text{Me}$ ), participer à la réaction de Fenton responsable de la formation du radical ( $\text{RO}^\bullet$ ) (Davies 2000 ; Fam et Morrow 2003 ; Catalá, 2006 ; Catalá, 2008).



Les hydroperoxydes instables en se décomposant vont donner de nouveaux radicaux libres et générer la formation d'aldéhydes réactifs, le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) et le malondialdéhyde (MDA), ainsi que d'acides gras hydroxylés, (Mueller, 2004).

Ces composés sont générés principalement par l'oxydation de l'acide linoléique (18:2), d'acide linoléique (18:3) et hexadécatriénoïque (16:3) (Halliwell, 2006; Montillet *et al.*, 2004; Møller *et al.*, 2007) (Figure 6).

Les acides hydroxyoctadécatriénoïques (13-HOTE), les oxylipines cycliques et le 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) sont des exemples de la large gamme de produits provenant de la peroxydation des lipides (Mueller, 2004). Ces composés peuvent être dosés et sont considérés comme des marqueurs de ce processus.

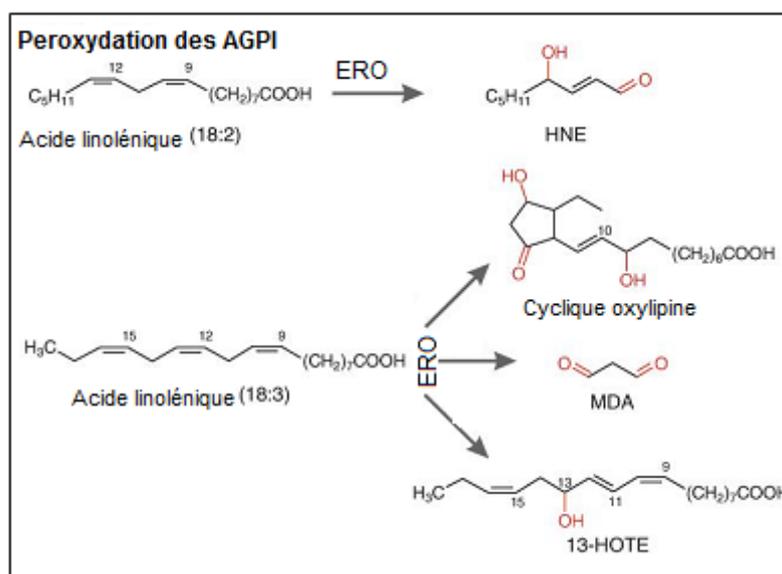


Figure 6: Les produits de la peroxydation lipidique chez les plantes d'après Møller *et al.*, (2007).

Par ailleurs, les produits de peroxydation lipidique sont des espèces électrophiles réactives (RES) qui peuvent se lier de façon covalente aux protéines et ainsi les endommager (Farmer et Davoine, 2007; Mueller et Jensen 2007; Mueller *et al.*, 2008).

La réaction de peroxydation se termine lorsque deux radicaux lipidiques (R') se rencontrent, ou lorsque le radical lipidique interagit avec un antioxydant liposoluble tel que l' $\alpha$  tocophérol.

Il a été noté que les plantes exposées à diverses contraintes abiotiques présentent une augmentation de la peroxydation lipidique en raison de la production d'ERO. Ainsi, le déficit hydrique génère une augmentation de la peroxydation lipidique dans les feuilles de plantes stressées de *Phaseolus vulgaris* (Zlatev *et al.*, 2006).

Simova-Stoilova *et al.* (2010) ont rapporté que l'affaiblissement de l'intégrité de la membrane et les dommages oxydants dans les lipides étaient plus prononcés chez les variétés sensibles que chez des variétés tolérantes dans des conditions de sécheresse chez le blé.

Le traitement par le Cd augmente aussi de façon significative l'accumulation de peroxydes lipidiques dans différentes espèces (Singh *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009).

### 3.5.3. Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines est définie comme étant la modification covalente d'une protéine induite par les ERO ou par les produits du stress oxydant. Ce type de modification dans la chaîne latérale des acides aminés conduit à des changements dans l'activité et la conformation de nombreuses protéines. La plupart des processus d'oxydation des protéines sont essentiellement irréversibles, à l'exception de ceux impliquant des acides aminés soufrés qui sont réversibles (Ghezzi 2003).

L'oxydation d'un certain nombre d'acides aminés, en particulier Arg, His, Lys, Pro, Thr et Trp, par des processus de carbonylation peut inhiber ou modifier l'activité enzymatique de ces protéines ou leur conformation et aussi augmenter les risques d'une attaque protéolytique (Møller *et al.*, 2007). La carbonylation des protéines (formation d'un groupement CO) est largement utilisée comme marqueur de l'oxydation de ces molécules (Møller *et al.*, 2007; Job *et al.*, 2005).

Les acides aminés contenant du soufre, la cystéine et la méthionine, sont les plus sensibles aux dommages oxydants en raison de leur forte réactivité avec les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

du fait de la présence d'un groupe thiol, qui peut être oxydé en formes sulfoxyde, sulfénique ou sulfonique ou pont disulfure (Davies, 2005).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut oxyder directement les protéines, par exemple, par modification des groupes thiols des cystéines en acides sulféniques (-SOH) et en inactivant le groupement fer-soufre (Fridovich 1997). La cystéine et la méthionine sont aussi assez réactives avec les espèces <sup>1</sup>O<sub>2</sub> et OH<sup>•</sup> (Figure 7). Par ailleurs, l'oxygène peut s'ajouter à un résidu méthionine pour former les dérivés sulfoxyde et sulfone de méthionine (Figure 7) (Davies, 2005).

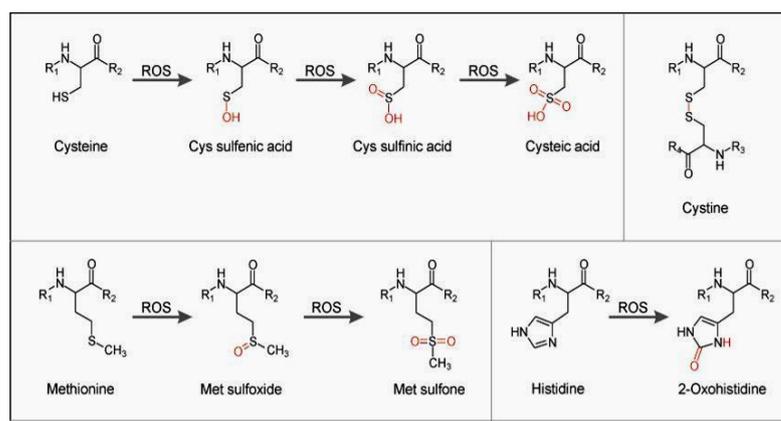


Figure 7: Les produits d'oxydation des acides aminés de type cystéine et méthionine par les ERO d'après Møller *et al.*, (2007).

#### 4. Les mécanismes de protection et de défense contre les ERO

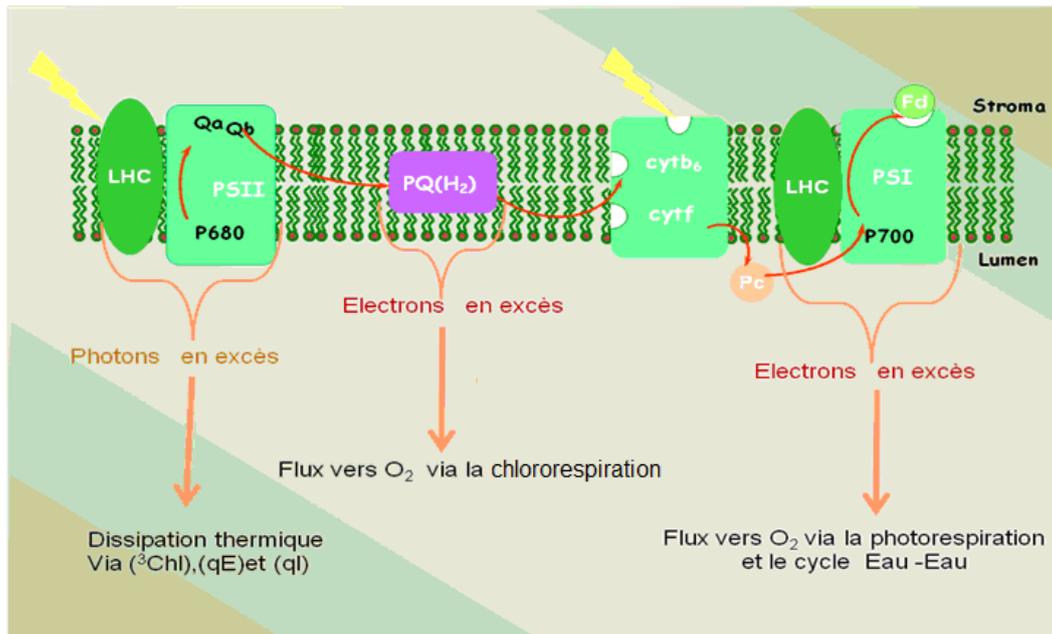
Les moyens de défense développés par les plantes pour lutter contre les ERO et leurs effets nocifs sont nombreux et distincts selon les espèces réactives produites.

Si l'extinction (ou « quenching ») de la <sup>3</sup>Chl n'intervient pas rapidement, cette espèce, qui n'est pas une espèce dangereuse en soi, peut provoquer la formation d'<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, espèce hautement réactive et dangereuse (Foyer, 1997 ; Niyogi, 2000).

##### 4.1. Evitement de production des ERO

Afin de limiter l'accumulation des ERO en période lumineuse, les plantes ont développé de nombreux mécanismes photoprotecteurs (Niyogi 1999).

Ces mécanismes sont basés sur, la réduction de l'absorption lumineuse, l'empêchement de la conversion de l'énergie absorbée en ERO, et enfin le drainage de l'excès de pouvoir réducteur généré par la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons (Figure 8).



**Figure 8: Représentation schématique des systèmes de dissipation des photons et des électrons en excès au cours de la phase lumineuse de la photosynthèse selon Niyogi (2000).**

qE et qI : extinction non photochimique de la fluorescence de la chlorophylle

#### 4.1.1. La réduction de l'absorption lumineuse par la dissipation physique

Lorsque l'apport en lumière à l'appareil photosynthétique est excessif par comparaison avec les capacités d'assimilation de la plante, celle-ci est capable de procéder à des changements morphologiques qui permettent de limiter l'absorption lumineuse. Les feuilles peuvent présenter une pilosité abondante, de nombreux trichomes, ou une inclinaison permettant de diminuer une absorption directe trop importante des rayons lumineux (Kao et Forseth 1992 ; Cornic 1994).

Les chloroplastes au sein des cellules sont également capables de se mouvoir et de se positionner dans un plan parallèle à la lumière incidente de façon à limiter l'absorption d'énergie. Ces mouvements sont dus à la présence de récepteurs membranaires de la lumière bleue, les phototropines, qui ont une activité de type protéine kinase (Kagawa *et al.*, 2001 ; Lin, 2002).

L'apport d'un excès de photons peut provoquer une accumulation d'énergie au sein des complexes ou antennes de collecte de la lumière du PSII, provoquant une augmentation de la durée de vie de la chlorophylle singulet excitée (<sup>1</sup>Chl\*). Cette espèce, responsable du transfert d'énergie initiateur du transport d'électrons photosynthétique, peut alors être spontanément transformée en chlorophylle triplet (<sup>3</sup>Chl\*).

La  $^3\text{Chl}^*$  est incapable de céder un électron à l'accepteur primaire  $\text{Q}_\text{A}$ , et sa formation correspond ainsi à une dissipation de photons absorbés. Cette forme est potentiellement très toxique puisqu'elle peut conduire à la formation d'oxygène singulet. Mais la chlorophylle singulet excitée ( $^1\text{Chl}^*$ ) peut être efficacement désexcitée par un transfert d'énergie vers les caroténoïdes, qui ont alors un rôle photoprotecteur (Niyogi, 2000).

Le processus d'extinction d'énergie ou « quenching » non photochimique dépendant du pH (qE) permet aux plantes de désactiver la  $^1\text{Chl}^*$  par émission de chaleur (Holt *et al.*, 2004). L'un des mécanismes centraux de la photoprotection est constitué par le cycle des xanthophylles, qui participe à la dissipation de l'excès d'énergie lumineuse. Ce processus est activé par l'acidité du lumen des thylakoïdes, provoquée par la saturation du transport d'électrons transmembranaire et de l'activité du complexe ATP-synthétase (Morosinotto *et al.*, 2003).

Cette acidification va alors activer la violaxanthine dé-époxydase, enzyme responsable de la conversion de la violaxanthine en anthéroxanthine et zéaxanthine dans le cadre du cycle des xanthophylles (Yamamoto *et al.*, 1999; Davison *et al.*, 2002) (Figure 9). Ces deux types de caroténoïdes sont capables de désexciter la chlorophylle singulet excitée ( $^1\text{Chl}^*$ ) et l'énergie en excès est libérée sous forme de chaleur.

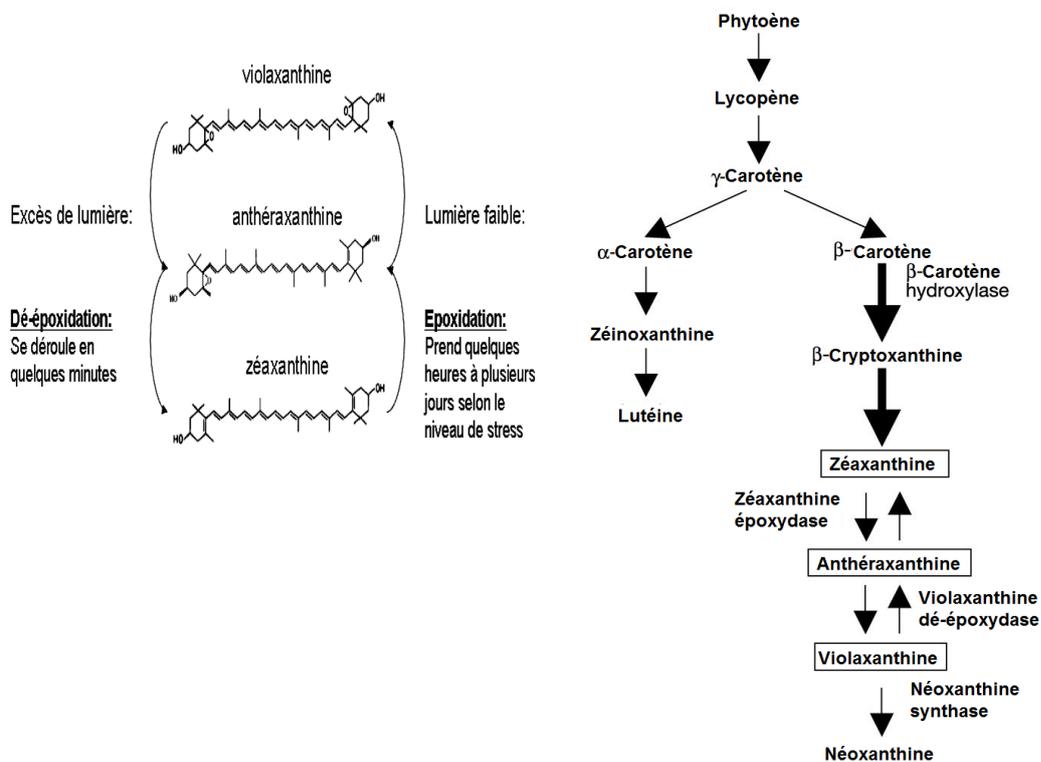


Figure 9: Cycle et voie de biosynthèse des xanthophylles chez les plantes selon Davison *et al.* (2002)

### 4.1.2. La photorespiration

La photorespiration ou activité photorespiratoire est présente uniquement dans les plantes C<sub>3</sub>. Elle est apparue initialement comme un phénomène gaspilleur d'énergie, représentant une limite potentielle sur le gain de carbone dans ce type de plantes, et par conséquent sur les rendements des cultures.

Ainsi, la photorespiration permet l'établissement d'un cycle futile très consommateur d'énergie lorsque la quantité de CO<sub>2</sub> disponible dans le chloroplaste chute.

En plus de la réaction de carboxylation du ribulose-diphosphate, la Rubisco peut en effet catalyser une réaction concurrentielle d'oxygénation de ce substrat conduisant à la formation d'une molécule de 3-phosphoglycérate et d'une molécule toxique, le 2-phosphoglycolate.

Un ensemble complexe de réactions réparties entre le chloroplaste, le peroxyosome et la mitochondrie permet la conversion du 2-phosphoglycolate en 3-phosphoglycérate en consommant deux molécules d'ATP et 2,5 molécules de NADPH. C'est également l'une des sources majeures de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le peroxyosome (Foyer *et al.*, 2009).

Chez les feuilles des plantes C<sub>3</sub>, l'oxygénation photorespiratoire du ribulose-1,5-bisphosphate par la RuBsCo (ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase/oxygénase) constitue un important échappatoire pour le surplus d'électrons (Wingler *et al.*, 2000).

Le métabolisme photorespiratoire utilise à la fois le NADPH et l'ATP pour récupérer les atomes de carbone fixés qui seraient autrement perdus. Ainsi, bien que cela puisse sembler à première vue être un processus coûteux qui est une relique de l'histoire de l'évolution de la RubisCo, la photorespiration peut aider à limiter les dommages à l'appareil photosynthétique lors de périodes d'excès d'énergie lumineuse (Osmond et Grace 1995).

### 4.1.3. La chlororespiration

Le transfert cyclique d'électrons autour du photosystème I contribue significativement au bon fonctionnement de la photosynthèse chez les plantes C<sub>3</sub>. Ce dernier peut être amélioré dans des conditions de stress (Harbinson & Foyer 1991; Golding *et al.*, 2004; Miyake *et al.*, 2005).

Selon Bennoun (1982), les chloroplastes contiennent une chaîne respiratoire qui transfère des électrons à partir du NAD(P)H vers l'O<sub>2</sub> via le pool de plastoquinones. Il existe maintenant des preuves solides qu'une voie chlororespiratoire opère dans les chloroplastes des plantes supérieures (Nixon, 2000).

Une quantité considérable de recherches a été menée pour identifier et caractériser les plastoquinone réductases et oxydases chlororespiratoires (Burrows *et al.*, 1998 ; Rich *et al.*, 1998 ; Cournac *et al.*, 2000 ; Casano *et al.*, 2000 ; Peltier et Cournac 2002 ; Rumeau *et al.*, 2007) de façon à déterminer leurs rôles physiologiques en particulier lors de contraintes environnementales.

Les réactions principales de la photosynthèse oxygénique consistent en un transfert vectoriel d'électrons à partir de l'eau au NADP<sup>+</sup> impliquant des complexes protéiques présents dans les membranes des thylakoides, à savoir le photosystème II (PSII), le complexe du cytochrome b6/f, le photosystème I (PSI) et la ferredoxin NADP<sup>+</sup> réductase. A côté de cette voie principale (Schéma en Z'), de nouveaux transporteurs d'électrons ont été identifiés dans les membranes des thylakoides des plantes supérieures. Ces composants mineurs, incluent un complexe NAD(P) H déshydrogénase plastidial et une oxydase terminale (PTOX). L'oxydase terminale Plastidiale (PTOX), ou plastoquinol oxydo réductase existe largement dans des espèces photosynthétiques comprenant les algues et les plantes supérieures (Carol et Kuntz 2001 ; Kuntz 2004). De nombreuses études ont montré que la PTOX pourrait être un cofacteur de biosynthèse des caroténoïdes et jouer un rôle important dans la biogénèse des chloroplastes (Aluru *et al.*, 2006) et l'état redox du pool des PQ (Peltier et Cournac 2002). Il a été suggéré que la PTOX agit en tant que valve de sécurité empêchant la surréduction des accepteurs d'électrons du PSII évitant ainsi des dommages potentiels du PSII (Streb *et al.*, 2005; Laureau *et al.*, 2013).

Un niveau élevé de PTOX lié à un changement des conditions environnementales, telles la température, la lumière, etc., a été détecté chez de nombreuses plantes (Rumeau *et al.*, 2007). Par conséquent, il est probable que PTOX joue un rôle physiologique dans des réponses des plantes au stress.

Chez les plantes cultivées dans des conditions normales, la PTOX ne représente que 1% du niveau du photosystème II (PSII), et n'est sensé être qu'un composant mineur des membranes des thylakoides (Lennon *et al.*, 2003). Cependant, beaucoup d'études ont montré une induction de la PTOX chez les plantes exposées à divers stress. Sous des stress environnementaux, tels que la

salinité ou les excès de métaux, la concentration en O<sub>2</sub> sub cellulaire (en particulier autour des membranes des thylakoides) serait réduite puisque la stimulation de l'expression des gènes codant pour la PTOX et l'astaxanthine empêchent la génération ROS dépendantes de l'O<sub>2</sub> (Li *et al.*, 2008, 2010).

#### 4.1.4. La respiration mitochondriale

Les mitochondries participent également à la dissipation de l'excès du pouvoir réducteur produit par les chloroplastes. Ceci a été montré par l'utilisation de mutants pour des protéines mitochondriales, qui présentent également des modifications au niveau des processus chloroplastiques (Noguchi et Yoshida, 2008).

Plusieurs études ont montré les effets bénéfiques de l'activité métabolique dans les mitochondries en conditions environnementales non favorables. Elle permet de drainer l'excès de pouvoir réducteur formé, et donc d'éviter l'accumulation d'énergie au niveau des chlorophylles (Brestic *et al.*, 1995) et de plus, fournit du CO<sub>2</sub> à la RuBisCo (Kozaki et Takeba, 1996).

Les mitochondries sont également en mesure de limiter leur production d'ERO par plusieurs mécanismes comportant des voies de dissipation d'énergie par la médiation d'une protéine appelée protéine de «découplage». Les protéines de découplage sont des protéines de transport qui sont présentes dans la membrane interne mitochondriale ; en facilitant le retour des protons dans la matrice mitochondriale, elles découplent le fonctionnement de la chaîne respiratoire par le transfert des électrons de la synthèse d'ATP. L'énergie issue de l'oxydation des substrats est alors dissipée sous forme de chaleur (Starkov, 2006).

Il a été constaté que ces systèmes de dissipation d'énergie au niveau des mitochondries de blé dur diminuent la production d'ERO dans ces organelles (Pastore *et al.*, 2007).

L'oxydase alterne ou AOX est une protéine mitochondriale insensible au cyanure. Elle transfère les électrons de l'ubiquinone à l'oxygène et génère de l'eau comme produit final. La forme fonctionnelle de l'enzyme est un homodimère dont les 2 polypeptides de 35 kDa environ peuvent être liés par une liaison covalente constituée d'un pont disulfure entre 2 cystéines (Rhoads *et al.*, 1998). La structure prédite place la protéine sur la face interne de la membrane mitochondriale interne, avec son site actif et cystéines régulatrices exposés côté matriciel.

L'AOX est une protéine inductible par le stress; son expression est augmentée suite à l'infection par un organisme pathogène (Ordog *et al.*, 2002) mais aussi par le froid (Gonzalez-Meler *et al.*, 1999). La voie de l'AOX permet aussi de limiter la formation de ERO, en empêchant une sur-réduction de la chaîne de transfert d'électrons et par voie de conséquence la formation de ERO (Millenaar *et al.*, 1998). Ceci est corroboré par le fait que l'expression de l'AOX est induite par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire et par le peroxyde d'hydrogène.

Maxwell *et al.* (1999) ont démontré l'importance de l'AOX pour limiter la formation de FAO lorsque la voie cytochrome oxydase ou COX est inhibée par l'antimycine A (inhibiteur du complexe III). La surexpression de l'AOX conduit à une diminution du niveau des ERO, tandis que la sous-expression entraîne une augmentation de 5 fois du niveau des ERO dans la cellule.

Par conséquent, les mitochondries peuvent jouer un rôle central dans l'adaptation cellulaire aux contraintes environnementales abiotiques.

---

## 4.2. Détoxification des ERO

---

Pour se protéger contre les intermédiaires oxygénés toxiques, les cellules végétales et leurs organites comme les chloroplastes, mitochondries et peroxysomes sont pourvus de systèmes de défense antioxydants. Un grand nombre de travaux de recherche ont établi que l'induction et la régulation de ces systèmes sont essentielles pour la protection contre les effets de diverses contraintes biotiques et abiotiques. Les composants du système de défenses antioxydantes sont non enzymatiques ou enzymatiques.

Les systèmes non enzymatiques antioxydants sont représentés principalement par des composés de bas poids moléculaire soit solubles comme le glutathion réduit (GSH) et l'acide ascorbique (ASC), soit lipophiles comme les caroténoïdes et les tocophérols (Mitler *et al.*, 2004 ; Chen et Dickman 2005).

Les systèmes antioxydants enzymatiques comprennent les superoxyde dismutases (SOD), les catalases (CAT), les ascorbate peroxydases (APX), les monodéhydroascorbate réductases (MDHAR), les déhydroascorbate réductases (DHAR), les glutathion réductases (GR) et les réductases à thiols.

## 4.2.1. Les systèmes antioxydants non enzymatiques de bas poids moléculaire

### 4.2.1.1. Le glutathion

Le tripeptide glutathion ( $\gamma$ Glu-Cys-Gly; GSH) est l'un des métabolites essentiels pour les plantes. Il est considéré comme un des moyens de défense les plus importants contre les ERO intracellulaires induits par des contraintes générant un stress oxydant (Figure10).

Il est produit en abondance sous forme réduite (GSH) dans les tissus végétaux. C'est l'une des principales formes de soufre organique transporté dans le phloème (Mendoza-Cózatl *et al.*, 2008).

Il se déplace entre les cellules, soit par voie apoplastique, soit par voie symplastique. Il est localisé dans tous les compartiments cellulaires tels que le cytosol, le réticulum endoplasmique, la vacuole, les mitochondries, les chloroplastes, les peroxysomes ainsi que l'apoplaste (Jimenez *et al.*, 1998).

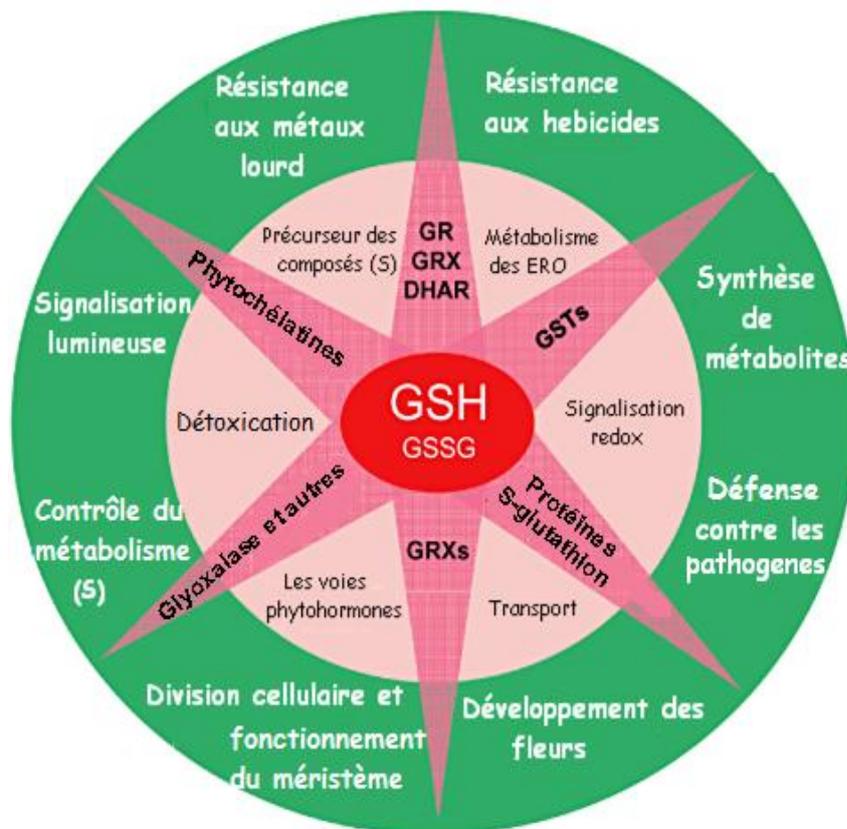


Figure 10 : Importance physiologique du glutathion d'après Noctor *et al.* (2012).

Dans les cellules du mésophile des feuilles d'*Arabidopsis*, le pool de glutathion total est différemment réparti entre les différents compartiments subcellulaires. Environ 52% de ce pool se

retrouve dans le cytosol avec une concentration de l'ordre de 3,5 mM et à 27.5% dans les plastes avec une concentration de l'ordre de 0.9 mM (Queval *et al.*, 2011).

Le glutathion joue un rôle central dans de nombreux processus physiologiques, comme la régulation du transport des sulfates, la transduction de signaux, la conjugaison des métabolites, la détoxification des xénobiotiques et l'expression de gènes en réponse au stress (Xiang *et al.*, 2001 ; Mullineaux et Rausch 2005).

La synthèse du glutathion se produit en deux étapes dépendant de l'ATP. Tout d'abord, la glutamate-cystéine ligase (GCL) catalyse la formation de  $\gamma$ -glutamylcystéine à partir de Cys et de Glu. Puis, la glutathion synthétase (GS) ajoute une Gly au  $\gamma$ -glutamylcystéine pour produire le GSH, la forme réduite du glutathion. Une fois synthétisé, le GSH constitue un substrat réducteur pour de multiples réactions métaboliques qui produiront la forme oxydée du glutathion, GSSG, qui comporte deux molécules de glutathion liées par un pont disulfure.

L'équilibre entre le GSH et GSSG est un élément central dans le maintien de l'homéostasie redox cellulaire (Foyer et Noctor 2005).

Le GSH est nécessaire pour maintenir cette homéostasie redox afin de contrecarrer les effets nocifs des ERO (Meyer 2008). Il est considéré comme un piègeur potentiel direct de  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{OH}^\cdot$  (Larson 1988 ; Noctor et Foyer 1998).

Par ailleurs, le GSH joue un rôle clé dans les systèmes de défense antioxydants en régénérant un autre antioxydant, l'ascorbate et plus précisément sa forme oxydée le déshydroascorbate (DHA), via le cycle ascorbate-glutathion (Foyer et Halliwell 1976; Queval *et al.*, 2007).

Le glutathion a une fonction dans les principales voies du métabolisme des peroxydes. Trois types distincts de peroxydases apparaissent comme les principaux candidats impliqués dans la réduction de peroxydes par oxydation du GSH. Il s'agit de l'ascorbate peroxydase (APX), certains types de peroxirédoxines (PRX) et des glutathion S-transférases (GST) (Noctor *et al.*, 2012).

L'interaction entre le glutathion et les systèmes thiorédoxines (TRX) cytosoliques a aussi été décrite. Dans certaines conditions, les modifications du potentiel redox du glutathion peuvent influencer les mécanismes qui contribuent à l'évolution du potentiel redox des TRX et donc au contrôle de l'activité biologique des cibles des TRX (Marty *et al.*, 2009),

Le GSH pourrait aussi intervenir indirectement pour limiter les effets nocifs des peroxydes de par sa capacité à transférer facilement ses électrons par glutathionylation à des résidus cystéines sous forme d'acide sulfénique. La glutathionylation des résidus cystéines par le GSH permet ainsi leur protection contre une éventuelle suroxydation ( Zaffagnini *et al.*, 2007).

Il a été rapporté que lorsque l'intensité d'un stress augmente, les concentrations de GSH généralement baissent et la proportion de la forme oxydée augmente. Ceci conduit à une détérioration du pouvoir antioxydant de ce composé (Tausz et Šircelj, 2004).

Une concentration élevée en GSH est corrélée à la capacité des plantes à résister aux différents stress oxydants (Queval *et al.*, 2011). Une augmentation de la teneur en ce composé est observée chez les plantes de chiendent *Dactylis glomerata L.* exposées au stress salin (Zagorchev *et al.*, 2012) et chez le riz face à un stress hydrique (Pyngrupe *et al.*, 2013)

La participation du glutathion dans le système de défense antioxydant fournit une base solide pour son utilisation comme marqueur de stress. Cependant, la concentration en glutathion peut varier considérablement selon les contraintes abiotiques et ceci peut influencer sur la fonction antioxydante de ce composé (Noctor *et al.*, 2012).

#### 4.2.1.2. L'ascorbate (acide ascorbique ou vitamine C)

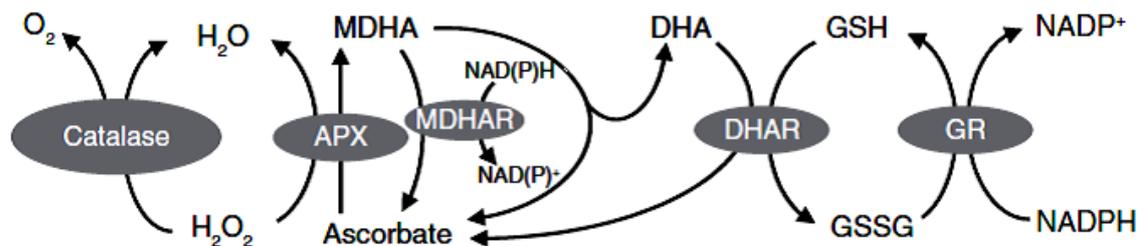
L'acide ascorbique (ou ascorbate) est une molécule de la famille des lactones. C'est un composé très abondant produit dans tous les tissus végétaux. Sa concentration est généralement plus élevée dans les cellules photosynthétiques et méristématiques (et dans les cellules de certains fruits). Elle est également plus élevée dans les feuilles matures avec des chloroplastes pleinement développés et un taux élevé de chlorophylles (Smirnoff 2000).

Dans une cellule photosynthétique, environ 30 à 40% de l'ascorbate total se situe dans le chloroplaste. Les concentrations rapportées au niveau du stroma sont de l'ordre de 50 mM (Foyer et Noctor, 2005). La majeure part du pool d'acide ascorbique reste disponible sous forme réduite (ASC) dans les feuilles et les chloroplastes en conditions physiologiques normales (Smirnoff 2000).

L'ascorbate est un puissant antioxydant soluble dans l'eau et joue un rôle essentiel pour limiter les dommages causés par les ERO dans les plantes (Smirnoff 2005 ; Athar *et al.*, 2008).

Le système contrôlant l'état redox de l'ascorbate comprend l'acide L-ascorbique (ASC), le monodéhydroascorbate (MDHA) et le déshydroascorbate (DHA). Ces deux derniers constituent les deux formes oxydées de l'ascorbate et sont relativement instables en milieu aqueux. La régénération de l'ASC par la déhydroascorbate réductase (DHAR) est extrêmement importante, car l'acide déhydroascorbique totalement oxydé a une demi-vie courte et serait perdu s'il n'était pas réduit (Foyer et Halliwell 1976 ; Wang *et al.*, 2010).

Le DHA peut être réduit chimiquement en ascorbate ASC grâce à une enzyme, la déhydroascorbate réductase (DHAR), qui tire son pouvoir réducteur du glutathion (GSH). Ce cycle est appelé cycle de l'ascorbate et du glutathion, ou encore cycle d'Halliwell-Asada-Foyer (Figure 11) (Foyer et Halliwell 1976 ; Foyer et Noctor 2008 ; Noctor *et al.*, 2011).



**Figure 11 : Les principales réactions du cycle ascorbate-glutathion (Foyer et Noctor, 2008)**

Chez les plantes, les mitochondries jouent un rôle central dans le métabolisme de l'ASC. Celles-ci synthétisent non seulement l'ASC grâce à la l-galactono- $\gamma$ -lactone déshydrogénase, mais participent aussi à la régénération de l'ASC à partir de ses formes oxydées (Szarka *et al.*, 2007).

L'acide ascorbique est considéré comme un puissant piègeur d'ERO du fait de sa capacité à donner des électrons dans un certain nombre de réactions enzymatiques, catalysées par exemple par les ascorbate peroxydases, ou non-enzymatiques. Il peut fournir ainsi une protection directe aux membranes par piégeage direct de l' $O_2^{\cdot-}$  et d' $OH^{\cdot}$  et intervenir pour régénérer l' $\alpha$ -tocophérol à partir du radical tocophéroxyl. Dans les chloroplastes, l'ASC agit comme cofacteur de la violaxantine dé-époxydase et contribue ainsi à la dissipation de l'énergie d'excitation en excès sous forme de chaleur (Smirnoff 2000).

En condition de stress oxydant (forte lumière ou déficit hydrique), on observe une augmentation considérable du contenu en ascorbate chez des semis de *Picea asperata* (Yang *et al.*, 2008).

Chez des mutants d'*Arabidopsis thaliana* ne disposant que de 30 % d'ascorbate par rapport au type sauvage (WT), une sensibilité accrue au stress salin a été observée (Huang *et al.*, 2005). Le faible contenu en ascorbate intrinsèque dans les mutants sous forte salinité entraîne une diminution spectaculaire de la teneur en forme réduite de l'ascorbate et est associée à une augmentation importante du contenu en ERO (Huang *et al.*, 2005).

#### 4.2.1.3. L'alpha-tocophérol (vitamine E)

Les tocophérols, antioxydants lipophiles constituant la vitamine E, sont considérés comme des piègeurs des ERO et des radicaux lipidiques (Hollander *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2010).

Ils sont localisés chez les plantes dans les membranes des thylacoïdes des chloroplastes (Kamal-Eldine et Appelqvist, 1996). Un niveau nettement plus élevé en  $\alpha$ -tocophérol est présent dans les feuilles de plusieurs espèces de plantes par comparaison avec le  $\gamma$ -tocophérol, avec plus de 90% de la teneur foliaire de la vitamine E sous forme d' $\alpha$ -tocophérol. Le  $\gamma$ -tocophérol est plus abondant dans les graines. Les  $\beta$ -et  $\delta$ -tocophérols sont des formes rares chez la plupart des espèces végétales (Foyer et Noctor, 2005).

Sur les quatre formes de tocophérols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) dans les plantes, l' $\alpha$ -tocophérol possède la plus forte activité antioxydante du fait de la présence de trois groupes méthyle, dans sa structure moléculaire (Kamal-Eldine et Appelqvist 1996; Foyer et Noctor, 2005)

Leurs principales fonctions antioxydantes se résument en deux actions, tout d'abord dans l'extinction (quenching) de l'oxygène singulet généré principalement par la chlorophylle triplet dans le photosystème II (Krieger-Liszkay, 2005). Il a été ainsi estimé qu'une molécule d' $\alpha$ -tocophérol peut piéger jusqu'à 120 molécules d' $^1\text{O}_2$  (Munné-Bosch, 2005).

Leur deuxième fonction consiste à piéger des radicaux nocifs par exemple, des radicaux lipide peroxydes qui résultent des réactions de peroxydation des lipides membranaires (Herrera et Barbas 2001 ; Sattler *et al.*, 2004).

Récemment, il a été constaté que le stress oxydant active la synthèse des tocophérols dans les plantes supérieures. Des niveaux élevés de ces composés sont observés pendant une période de déficit

hydrique. Ainsi, la comparaison de deux espèces de *Solanum* (*S. chilense* et *S. lycopersicum*) différant dans leur tolérance à la sécheresse a révélé que *S. chilense* présente en plus d'une conductance stomatique basse, des niveaux élevés en  $\alpha$ -tocophérol par rapport à *S. lycopersicum*, espèce sensible au déficit hydrique (Loyola *et al.*, 2012).

La surexpression du gène tocophérol cyclase (VTE1) d'*Arabidopsis* dans des plantes de tabac transgéniques a montré une diminution du niveau de peroxydation lipidique par rapport au sauvage (WT) en condition de manque d'eau (Liu *et al.*, 2008). Ce gène participe à la synthèse des tocophérols.

#### 4.2.1.4. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement répandus dans le règne végétal et sont présents généralement dans les feuilles, les pièces florales, et les graines. Ils sont également abondants dans les parties ligneuses comme les tiges et les écorces. L'analyse des flavonoïdes en fonction de leur structure permet de les classer en flavonols, flavones, isoflavones et anthocyanes (Tournaire *et al.*, 1993 ; Olsen *et al.*, 2010).

Les flavonoïdes peuvent s'accumuler dans la vacuole comme glycosides, dans des cellules à la surface des feuilles, et comme exsudats dans d'autres parties aériennes des plantes. La concentration des flavonoïdes dans ces cellules végétales est souvent supérieure à 1 mM (Vierstra *et al.*, 1982).

Les flavonoïdes sont supposés avoir de nombreuses fonctions : pigmentation des fleurs, fruits et graines, protection contre les rayons UV, défense contre les agents phytopathogènes (micro-organismes pathogènes, insectes, animaux). Ils jouent également un rôle dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (Olsen *et al.*, 2010).

Le rôle clé des flavonoïdes dans la protection contre les rayonnements UV-B a été montré en examinant des mutants d'*Arabidopsis* présentant une capacité de synthétiser les flavonoïdes réprimée (Bieza et Lois, 2001)

De nombreux gènes de biosynthèse des flavonoïdes sont induits dans des conditions de stress. En effet, il a été constaté une forte augmentation des quantités de flavonoïdes à la suite de contraintes biotiques et abiotiques, telles que les blessures, la sécheresse, une exposition à des métaux et une carence en nutriments (Winkel-Shirley 2002).

Les flavonoïdes servent de piègeurs d'ERO et peuvent neutraliser des radicaux avant qu'ils n'endommagent les structures cellulaires, ce qui est important pour les plantes dans des conditions environnementales défavorables (Løvdal *et al.*, 2010).

#### 4.2.1.5. Les caroténoïdes

Dans la nature, il existe plus de 600 caroténoïdes, pigments liposolubles présentant une activité antioxydante. Ces composés colorés jouent une multitude de fonctions dans le métabolisme des plantes, y compris dans la tolérance au stress oxydant, mais aussi dans la coloration des fleurs et des fruits (Sieferman-Harms 1987).

Ces pigments liposolubles (principalement  $\beta$ -carotènes) effectuent trois fonctions principales dans les plantes. Ils absorbent la lumière à des longueurs d'onde comprises entre 400 et 550 nm et transfèrent cette énergie à la chlorophylle. Ils sont importants pour la stabilité et l'assemblage des photosystèmes ainsi que pour la stabilisation des membranes thylacoïdiennes ce qui leur confère une fonction structurale. Enfin, ils possèdent une fonction antioxydante de protection de l'appareil photosynthétique par une activité de l'extinction (quenching) de la chlorophylle triplet ( $^3\text{Chl}$ ) et de désactivation de l' $^1\text{O}_2$ .

Cette dernière fonction au travers du cycle des xanthophylles contribue à la dissipation de l'excès d'énergie. Les caroténoïdes constituent donc une première ligne de défense contre la toxicité liée aux ERO (Collins 2001 ; Niyogi 2001 ; DellaPenna 2006 ; Triantaphylidès et Havaux, 2009 ; Ramel *et al.*, 2013 ).

La composition des xanthophylles chez les plantes est remarquablement conservée et se compose de cinq grand types, le plus abondant étant la  $\beta$ -lutéine et les quatre autres étant la violaxanthine, la néoxanthine, l'anthéroxanthine et la zéaxanthine (Demmig-Adams et Adams, 1992).

Sous forte intensité lumineuse, la violaxanthine est convertie en anthéroxanthine et en zéaxanthine par la violaxanthine dé-époxydase (Morosinotto *et al.*, 2003). La zéaxanthine est alors capable de dissiper l'excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur.

La dégradation oxydative de  $\beta$ -carotène produit un certain nombre de composés volatils à chaîne courte durant l'oxydation par l' $^1\text{O}_2$  de  $\beta$ -carotène: le  $\beta$ -cyclocitral ( $\beta$ -CC), la  $\beta$ -ionone ( $\beta$ -I), et la

dihydroactinidiolide avec également une production minoritaire et moins prononcée de  $\alpha$ -ionène. Chez des plantes *Arabidopsis* exposées à un stress lumineux, le  $\beta$ -cyclocitral est capable de réguler l'expression de certains gènes et d'induire ainsi des mécanismes de défense contre l' $^1\text{O}_2$  (Ramel *et al.*, 2012b).

## 4.2.2. Systèmes antioxydants enzymatiques

### 4.2.2.1. Superoxyde dismutase et superoxyde réductase

Les superoxyde dismutases SOD sont des métalloenzymes. Ce sont des antioxydants enzymatiques intracellulaires efficaces et présents dans tous les organismes aérobies et dans tous les compartiments subcellulaires.

Les SOD éliminent les ions  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en catalysant leur dismutation : un ion  $\text{O}_2^{\cdot-}$  est réduit en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et un autre oxydé en  $\text{O}_2$ . Ceci diminue ainsi le risque de formation du radical  $\text{OH}^{\cdot}$ .



Les SOD sont classées selon le type de leur cofacteur métallique. Il en existe trois connus: le cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD), le manganèse (Mn-SOD) et le fer (Fe-SOD). Ces isoformes sont localisées dans différents compartiments cellulaires des cellules végétales (Mittler 2002 ; Zelko *et al.*, 2002).

Les Mn-SOD se trouvent dans les mitochondries des cellules eucaryotes et dans les peroxysomes (del Rio *et al.*, 2003a). Certains isozymes de type Cu/Zn-SOD se trouvent dans les fractions cytosoliques, et aussi dans les chloroplastes des plantes supérieures (del Rio *et al.*, 2002). Chez les végétaux, les isozymes Fe-SOD sont relativement peu représentées. Elles sont habituellement associées avec le compartiment chloroplastique lorsqu'elles sont présentes (Alscher *et al.*, 2002 ; Ferreira *et al.*, 2002).

Une augmentation significative de l'activité SOD en conditions de stress salin a été observée dans diverses plantes telles que le mûrier (Harinasut *et al.*, 2003), *Lycopersicon esculentum* (Gapińska *et al.*, 2008) et *Hordeum vulgare* (Pérez-López *et al.*, 2009).

Wang et Li (2008), en étudiant l'effet du déficit hydrique sur les activités SOD totale de feuilles et SOD dans les chloroplastes de *Trifolium repens L.*, ont également rapporté une augmentation significative de l'activité SOD lors de cette contrainte environnementale.

Les SOD étaient connues comme étant les seules enzymes capables d'éliminer le radical anion superoxyde, jusqu'à la découverte en 2000 de la superoxyde réductase (SOR) (Lombard *et al.*, 2000).

La SOR est une métalloprotéine contenant un site actif à fer ferreux non-hémique (Niviere et Fontecave, 2004). Après réduction du radical anion, l'enzyme est régénérée, car elle est capable d'accepter les électrons d'une large gamme de donneurs. L'enzyme ne semble pas reconnaître de réducteur spécifique (Emerson *et al.*, 2003). Cependant, ces réactions de dismutation ou de réduction de l' $O_2^{\cdot-}$  conduisent à la formation de peroxyde d'hydrogène (Figure 12).

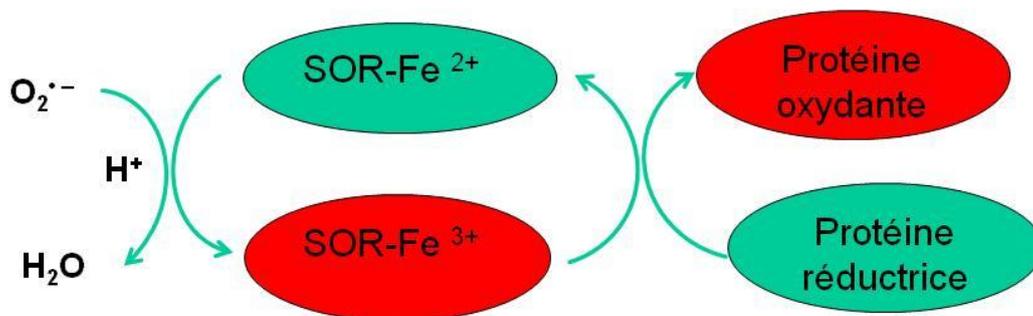


Figure 12: Cycle catalytique de la superoxyde réductase d'après Niviere et Fontecave (2004).

Le peroxyde d'hydrogène formé est à une certaine concentration toxique et peut conduire à la formation de radicaux  $HO^{\cdot}$ . Les catalases interviennent alors pour dégrader le peroxyde d'hydrogène.

#### 4.2.2.2. Catalase et enzymes du cycle ascorbate-glutathion

Les catalases sont des protéines hémiques présentes dans tous les organismes. Chez les végétaux, elles sont localisées dans le peroxysome. Ce sont des enzymes indispensables pour la détoxification des ERO dans le métabolisme cellulaire basal du fait de l'activité photorespiratoire et également en conditions de stress (Garg et Manchanda, 2009). Elles possèdent une très forte affinité pour  $H_2O_2$  qu'elles dismutent en  $H_2O$  et  $O_2$  et permettent de limiter sa diffusion dans la cellule (Scandalios, 2005).

La catalase est l'une des enzymes les plus efficaces du monde vivant. La réaction de décomposition d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est effectuée avec une proportion d'environ une molécule de CAT pour convertir  $\approx 6$  millions de molécules de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$  par minute.

En fonction de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la catalase présente une double activité. À faible concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  (inférieure à  $1 \mu\text{M}$ ), elle agit comme une peroxydase, qui fait intervenir des cofacteurs donneurs d'électrons selon la réaction  $\text{RH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{R} + 2\text{H}_2\text{O}$ .

À forte concentration en peroxyde d'hydrogène, l'activité catalytique de l'enzyme s'effectue avec  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui intervient à la fois comme donneur et accepteur d'électrons (Scandalios, 2005).

Les CAT ont été largement étudiées chez les plantes supérieures où on a trouvé deux isoenzymes chez *Hordeum vulgare* (Azevedo *et al.*, 1998), quatre dans les cotylédons d'*Helianthus annuus* (Azpilicueta *et al.*, 2007) et pas moins de douze chez *Brassica* (Frugoli *et al.*, 1996).

Une augmentation de l'activité CAT a été détectée dans le blé en période de sécheresse, cette augmentation étant en particulier plus marquée chez des variétés sensibles (Simova-Stoilova *et al.*, 2010). Dans une autre étude, il a été rapporté une diminution de l'activité CAT dans les plants de riz lors d'une déshydratation cellulaire résultant d'une sécheresse (Sharma et Dubey 2004).

Les ascorbate-péroxydases (APX) sont connues pour jouer un rôle essentiel dans l'élimination des ERO et la protection des cellules des plantes supérieures, des algues et d'autres organismes. Chez les plantes, elles sont localisées dans les différents compartiments subcellulaires et ne peuvent fonctionner qu'avec un cofacteur très spécifique, l'ascorbate.

La famille des APX est constituée d'au moins cinq isoformes distinctes présentes sous forme thylacoïdienne (tapX), glyoxysomales membranaires (gmAPX) et solubles (gsAPX), au niveau du stroma des chloroplastes (sAPX) et du cytosol (cAPX) (Noctor et Foyer, 1998).

L'APX est impliquée dans la dégradation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le cycle eau-eau et le cycle de l'ascorbate-glutathion. Elle réduit  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$ , en produisant également des radicaux monodéhydroascorbate (MDHA) à partir de l'ascorbate (Hossain *et al.*, 2006).

Bien que le cycle ascorbate-glutathion ait été plus particulièrement étudié dans les chloroplastes, il est également présent dans le cytoplasme (Nakano et Asada, 1981), les peroxysomes et les mitochondries (Jimenez *et al.*, 1997).

Du fait de sa grande affinité pour  $H_2O_2$ , l'APX peut jouer un rôle important dans la gestion des ERO au cours du stress. Une augmentation significative de l'activité APX a été ainsi notée sous contrainte hydrique chez des plantes de *Phaseolus vulgaris* (Zlatev *et al.*, 2006) et *Picea. asperata* (Yang *et al.*, 2008).

Selon Sharma et Dubey (2004), un déficit hydrique modéré appliqué sur des plantes de riz augmente l'activité de l'APX chloroplastique par rapport à celle de plants témoins, mais cette activité a tendance à diminuer lorsque le manque d'eau s'accroît.

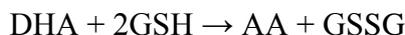
L'oxydation de l'ascorbate catalysée par l'ascorbate peroxydase produit du monodéhydroascorbate (MDHA) (Miyake et Asada, 1992). Les radicaux monodéhydroascorbate produits de façon enzymatique par l'ascorbate peroxydase ou l'ascorbate oxydase, ou par des réactions non-enzymatiques (autooxydation), peuvent causer l'inactivation, voire la destruction des composants des chloroplastes. Ces molécules radicalaires doivent donc être rapidement éliminées afin d'éviter tout effet toxique (Asada, 2006).

La monodéhydroascorbate réductase, la déshydroascorbate réductase et la glutathion réductase sont trois enzymes qui jouent un rôle essentiel dans la régénération de l'ascorbate réduit (Noctor *et al.*, 2012).

La monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) est un dinucléotide flavine adénine (FAD), enzyme qui présente des isoformes chloroplastiques et cytosoliques. La MDHAR réduit les radicaux monodéhydroascorbate (MDHA) en utilisant le NAD(P)H comme donneur d'électrons pour réduire enzymatiquement le MDHA en ascorbate (Hossain *et al.*, 1984). Chez les plantes, la MDHAR est présente dans le cytosol (Dalton *et al.*, 1993), les chloroplastes (Hossain *et al.*, 1984), les mitochondries (Jimenez *et al.*, 1997), les peroxysomes (Jimenez *et al.*, 1997) et les glyoxisomes (Bowditch et Donaldson, 1990).

Le monodéhydroascorbate (MDHA) possède deux voies de régénération, via la monodéhydroascorbate réductase ou via la déshydroascorbate réductase (DHAR) et le glutathion.

La DHAR participe avec le glutathion aux processus de régénération de l'acide ascorbique ou ascorbate à partir de sa forme oxydée et régule l'état redox cellulaire de ce composé (Chen et Gallie 2005).



Cette enzyme est inhibée par les radicaux thiols, alors que  $\text{H}_2\text{O}_2$  (<0,1 mM) et les radicaux superoxydes sont sans effet sur l'activité de cette enzyme (Hossain et Asada, 1984).

Il a été noté que la surexpression de DHAR dans le tabac protège les plantes contre la toxicité de l'ozone (Chen et Gallie, 2005). La surexpression de DHAR augmente également la tolérance à la salinité chez *Arabidopsis* (Ushimaru *et al.*, 2006), au déficit hydrique et à une exposition à l'ozone chez le tabac (Eltayeb *et al.*, 2006).

La glutathion réductase catalyse enfin la réduction du glutathion oxydé, du fait de la réduction de l'ascorbate, en utilisant spécifiquement le NADPH (Halliwell et Foyer, 1978). Dans le cycle ascorbate-glutathion, l'activité de la GR n'est qu'un maillon de la chaîne de réaction, mais constitue, selon Tanaka *et al.*, (1985), une étape limitante dans la réduction du GSSG (glutathion oxydé) par le NADPH.

Il est donc possible que l'activité de la GR détermine, dans une certaine mesure, la tolérance des plantes aux stress oxydants (Tanaka *et al.*, 1988). Cette hypothèse est appuyée par les résultats de Tanaka *et al.*, (1990), qui ont observé chez le tabac une tolérance plus élevée à l'ozone chez les cultivars ayant une plus forte activité de la GR.

#### 4.2.2.3. Les glutathion S-transférases

Les glutathion-transférases, GST, des plantes connues sous le terme glutathion S-transférases sont un groupe vaste et diversifié d'enzymes qui catalysent la conjugaison des substrats électrophiles xénobiotiques avec le glutathion tripeptide (GSH;  $\gamma$ -Glu-Cys-Gly). Chez les plantes, l'activité de la plupart des GSTs dépend du site actif qui comporte une sérine stabilisant l'anion thiolate  $\text{S}^-$  (Dixon & Edwards 2010).

Les GSTs chez les plantes sont connues pour leur rôle dans la détoxification des herbicides, l'homéostasie hormonale, la séquestration vacuolaire des anthocyanes, le métabolisme de la tyrosine,

la détoxification des hydroxyperoxydes, la régulation de l'apoptose et la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques (Thatcher *et al.*, 2007 ; Dixon *et al.*, 2010).

Les familles géniques des GSTs chez les plantes sont remarquables et très diversifiées du point de vue structure/fonction, avec 25 membres recensés chez le soja, 42 pour le maïs et 54 chez *Arabidopsis* (Dixon *et al.*, 2002 ; Sappl *et al.*, 2004).

Ce sont généralement des protéines cytoplasmiques, mais des isoformes microsomales, plastidiales, nucléaires et apoplastiques ont également été décrites (Frova 2003).

Les GSTs sont capables d'éliminer les composés cytotoxiques ou génotoxiques, qui peuvent réagir ou endommager l'ADN, l'ARN et les protéines. En effet, les GST peuvent réduire les peroxydes avec l'aide de glutathion et piéger des composés cytotoxiques et génotoxiques (Noctor *et al.*, 2002). Certaines GSTs sont induites par l'acide jasmonique (Yan *et al.*, 2007).

#### 4.2.2.4. Les thiorédoxines (TRX) et glutarédoxines (GRX)

Les thiorédoxines (TRX) sont de petites protéines ubiquitaires et conservées dans tous les organismes vivants d'environ 12 à 14 kDa qui possèdent une activité d'oxydoréductase de pont disulfure sur des protéines cibles.

Elles présentent une structure tridimensionnelle caractéristique appelée « repliement thiorédoxine », consistant en un noyau central formé de cinq feuillets  $\beta$  entouré de quatre hélices  $\alpha$  (Figure 13).

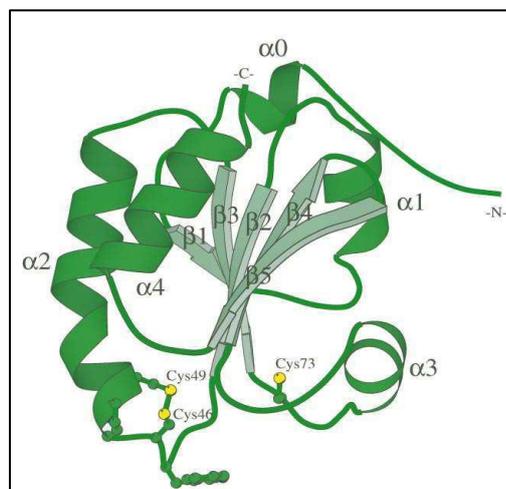


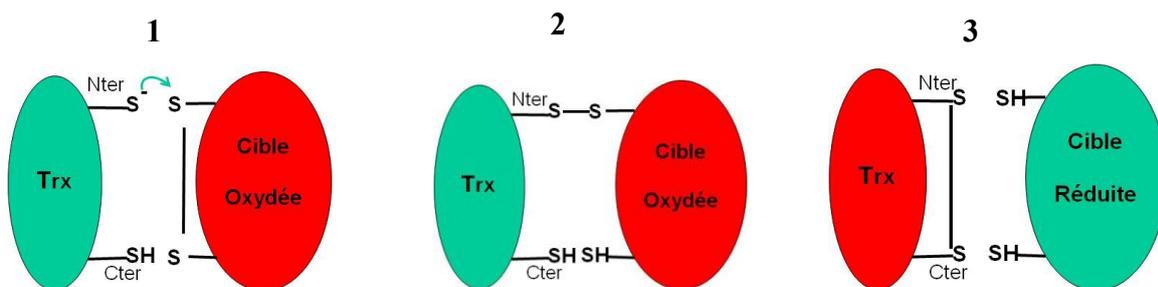
Figure 13: Structure tridimensionnelle de la thiorédoxine d'épinard d'après Capitani *et al.* (2000).

Les Trx possèdent deux cystéines réactives dans un site actif, généralement WCGPC. Ce site dithiol est exposé de façon à favoriser l'interaction avec les substrats. Cette séquence a été conservée au cours de l'évolution pour toutes les isoformes de TRX. Elle est considérée comme la signature des TRX (Capitani *et al.*, 2000).

La première thiorédoxine (TRX) a initialement été identifiée chez la bactérie *Escherichia coli* comme étant l'enzyme responsable de la réduction de la ribonucléotide réductase (Laurent *et al.*, 1964). Depuis, la présence de ces protéines a été mise en évidence chez tous les organismes vivants (Holmgren, 1989).

Les TRX sont capables de réduire, par une réaction séquentielle, les ponts disulfures de protéines dites « cibles ». Le mécanisme de réduction des ponts disulfures par les Trx consiste en un échange dithiol/disulfure (Brandes *et al.*, 1993). La première cystéine en N-terminal de ce site actif est responsable de l'attaque nucléophile primaire du pont disulfure de la cible. Un pont disulfure intermoléculaire transitoire est formé entre la TRX et sa cible (Figure 14, 1).

Le complexe est ensuite dissocié grâce à l'attaque du disulfure mixte par la deuxième cystéine du site actif (Figure 14, 2). Suite à cette réaction, la cible est réduite et la TRX est oxydée (Figure 14, 3).



**Figure 14: Mécanisme catalytique des thiorédoxines. Nter et Cter désignent respectivement les Cys situées en N-terminal et C-terminal du site actif (Meyer *et al.*, 1999).**

Ce mécanisme réactionnel a été établi par mutagenèse dirigée. En effet, le remplacement de la première cystéine par une sérine entraîne la perte de l'activité de l'enzyme (Brandes *et al.*, 1993; Holmgren 1995) alors que la mutation de la seconde cystéine bloque le mécanisme et conduit à la

formation d'un hétérodimère stable entre la Trx et sa cible (Balmer et Schürmann 2001 ; Wynn *et al.*, 1995).

Deux fonctions liées à l'activité oxydoréductase de ces protéines ont été mises en évidence. La première consiste à servir de substrat de réduction pour des peroxydases à thiols et des méthionine sulfoxyde réductases et de leur fournir ainsi du pouvoir réducteur. L'autre fonction des TRX est de réguler l'activité enzymatique de leurs cibles par modification rédox post-traductionnelle de leur conformation. Chez les organismes photosynthétiques, les TRX ont été initialement identifiées comme des activateurs à la lumière d'enzymes du cycle de Calvin, comme par exemple la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), ou d'autres voies métaboliques comme la malate déshydrogénase (MDH) (Buchanan et Wolosiuk, 1976; Issakidis *et al.*, 1996 ; Jacquot *et al.*, 1997).

Chez les végétaux, les TRX sont codées par le génome nucléaire et peuvent être regroupées en 10 types selon leur homologie de séquence et la structure des gènes qui les codent. Elles sont présentes dans tous les compartiments cellulaires des végétaux. Près de la moitié d'entre elles sont situés dans le plaste (Meyer *et al.*, 2008).

Deux isoformes sont localisées dans les mitochondries (TRX du type o et h), 10 dans le cytosol (7 isoformes de type h, 1 de type o, 1e type Clot, 1 de type TDX) et 11 dans les plastes (4 de type m, 2 de type f, 2 de type y, 1 de type x, 1 de type CDSP32 et 1 de type HCF164) (Figure 15).

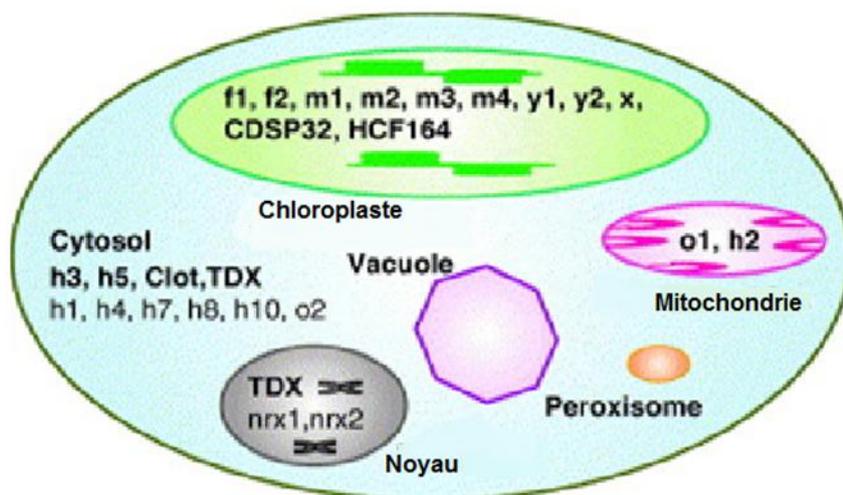


Figure 15: Localisation subcellulaire des principales thiorédoxines végétales (Vieira Dos Santos et Rey, 2006).

La présence d'une multitude d'isoformes de TRX chez les végétaux supérieurs soulève la question d'une spécialisation ou d'une redondance fonctionnelle pour cette famille de protéines. En effet chez les autres organismes (bactéries, levure, cellules animales), il n'y a en général que 2 ou 3 isoformes de thiorédoxines qui remplissent plusieurs fonctions.

Chez les organismes photosynthétiques après la réduction d'une cible, la TRX oxydée nécessite d'être régénérée grâce au pouvoir réducteur fourni par le système de réduction des TRX présent chez les cyanobactéries et les chloroplastes des végétaux, il s'agit du système ferrédoxine thiorédoxine (Fd/TRX) (Schürmann, 2003 ; Schürmann et Buchanan, 2008).

Il utilise comme source de pouvoir réducteur les électrons de la chaîne de transfert photosynthétique qui est transmis du photosystème I (PSI) à la ferrédoxine. Cette dernière transmet le pouvoir réducteur aux TRX grâce à la ferrédoxine thiorédoxine réductase (FTR)

Les glutarédoxines (GRXs) sont des oxydoréductases similaires aux TRXs, avec des sites actifs de types Cys-xxx-xxx-Cys ou Cys-xxx-xxx-Ser généralement réduits par le glutathion.

Les GRXs de plantes sont également codées par des familles multigéniques, avec au moins 6 GRXs localisés dans les plastes (Rouhier *et al.*, 2006). De nombreux partenaires des Trx également interagissent avec les GRXs (Vieira Dos Santos et Rey, 2006).

Les GRXs sont subdivisés en trois classes qui peuvent être distinguées sur la base de motifs d'acides aminés dans le site actif (Lemaire, 2004; Rouhier 2010).

La plupart des GRXs de classe I ont un site actif comme les TRX-composés de deux cystéines séparées par deux acides aminés intermédiaires. Ils peuvent régénérer des peroxyrédoxines (Prx) et des méthionine sulfoxide réductases (MSR) (Zaffagnini *et al.*, 2007; Tarrago *et al.*, 2009).

Les GRXs de classe II n'ont qu'une seule cystéine dans le site actif, cette dernière peut former un pont disulfure avec une autre cystéine située dans la même protéine ou sur une autre GRX du même type (Gao *et al.*, 2010).

La troisième classe de GRX contient deux cystéines adjacentes dans leur site actif et forment la plus grande classe chez les plantes terrestres (Li *et al.*, 2009).

#### 4.2.2.5. Les cibles des thiorédoxines végétales impliquées dans la protection contre le stress oxydant

##### A. Les peroxydases à thiol

Deux classes majeures de peroxydases à thiol sont connues : les peroxyrédoxines (Prx) (Poole, 1996) et les glutathion peroxydases (Gpx) (Ursini *et al.*, 1995).

L'activité de ces enzymes repose sur la présence d'une cystéine réactive capable de réaliser une attaque nucléophile sur une fonction peroxyde. Cette réaction entraîne la libération d'une molécule d'alcool ou d' $H_2O$ , et la Cys catalytique est oxydée en acide sulfénique (Cys-SOH). Cet acide sulfénique peut réagir ensuite avec une autre fonction thiol pour former un pont disulfure inter- ou intra-moléculaire, et libérer une molécule d'eau (Poole *et al.*, 2004).

##### ➤ Les peroxyrédoxines

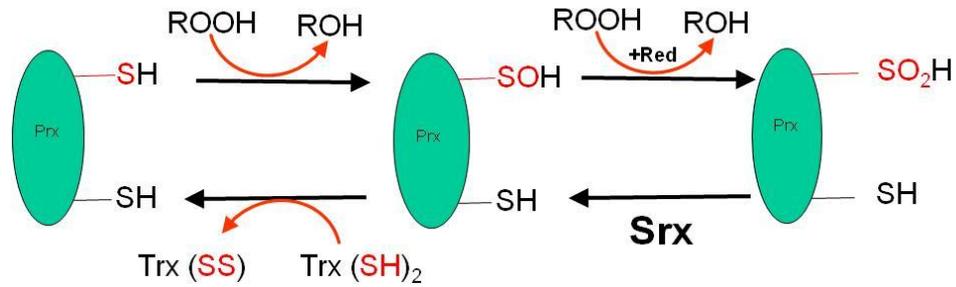
Les peroxyrédoxines (Prx) forment une famille de peroxydases non hémiques, d'environ 20 kDa, avec généralement 2 Cys catalytiques. Elles sont présentes dans tous les règnes du vivant et constituent des éléments centraux du système de défenses antioxydantes chez les plantes..

Elles présentent la capacité de réduire  $H_2O_2$ , et les peroxydes organiques respectivement en eau et alcools correspondants (Hofmann *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2003; Dietz 2011).

Dans certaines conditions (concentrations élevées en ERO ou en hydroperoxydes lipidiques), une suroxydation de la forme cystéine sulfénique peut se produire et donner lieu à la formation d'acide sulfonique, puis d'acide sulfonique.

La forme acide sulfonique a été mise en évidence sur la Prx Tsa1 de levure et est très probablement irréversible, puisque conservée dans les cellules au cours des générations (Lim *et al.*, 2008).

A l'inverse, la réduction de la forme cystéine acide sulfonique en cystéine acide sulfénique est catalysée par la sulfirédoxine (Srx) (Figure16 ).



**Figure 16 : Oxydation et suroxydation des Prx : ROOH et ROH peroxyde lipidique et alcool correspondant, Trx(SS) et Trx(SH)<sub>2</sub> thiorédoxine respectivement oxydée et réduite, Red (réducteur), Srx (sulfirédoxine).**

Des études *in vivo* ont montré que dans des levures de type sauvage, les 2-Cys Prx suroxydées après exposition des cellules à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  peuvent être régénérées, alors que des levures n'exprimant plus le gène Srx ne montrent plus de réduction des Prx suroxydées (Biteau *et al.*, 2003). La sulfirédoxine (Srx) a été aussi caractérisée chez *Arabidopsis thaliana*. Elle semble participer aux mécanismes de réponses à un traitement photooxydant (forte lumière combinée à basse température) puisqu'un mutant d'*Arabidopsis* déficient en Srx présente une tolérance plus marquée au stress oxydant généré par ce traitement (Rey *et al.*, 2007).

Selon la nomenclature couramment utilisée, les Prx sont divisées en fonction du nombre de cystéines catalytiques et leur mode de fonctionnement (monomérique ou dimérique). On dénombre quatre grands types de Prx : un type à une cystéine (1-Cys Prx) et trois types à deux cystéines (2-Cys Prx, peroxyrédoxine Q (PrxQ), peroxyrédoxine II (PrxII)) (Dietz, 2003 ; Noguera-Mazon *et al.*, 2006). Les PrxQ et PrxII sont appelés aussi 2-Cys Prx atypiques (Hofmann 2002 ; Dietz *et al.*, 2006 ; Dietz 2011). Elles fonctionnent sous forme monomériques au contraire des 2-Cys Prx qui sont actives sous forme de dimère.

La famille des peroxyrédoxines de type II (Prx) peut être divisée en six groupes distincts nommés A, B, C, D, E, et F, sur la base de leurs séquences et des positions des résidus cystéinyles conservés (Hofmann 2002 ; Noguera *et al.*, 2006). Le groupe E comprend des peroxydases homologues à celles présentes chez les bactéries et le groupe F d'autres formes dont des homologues sont décrits dans les archées. Les Prx des groupes A à D sont communes et conservées chez les plantes supérieures. Le génome d'*A. thaliana* comporte des gènes codant pour chacun de ces six groupes de Prx (Horling *et al.*, 2003). Ces 4 grands types de Prx sont répartis dans les différents compartiments subcellulaires (Figure 17).

Dans des lignées mutantes modifiées pour l'expression du gène *2-Cys Prx* et présentant une diminution du niveau en protéine, la photosynthèse est altérée ce qui démontre le rôle de la 2-Cys Prx dans la protection des dommages oxydants (Baier et Dietz, 1999)

Une lignée mutante (knock-out) sans 2-Cys Prx d'*Arabidopsis* présente plus de sensibilité au stress oxydant que les plantes de type sauvage (Iglesias-Baena *et al.*, 2010).

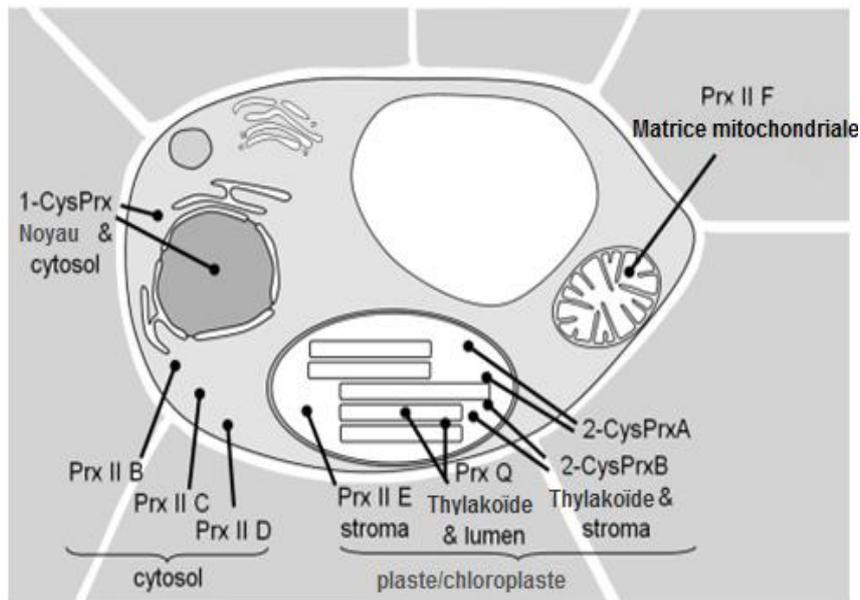


Figure 17 : Localisation subcellulaire des Prxs chez *A. thaliana*. (Dietz, 2011).

### ➤ Glutathion-péroxydases

Les glutathion-péroxydases (GPX) sont des enzymes-clés des mécanismes de détoxification chez les plantes. C'est une grande famille d'isozymes différents qui utilisent les Trx pour réduire  $H_2O_2$ , les hydroperoxydes et peroxydes lipidiques. Elle participe ainsi à l'homéostasie rédox dans les cellules végétales (Navrot *et al.*, 2006). Initialement, elles avaient été décrites comme utilisant le glutathion comme réducteur, mais différentes études ont révélé que les GPX étaient plus efficacement réduites par les Trx (Navrot *et al.*, 2006).

Chez *Arabidopsis thaliana*, la famille des GPX comprend sept membres, que l'on retrouve dans le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries, les peroxysomes et l'apoplaste (Milla *et al.*, 2003).

Chez les plantes, les GPX paraissent avoir une activité enzymatique assez faible, qui est expliquée par la présence d'une cystéine au niveau de leur site catalytique, et non d'une sélénocystéine comme chez les animaux (Faltin *et al.*, 1998; Herbette *et al.*, 2002; Jung *et al.*, 2002).

Même si les fonctions des GPX restent encore assez peu connues, ces enzymes sont notamment impliquées dans l'homéostasie d' $H_2O_2$ , la synthèse de la lignine, la dégradation de l'acide indole-3-acétique, et la résistance aux pathogènes (Asada, 1992).

Les gènes *GPX* sont régulés par des stress abiotiques au travers de diverses voies de signalisation (Milla *et al.*, 2003). Des études ont montré que les niveaux d'ARNm des GPX augmentent dans les tissus de plantes soumises à une forte salinité (Sreenivasulu *et al.*, 2004), exposées à des métaux lourds (Li *et al.*, 2000) ou à un traitement oxydant (Avsian-Kretchmer 2004).

### B. Les méthionines sulfoxyde réductases (MSR)

La méthionine oxydée sous forme sulfoxyde est réduite en méthionine par une enzyme nommée méthionine sulfoxyde réductase (MSR) par l'intermédiaire de cystéines catalytiques rédox-actives (Davies, 2005).

Les MSR sont les principales enzymes responsables de la régénération de la méthionine (Met) à partir de sa forme sulfoxyde (MetO) qu'elle soit libre ou liée dans les protéines (Tarrago *et al.*, 2009).

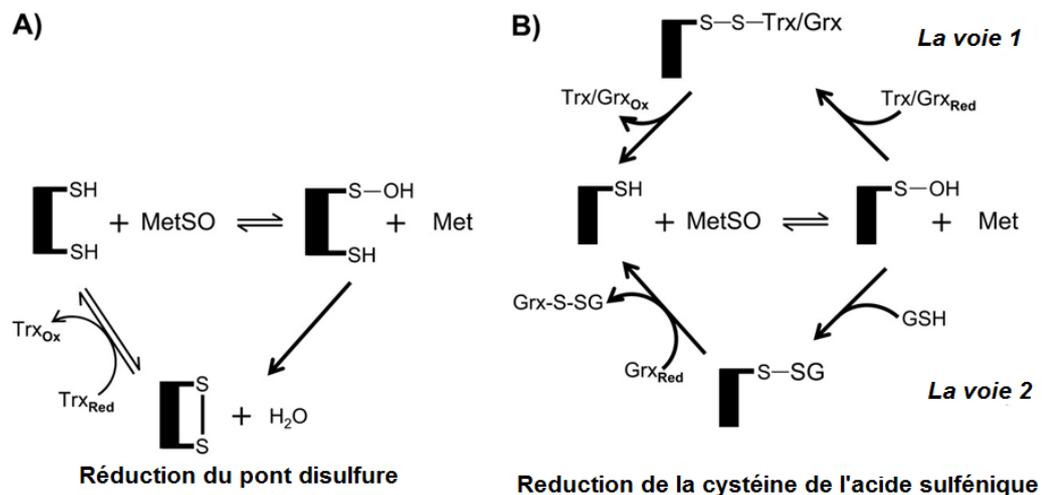
La plupart des organismes possèdent deux types de MSR, A et B, qui affichent une spécificité absolue pour les deux diastéréoisomères respectivement *S* et *R* de MetO.

Il est à noter que les MSRA et les MSRB ne présentent aucune similarité de séquence, bien qu'elles possèdent le même type d'activité biochimique (Tarrago *et al.*, 2009). Mais, une conformité de la symétrie structurale est observée entre le site actif des MSRBs et celui des MSRA (Lowther *et al.*, 2002 ; Zhang et Weissbach 2008).

Ces différences dans la stéréo-spécificité revêtent une importance particulière *in vivo*, car elles permettent la réduction complète en méthionine des formes Met-(*R*, *S*)O produites probablement de façon racémique dans les cellules des organismes vivants (Zhang et Weissbach 2008).

Les mécanismes catalytiques des MSR impliquent une à trois cystéines. La réduction de MetO se décompose en l'attaque de la cystéine catalytique sur le soufre de la MetO, la libération de la méthionine et la formation d'acide sulfénique.

La plupart des MSRA et MSRB possèdent deux cystéines redox-actives et fonctionnent généralement en suivant un mécanisme catalytique comportant trois étapes qui impliquent tout d'abord la formation d'un intermédiaire acide cystéine sulfénique, la formation ultérieure d'une liaison disulfure et enfin la régénération des MSRs par un système de réduction, généralement de type thiorédoxine (Trx) (Boschi-Muller *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2002; Rouhier *et al.*, 2007 ; Tarrago *et al.*, 2009 ) (Figure 18A).



**Figure 18: Mécanismes catalytiques des MSRs à deux cystéines rédox-actives (A) et à une cystéine rédox-active d'après Tarrago *et al.* (2009).**

(A) Dans le cas des MSRA ou des 2-Cys MSRB possédant deux cystéines rédox-actives, un pont disulfure est formé, qui est ensuite réduit par une TRX. Pour les MSRA possédant une troisième cystéine redox, un deuxième pont disulfure est formé entre les deux cystéines, qui est ensuite réduit par un agent réducteur de type TRX.

(B) Dans le cas de MSRs possédant une seule cystéine redox, comme les 1-Cys MSRB, l'acide sulfénique est très probablement réduit directement par une TRX ou une GRX (voie 1) ou par du glutathion (voie 2). Ensuite le complexe intermoléculaire comprenant une MSR est réduit par une autre TRX ou GRX ou par du glutathion réduit.

Certaines protéines MSR de type B, présentes dans la plupart des organismes, n'ont pas la seconde cystéine et par conséquent sont réduites grâce à un mécanisme différent (Vieira Dos Santos *et al.*, 2007; Tarrago *et al.*, 2009) (Figure 18B).

Par rapport aux autres organismes (bactéries, levures et mammifères) où les MSRs ont été caractérisées dans les années 80 et 90, l'identification moléculaire et la caractérisation des enzymes MSR ont été réalisées plus tard chez les végétaux supérieurs. Ces travaux ont révélé la complexité

des familles de gènes *MSR* chez les plantes par rapport à tous les autres organismes (Rouhier *et al.*, 2006 ; Tarrago *et al.*, 2009).

Les MSRs remplissent des fonctions essentielles pour la tolérance au stress et au cours du vieillissement dans les bactéries, les levures, et les cellules de mammifères. Chez la levure, la suppression et la surexpression de gènes *MSRA* résultent en respectivement une diminution et une augmentation de la durée de vie (Koc *et al.*, 2004).

La surexpression de l'isoforme MSRB2 mitochondriale humaine protège les cellules contre les dommages liés à la leucémie lymphoblastique en augmentant la survie cellulaire face aux conséquences du stress oxydant (Cabreiro *et al.*, 2008).

Chez les organismes photosynthétiques, les premiers travaux fournissant des preuves de l'activité MSR ont été publiés dans les années quatre-vingt par Sanchez *et al.* (1983). Ces auteurs ont constaté que l'activité MSR est principalement localisée dans les extraits chloroplastiques de diverses plantes supérieures. Récemment, des travaux basés sur des approches génétiques ont révélé des fonctions essentielles pour les MSRs chez diverses espèces végétales comme des espèces modèles (*Arabidopsis thaliana*) ou cultivées (riz, tomate). Les MSRs ont ainsi été décrites comme jouant des rôles protecteurs dans les réponses à des contraintes environnementales telles que la salinité, les basses températures et la forte lumière (Rouhier *et al.*, 2006 ; Guo *et al.*, 2009 ; Laugier *et al.*, 2010 ; Dai et Wang 2012 ).

Cette capacité de protection des structures cellulaires pourrait être liée à deux types de rôles : les MSRs pourraient réparer des protéines endommagées par le stress oxydant au niveau de leurs méthionines et ainsi préserver leur fonction ; mais elles pourraient aussi remplir une fonction directe d'antioxydant et de détoxication des ERO par l'intermédiaire de la MetO. En effet, il semblerait que la sulfoxydation de la Met par les ERO dans certaines protéines cibles de MSR ne modifient pas leur activité ou leur conformation. La réduction de la MetO dans ces protéines permettrait alors d'éliminer des ERO par consommation de NADPH via les systèmes réducteurs des MSR de type Trx (Moskovitz *et al.*, 1997).

## Objectifs de la thèse

---

L'amélioration du rendement en conditions de déficit hydrique implique de mieux cerner les mécanismes adaptatifs à cette contrainte afin de maîtriser davantage les interactions génotype × environnement dans les systèmes de cultures. Selon le génotype, les mécanismes d'adaptation impliqués peuvent entraîner une augmentation de la tolérance ou l'apparition d'une sensibilité plus élevée à la sécheresse (Maury *et al.*, 1996).

Le lien entre le fait physiologique ou génétique et l'application de ce fait dans la sélection des variétés est essentiel pour accélérer et rendre plus complémentaires les processus d'évaluation des variétés dans les schémas de sélection utilisés.

Les mécanismes d'adaptation à la déshydratation cellulaire intègrent des processus moléculaires et biochimiques relatifs aux systèmes antioxydants comme cela a été décrit dans les données bibliographiques.

Dans ce contexte, mon travail de thèse de doctorat a pour objectifs de caractériser les mécanismes de réponse au déficit hydrique dans des conditions contrôlées en chambre de culture (Phytotron), ayant trait aux systèmes antioxydants, chez deux variétés d'orge contrastées pour leur valeur agronomique en condition de manque d'eau dans des conditions de culture naturelles en Algérie.

Deux variétés ont été choisies, la première est une variété locale, Saida, qui tolère des conditions de manque d'eau, ce qui se traduit d'un point de vue agronomique par une stabilité de son rendement, la deuxième est une variété française sensible au déficit hydrique et nommée Express. Nos travaux ont consisté à déterminer les mécanismes antioxydants potentiellement impliqués dans la tolérance ou la sensibilité de ces deux génotypes.

De plus, la mise en évidence de corrélations entre le niveau de tolérance au déficit hydrique et le niveau d'accumulation ou d'activité de certaines molécules antioxydantes chez une variété par rapport à une autre pourrait s'avérer intéressante pour définir des critères de sélection de plantes tolérantes vis-à-vis du manque d'eau et ainsi développer des outils de diagnostic précoces et complémentaires des différentes méthodes classiquement utilisées.

## 1. Matériel végétal, conditions de culture et traitements expérimentaux

### 1.1. Matériel végétal et conditions de culture

Deux génotypes d'orge, *Hordeum vulgare* L., ont été choisis sur la base de leur tolérance différentielle au déficit hydrique. Des semences de la variété Express, une variété sensible à la sécheresse (Arnau *et al.*, 1997), ont été obtenues de la société SIS (Via Mirandola, San Lazzaro di Savena, Italie). Les semences de Saïda, une variété locale algérienne tolérant la sécheresse, ont été obtenues de l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures, El-Harrach, Alger, Algérie).

Après semis d'une dizaine de semences d'un même génoype dans des pots de 2 litres contenant le même poids de terreau, les plantes ont été cultivées dans des conditions contrôlées de température (25/20°C, jour / nuit), de lumière (350 photons mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, photopériode de 12 h) et d'humidité de l'air (60%) dans un phytotron. Après une semaine, sept jeunes plants de taille équivalente ont été retenus pour chaque pot. Tous les pots ont été arrosés de façon similaire avec la fréquence suivante: 2 jours avec de l'eau du robinet et le 3ème jour avec une solution nutritive de type Coïc-Lesaint (Coïc et Lesaint, 1971) (Tableau 1).

**Tableau 1: Solution nutritive de Coïc et Lesaint (1971) à pH 5,8.**

<b>SOLUTION A</b> qsp 30 litres (0,3%)		
Acide nitrique (d=1,41)	HNO <sub>3</sub>	1895 ml
Di-ammonium hydrogénophosphate	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1200 g
Nitrate de potassium	KNO <sub>3</sub>	2250 g
Oligo-éléments		1000 ml
<b>SOLUTION D'OLIGO-ELEMENTS</b> qsp 1 litre		
Ammonium heptamolybdate	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,5 g
Acide borique	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	15 g
Sulfate de manganèse	MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	20 g
Sulfate de zinc	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	10 g
Sulfate de cuivre	Cu(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 5H <sub>2</sub> O	2,5 g
<b>SOLUTION B</b> qsp 30 litres (0,3%)		
Acide nitrique (d=1,41)	HNO <sub>3</sub>	5 ml
Nitrate de calcium	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1600 g
Nitrate de magnésium	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	900 g
Nitrate de potassium	KNO <sub>3</sub>	2300 g
Acide éthylènediaminetetraacétique Fe-Na	FeNaEDTA	73,4 g

La solution nutritive se compose d'un volume de solution A pour un volume de solution B.

## 1.2. Traitements expérimentaux

Quinze jours après le semis (stade 4 feuilles), trois traitements ont été appliqués: un groupe de plantes a été cultivé sous arrosage optimal pendant 8 jours (contrôle) et un second groupe a été soumis à un déficit hydrique par arrêt de l'arrosage pendant 8 jours. Par la suite, certaines plantes stressées ont été réarrosées pendant 3 jours.

Les données sont exprimées sous la forme de moyennes  $\pm$  écart-type provenant de quatre expériences indépendantes.

Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Les données sont analysées en utilisant le test (t) \*, \*\* et \*\*\*, la valeur chez Express est significativement différente de la valeur mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec respectivement  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (test t).

Le contenu relatif en eau, CRE, a été mesuré sur des échantillons foliaires de feuilles bien développées. Les feuilles prélevées sont placées dans des tubes pour être immédiatement pesées afin de déterminer le poids frais (Pf) et ensuite immergées dans des boîtes contenant de l'eau pendant 6 heures. La pesée des feuilles après hydratation donne le poids saturé en eau (Pr). Ces feuilles sont ensuite transférées dans une étuve à 80°C pour deshydratation complète jusqu'à stabilisation du poids pendant 24 h, pour déterminer le poids sec (Ps).

Les Pf, Pr et Ps sont exprimés en grammes. Le CRE en % est calculé à partir de la formule suivante de Schonfeld *et al.* (1988):

$$\text{CRE (\%)} = \left[ \frac{(\text{Pf} - \text{Ps})}{(\text{Pr} - \text{Ps})} \right] \times 100$$

## 2. Analyses biochimiques

Les échantillons prélevés sont généralement des fragments ou disques de feuilles bien développées, ils sont immédiatement placés dans du papier aluminium et plongés dans de l'azote

liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ils sont ensuite transférés dans un congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour être stockés. L'eau utilisée pour tous les protocoles est une eau milli-Q ultra-pure (Waters).

## 2.1. Dosage des chlorophylles, des caroténoïdes et de la vitamine E

Des disques de feuilles (diamètre 0,6 cm) ont été congelés dans l'azote liquide dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant analyse.

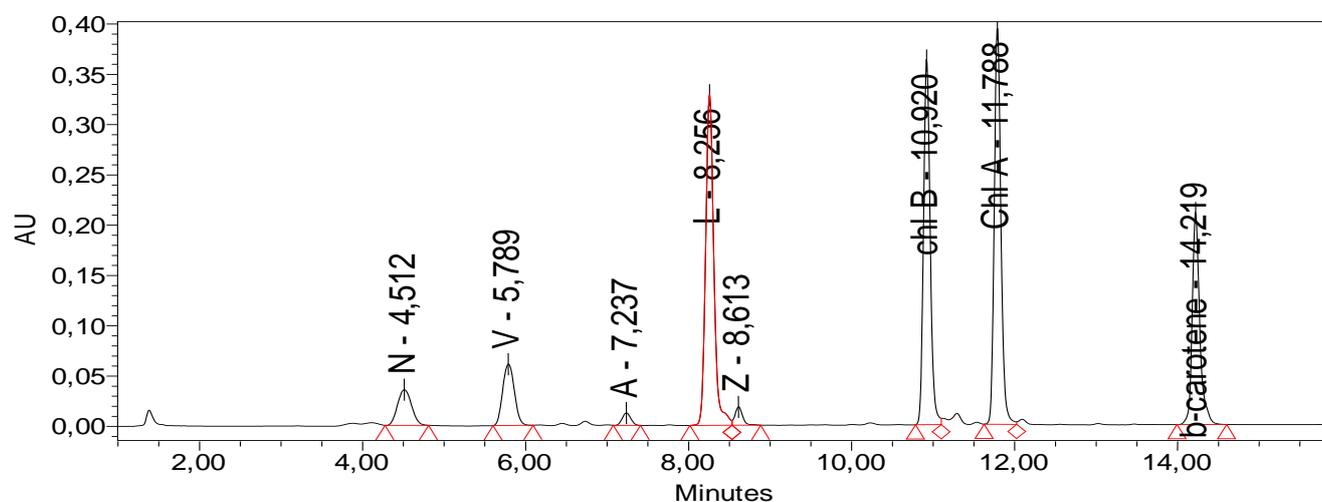
Le jour de l'analyse, ils sont broyés avec un petit pilon dans 300  $\mu\text{L}$  de méthanol froid. Après filtration à travers un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$  PTFE (Iso-Disc; SUPELCO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 75  $\mu\text{L}$  de l'extrait sont immédiatement analysés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC), tel que décrit par Collin *et al.* (2008).

La séparation des différents pigments est réalisée en utilisant un gradient impliquant deux solvants : l'éthylacétate comme tampon A et 900 ml d'acétonitrile avec 100 ml d'eau et 1 ml triéthylamine comme tampon B.

La colonne utilisée est une Nova-Pak C18 4  $\mu\text{m}$  ; 3,9 \* 300 mm WAT011695 (Waters) en utilisant méthode a gradient.

Les caroténoïdes (néoxanthine, violaxanthine, anthéroxanthine, lutéine, zéaxanthine et  $\beta$ -carotène) et les chlorophylles a et b ont été détectés par absorption à 445 nm (Figure 19).

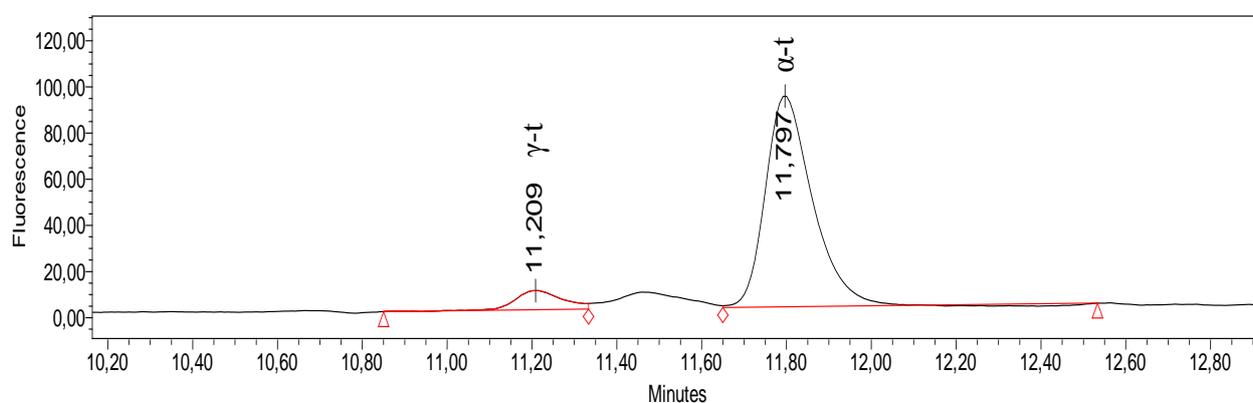
Le degré de dé-époxydation des composants du cycle des xanthophylles a été exprimé par le rapport  $(Z + A) / (V + A + Z)$ , où Z est la zéaxanthine, A l'anthéroxanthine et V la violaxanthine.



**Figure 19: Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, des chlorophylles et caroténoïdes extraits de disques foliaires d'orge.**

N : néoxanthine, V : violaxanthine, A : anthéroxanthine, L : lutéine, Z : zéaxanthine, Chl B : Chlorophylle b, Chl A : Chlorophylle a, b-carotene:  $\beta$ -carotène.

L' $\alpha$ -tocophérol et le  $\gamma$ -tocophérol ont été détectés en utilisant la même procédure, mais par la mesure de l'émission de fluorescence ( $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ ) (Figure 20).



**Figure 20: Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, des tocophérols extraits de disques foliaires d'orge.**  $\gamma$ -t :  $\gamma$ -tocophérol,  $\alpha$ -t :  $\alpha$ -tocophérol

## 2.2. Dosage du glutathion

Des disques de feuilles congelés ont été broyés en une fine poudre et extraits dans 600  $\mu\text{L}$  d'acide diéthylène triamine-penta-acétique (DTPA) 6,3 mM contenant 40  $\mu\text{M}$  d'*N*-acétyl-L-cystéine et 0,15% d'acide trifluoroacétique (TFA). Après centrifugation (15.000 g, 10 min), le surnageant a été filtré sur une membrane en nylon de 0,2 mm (Spin-X Costar, Cambridge, MA, USA).

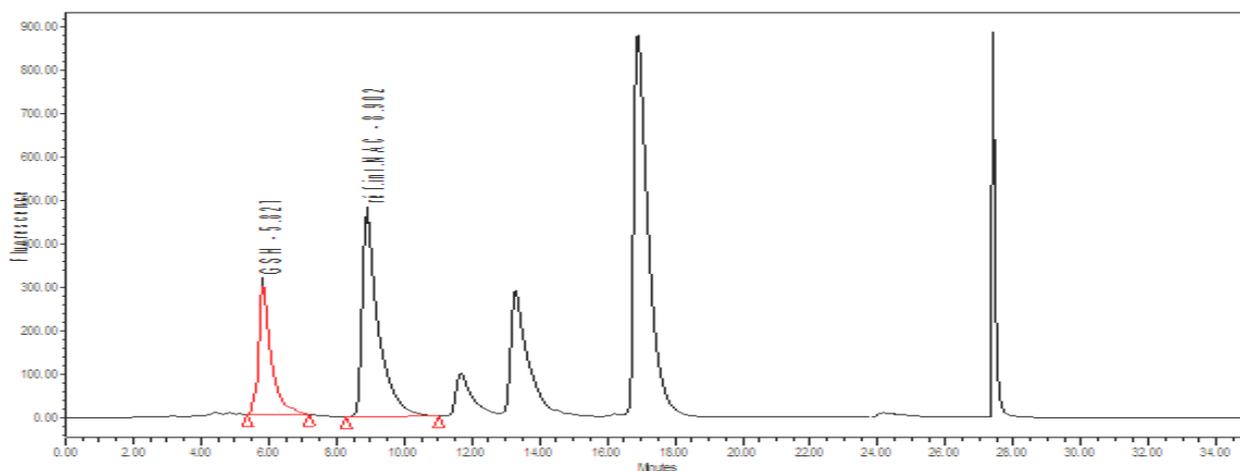
125  $\mu\text{L}$  du surnageant sont mélangés à 225  $\mu\text{L}$  de tampon A (composé de 6,3 mM de DTPA, 0,2 M 4-(2-hydroxy-éthyl)-pipérazine-1-propane sulfonique, pH 8,2) ou de tampon B (tampon A + 0,5 mM de Tris (2-carboxy-éthyl) phosphine hydrochlorure (TCEP)).

Pour les mesures de la teneur en GSH réduit, les échantillons repris dans le tampon A ont immédiatement été alkylés avec un composé fluorescent, le monobromobimane (mBBr), dans l'acétonitrile à une concentration finale de 500  $\mu\text{M}$  après 20 minutes d'incubation dans l'obscurité. La réaction a ensuite été arrêtée en ajoutant 150  $\mu\text{L}$  d'acide méthanesulfonique froid à 1 M.

Pour les mesures de glutathion total (GSSG + GSH), les échantillons repris dans du tampon B contenant le réducteur TCEP ont été alkylés pendant 45 min à température ambiante.

20  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon ont été analysés par HPLC en phase inverse par injection sur une colonne C18 4 $\mu\text{m}$  (300\*3.9 mm) (Waters), en utilisant une méthode de type gradient avec des solvants A: 0,1% TFA et B: acétonitrile (1 mL min<sup>-1</sup>).

Les produits dérivés du bimane ont été détectés par l'émission de fluorescence due à ce composé ( $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ ). Le calibrage a été réalisé en utilisant du glutathion provenant de chez Sigma (St. Louis, MO, USA) comme décrit par Collin *et al.*, (2008) (Figure 21).



**Figure 21: Profil d'éluion, par chromatographie sur colonne de silice, du glutathion extrait de disques foliaires d'orge**

La concentration de glutathion oxydé (GSSG) a été calculée comme étant la différence entre les valeurs de glutathion total et de glutathion réduit (GSH).

### 2.3. Dosage de l'acide ascorbique

Le contenu en ascorbate ou acide ascorbique a été analysé par HPLC comme décrit par Havaux *et al.*, (2005). Deux disques de feuilles de 0.6 cm de diamètre ont été broyés dans 750  $\mu\text{L}$  d'acide métaphosphorique froid dilué à 4,5% dans de l'eau. Les échantillons sont ensuite filtrés à travers une membrane de nylon 0,2  $\mu\text{m}$  (Spin-X Costar).

Pour les mesures du contenu en ascorbate réduit présent dans l'échantillon (acide ascorbique, ASC), une quantité de 20  $\mu\text{L}$  d'extrait a été immédiatement injectée en HPLC pour analyse.

L'ascorbate est détecté par absorption UV à 245 nm en utilisant une méthode isocratique avec une phase mobile : eau acidifiée à pH 2,5 avec de l'acide sulfurique pur.

La colonne en phase inverse utilisée est de type C18 WATERS Nova pak ; 60 Å, 4 µm, 3,9\*300 mm. Elle est protégée en amont par une colonne de garde Bondapak C18 (Waters). Le temps de rétention de l'ascorbate est de 1 min avec un débit de 0,65 mL min<sup>-1</sup> (Figure 22).

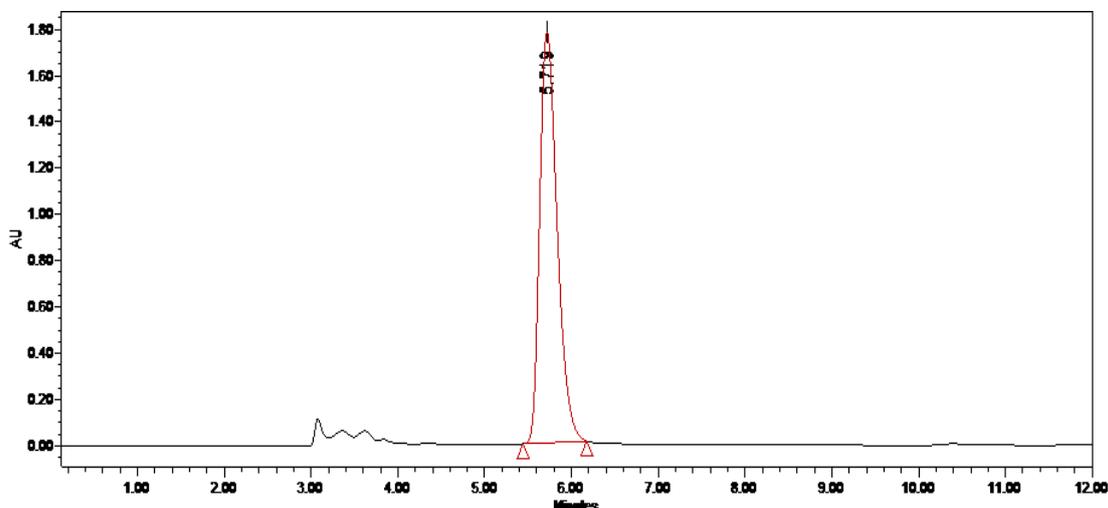


Figure 22: Profil d'élution, par chromatographie sur colonne de silice, de l'acide ascorbique extrait de disques foliaires d'orge.

La teneur en ascorbate total (ASC + déshydroascorbate (DHA)) a été mesurée par réduction de l'acide déshydroascorbique dans l'échantillon en acide ascorbique en ajoutant 10 mM de TCEP au tampon d'extraction. Le mélange a été laissé à température ambiante et à l'obscurité pendant 4 h à 25°C avant l'injection de 20 µL pour l'analyse HPLC.

La concentration en ascorbate oxydé (déshydroascorbate) a été calculée comme la différence entre les valeurs de concentration pour l'ascorbate total (ASC + DHA) et l'acide ascorbique (ASC).

#### 2.4. Mesure de la peroxydation lipidique par HPLC

---

La peroxydation lipidique a été évaluée par dosage HPLC des alcools issus des hydroperoxydes extraits des tissus foliaires après réduction par la triphénylphosphine et saponification des lipides totaux à partir d'une quantité de feuilles équivalente à 0,5 g stockées à -80°C.

L'extraction des lipides a été réalisée selon Montillet *et al.* (2004) en deux étapes. La première étape consiste en une réduction des hydroperoxydes en alcools pour stopper toute activité métabolique et oxydation supplémentaire, Les échantillons frais (tissus foliaires) sont transférés dans

des tubes de 50 ml et broyés dans de l'azote liquide avec une tige de verre pendant 30 secondes. Ils sont ensuite broyés à l'aide d'un Ultra-Turax pendant 30 secondes à vitesse moyenne jusqu'à l'obtention d'un broyat homogène dans 2,5 ml d'une solution de borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ) à 5% /NaOH à 0,2 M (p/v) contenant une référence interne, le 15-hydroxy-11,13(Z,E)-eicosadiénoic acid (15-HEDE) (100 nmol par gramme de matière fraîche).

Après homogénéisation au vortex, le broyat est conservé au congélateur à  $-20^\circ\text{C}$  jusqu'à la deuxième l'étape qui consiste à l'extraction des lipides totaux et la libération des acides gras par saponification. Les échantillons de la première étape conservés à  $-20^\circ\text{C}$ , sont décongelés dans la glace. Après addition de 3,5 ml d'acide citrique à 1 M au broyat, on ajoute 5 ml d'un mélange chloroforme/méthanol 50/50 (v/v). Après centrifugation (700g, 5 mn), on obtient deux phases: une phase organique (chloroforme) et une phase aqueuse. La phase organique est récupérée et la phase aqueuse est extraite à nouveau avec 5 ml de chloroforme.

Les deux extraits organiques ainsi obtenus sont rassemblés et le solvant est ensuite éliminé par évaporation à  $80^\circ\text{C}$  avec l'évaporateur à aiguille (Leibisch Labortechnik) pendant 30 minutes.

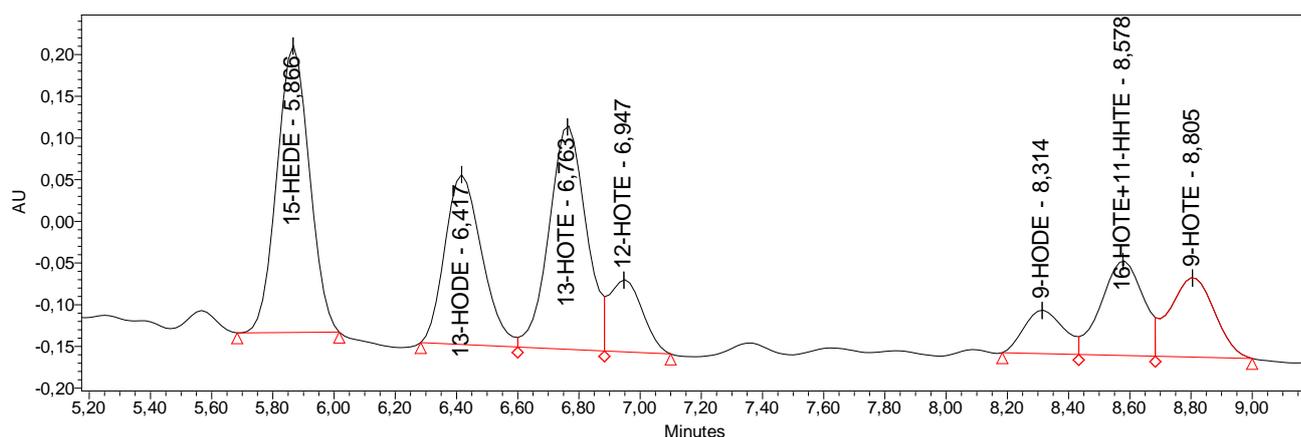
L'extrait lipidique est alors dissout dans 2,5 ml d'éthanol, après addition de 2,5 ml de NaOH 3,5 N. Le mélange est ensuite soumis à une hydrolyse dans l'évaporateur à aiguille à  $80^\circ\text{C}$  pendant 10 min pour l'élimination de l'éthanol. Le pH est ajusté à 4,5 avec 2,1 ml d'acide citrique 1M. Après l'hydrolyse, 1,5 ml de solvant (mélange hexane-éther diéthylique, 50/50, v / v) est ajouté à chaque échantillon. Après une centrifugation (700 g 5 min à  $4^\circ\text{C}$ ), la phase supérieure jaune contenant les hydroxyacides est prélevée, transférée dans des tubes sertis et conservée à  $-20^\circ\text{C}$  en attendant le dosage HPLC.

Une partie aliquote de 100  $\mu\text{L}$  est soumise à une analyse par chromatographie en phase directe HPLC (Waters Alliance 2690 et double détecteur d'absorbance 2487, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) en utilisant une colonne de silice hydrophile à phase polaire entièrement hydroxylée (Zorbax RX-SIL 4,6 x 250 mm, 5- $\mu\text{m}$  la taille des particules, Hewlett Packard, Les Ulis, France). Les hydroxyacides gras sont élués en flux isocratique avec un mélange d'hexane, diéthyle éther et acide acétique (70/29,31/0,69, v/v/v) et un débit de 1,5 ml min<sup>-1</sup>. La détection UV est effectuée à 234 nm, longueur d'onde correspondant à l'absorption des diènes conjugués.

La peroxydation lipidique induite par les espèces actives de l'oxygène (ERO) a été évaluée à partir des niveaux des 4 hydroxyacides triéniques (HOTE) et des 4 hydroxyacides diéniques (HODE)

avec comme références l'acide 15-Hydroxy-11,13(Z,E)-EicosaDiEnoique d (15-HEDE) (Montillet *et al.*, 2004) (Figure 23).

La peroxydation lipidique enzymatique induite par les lipoxygénases (LOX) a été estimée à partir du niveau en 13-HOTE après soustraction de la quantité de molécules racémiques de 13-HOTE issus d'une peroxydation dépendant des ERO comme décrit dans Montillet *et al.* (2004).



**Figure 23: Profil d'éluion, par chromatographie sur colonne de silice, des différents hydroxy acides extraits de disques foliaires d'orge.**

## 2.5. Imagerie de la peroxydation lipidique par autoluminescence

La peroxydation lipidique a été visualisée dans les feuilles par une méthode basée sur l'autoluminescence et décrite par Havaux *et al.* (2006) et Birtic *et al.* (2011).

L'émission de photons par les feuilles due à la décomposition spontanée de peroxydes lipidiques et de formes carbonyles a été enregistrée à température ambiante en utilisant des capteurs très sensibles couplés à une caméra (Versarray LN / CCD 1340-1300B, Roper Scientific).

Les capteurs sont refroidis avec de l'azote liquide pour réduire le bruit thermique et permettre la mesure du faible niveau de lumière en intégrant le signal (Havaux *et al.*, 2006). Avant l'analyse des feuilles pour la prise d'image, les plantes sont placées à l'obscurité pendant 2 h. Le temps minimal pour une prise d'image est de l'ordre de 20 min.

## 2.6. Mesure de la décomposition enzymatique du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Deux disques de feuilles de 0,6 cm de diamètre ont été broyés dans de l'azote liquide et la poudre reprise dans 500 µL de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, additionné de 1 mM de fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF), un inhibiteur de protéases. Après centrifugation (16000 g, 20 min, 4°C), le surnageant a été rapidement utilisé pour le dosage enzymatique.

La concentration en protéines a été déterminée en utilisant une méthode de dosage basée sur l'acide bicinchoninique (BC Assay Reagent, Interchim) (cf. chapitre 3.2). L'activité de décomposition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été suivie par spectrophotométrie à 240 nm en suivant la méthode d'Aebi (1984) dans un mélange réactionnel contenant 50 mM de tampon phosphate de potassium, pH 7.0, 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) et 5 à 20 µL de surnageant de l'extrait foliaire dans un volume final de 1 ml.

Les calculs de l'activité ont été réalisés selon Aebi (1984) en suivant la disparition du peroxyde d'hydrogène, sur la base du coefficient d'extinction de cette molécule ( $E = 39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). L'activité CAT a été estimée par la diminution de l'absorbance de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 240 nm. Une unité de CAT a été définie comme la quantité d'enzyme pour la neutralisation de 1 nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par minute.

## 2.7. Mesure de l'activité enzymatique de type SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)

### 2.7.1. Dosage par spectrophotométrie

Des disques de feuilles congelés ont été broyés dans de l'azote liquide dans un tampon d'extraction contenant 1 ml de 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 et 1 mM PMSF à 4°C.

Après agitation forte suivie d'une centrifugation (16000 g, 20 min, 4°C), le surnageant contenant les protéines solubles est conservé sur de la glace et utilisé dans les heures suivant l'extraction. La concentration en protéines a été déterminée comme décrit plus loin (chapitre 3.2).

La méthode spectrophotométrique de mesure de l'activité SOD est un test quantitatif utilisant le couple xanthine/xanthine oxydase comme générateur d'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). L'ajout de cytochrome *c* dans une solution de xanthine/xanthine oxydase entraîne une réduction du site métallique (fer) du cytochrome *c* par réaction avec le superoxyde formé.

L'ajout dans la solution composée du cytochrome c et du système xanthine/xanthine oxydase d'un échantillon protéique contenant une activité superoxyde dismutase entraîne la dismutation du superoxyde et une diminution de la vitesse de réduction du cytochrome c. Une unité d'activité SOD est définie comme la quantité de SOD nécessaire pour inhiber 50% de la réduction du cytochrome c (McCord and Fridovich, 1969).

Une première solution (**A**) est préparée (10 ml) contenant 1,5 ml du tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7,8 avec de l'EDTA à 0,1 mM ainsi que 7,5 ml de xanthine à 1 mM et du cytochrome c à 1mM (Sigma).

Une seconde solution (**B**) contient la xanthine oxydase solubilisée à partir d'une poudre lyophilisée 0.4-1.0 unités/mg (Sigma) dans du tampon phosphate de potassium 50 mM à pH 7,8.

3 µl de solution (**B**) sont ajoutés dans 1 mL (contenance des cuves de spectrophotométrie) de solution (**A**) afin d'obtenir une pente comprise entre 0,015 et 0,025 U.min<sup>-1</sup> à 550 nm qui est la longueur d'onde d'absorption pour le cytochrome c réduit. La cinétique de réduction est suivie pendant 4 minutes (McCord, 2001). Les mesures sont effectuées en utilisant un spectrophotomètre (Cary 50 UV Varian) thermorégulé à 25°C. L'activité superoxyde dismutase d'extraits protéiques de feuilles a été mesurée avec des aliquotes de 3 µL. Ce volume a été utilisé pour avoir une détermination optimale de cette activité, le pourcentage d'inhibition devant être compris entre 40 et 60 %.

$$\% \text{ inhibition} = \left[ \frac{(\text{Pente témoin} - \text{Pente échantillon})}{\text{Pente témoin}} \right] \times 100$$

$$\text{unités SOD} = \frac{\% \text{ inhibition}}{(100 - \% \text{ inhibition})}$$

### 2.7.2. Révélation de l'activité SOD sur gel natif

Des morceaux de feuilles congelées ont été broyés dans de l'azote liquide dans un tampon d'extraction contenant 1 ml de 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 et 1 mM PMSF à 4°C. Après agitation forte suivie d'une centrifugation (16000 g, 20 min, 4° C), le surnageant contenant les protéines solubles a été stocké sur de la glace et utilisé dans les heures suivant l'extraction. La concentration en protéines a été déterminée comme décrit ci-dessous (chapitre 3.2).

La révélation de l'activité SOD sur gel natif est un test colorimétrique qui permet de détecter la présence de SOD active dans un extrait protéique. Cette méthode semi quantitative est bien décrite dans la littérature (Beauchamp et Fridovich 1971).

La révélation de l'activité SOD s'effectue de la façon suivante : l'excitation par la lumière de la riboflavine entraîne un transfert d'électrons d'un donneur d'électron (dans le cas présent, c'est le Temed ou N, N, N', N'-tétra méthyl éthylène diamine) vers l'oxygène, qui est alors réduit en anion superoxyde (Beauchamp and Fridovich, 1971). Cet anion réagit ensuite avec le NBT (Nitro Blue Tetrazolium) le réduisant en bleu de Formazan.

Le gel se colore ainsi en bleu excepté aux endroits où ont migré les différentes isoformes de SOD provenant de l'échantillon protéique. Ces enzymes éliminent l'ion superoxyde par dismutation et laissent place à un gel incolore. Les différentes SOD (FeSOD, MnSOD et Cu/ZnSOD) migrent différemment dans le gel selon leurs caractéristiques de taille et de conformation.

L'électrophorèse non dénaturante (migration des protéines en fonction de leur taille ou de leur poids moléculaire) dans une matrice de de polyacrylamide (gels sans SDS de 1,5 mm d'épaisseur) est réalisée avec un gel de séparation à 13% en acrylamide surmonté d'un gel de concentration à 5% (Tableaux 4 et 5 avec les volumes de SDS remplacés par de l'eau milli-Q ultra-pure).

Les quantités chargées sur le gel varient entre 60 et 120 µg de protéines selon la teneur des échantillons. La migration est ensuite réalisée à 4°C sous un voltage de 80V dans un tampon de migration de type Tris-glycine (Invitrogene).

Après migration des échantillons, le gel natif est incubé pendant 20 minutes sous agitation dans un premier bain contenant 50 mL d'eau distillée et 2,45 mM de NBT. Ensuite, le gel est placé dans un second bain composé de tampon phosphate de potassium à pH 7,8 contenant 28 µM de riboflavine et 28 mM de TEMED pendant 20 minutes sous agitation.

Afin de vérifier la spécificité des signaux révélés, l'addition aux bains de 2 mM de KCN permet d'inhiber spécifiquement les Cu/ZnSOD, alors que l'addition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 2 mM inhibe les FeSOD et les Cu/ZnSOD.

Le gel est ensuite exposé sous une lampe (150 Watts) pendant 15 minutes. Le principe est de se servir de l'énergie lumineuse pour générer de l'anion  $O_2^{\cdot-}$  et d'utiliser le Nitro Blue Tétrazolium (NBT) pour détecter ce radical. L'activité superoxyde dismutase inhibe la formation de Bleu Formazan. L'activité SOD se manifeste par des zones achromatiques sur le gel uniformément bleu et peut être quantifiée en utilisant un logiciel associé au système de visualisation G:BOX (Syngene).

## 2.8. Dosage de l'activité méthionine sulfoxyde réductase

L'activité des protéines méthionine sulfoxyde (MetO) réductases, MSR, des feuilles d'orge a été déterminée en mesurant la réduction du substrat synthétique, le dabsyl-MetO qui mime la méthionine liée oxydée dans les protéines, en présence de DTE, un donneur d'électrons pour les MSR par la méthode de Vieira Dos Santos *et al.* (2005).

Des échantillons de feuilles ont été broyés dans de l'azote liquide et la poudre remise en suspension dans un mélange réactionnel contenant un tampon HEPES à 15 mM, pH 8.0, 10 mM  $MgCl_2$ , 30 mM KCl 20 mM DTE, 0.25 mM dabsyl-MetO. La réaction est ensuite déclenchée par addition d'un extrait foliaire contenant 300  $\mu g$  de protéines (Laugier *et al.*, 2010).

La réaction se déroule à 37 °C dans un thermomixeur sous agitation modérée pendant 3 h, puis elle est arrêtée par addition de 900  $\mu l$  d'un mélange contenant du tampon acétate à 29 mM , pH 4.16 et de l'éthanol (50/50, v/v).

Après centrifugation (12000 g, 30 min, 4C), 160  $\mu l$  du surnageant ont été analysés pour séparer le dabsyl-Met et le dabsyl-MetO par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) avec une colonne de type SunFire™ en phase inverse C18 (Waters, Milford, MA) et en utilisant un gradient composé du tampon acétate 29 mM, pH 4,16 et d'acétonitrile comme éluant. Le dabsyl-MetO étant plus hydrophile que le dabsyl-Met, il s'élué plus tôt lors de l'augmentation de la proportion en acétonitrile.

Le débit est de 1 ml min<sup>-1</sup> à température ambiante avec une longueur d'onde du détecteur (barrette de diodes, Waters 996) fixée à 466 nm pour la lecture de l'absorbance liée au groupement dabsyl (Laugier *et al.*, 2010).

### 3. Analyse et détection des protéines

---

#### 3.1. Extraction des protéines

---

##### 3.1.1. Extraction des protéines solubles foliaires

Après broyage des échantillons foliaires préalablement stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans de l'azote liquide, la poudre est reprise dans le tampon d'extraction contenant 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM PMSF, 50 mM d'un antioxydant, le  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma). L'extrait est ensuite soumis à une agitation forte au froid pendant 20 min et centrifugé (30000 g, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ).

Les protéines solubles foliaires sont précipitées à  $-20^{\circ}\text{C}$  en ajoutant 2 volumes d'acétone pour 1 volume de surnageant et conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ , après homogénéisation du mélange.

##### 3.1.2. Extraction des protéines chloroplastiques solubles

Les chloroplastes sont purifiés sur un gradient de Percoll selon une méthode modifiée de Mills et Joy (1980). Toutes les étapes de l'extraction sont réalisées à  $4^{\circ}\text{C}$ . Les limbes foliaires (12 à 15 g de matière fraîche) sont découpés en morceaux et broyés (Polytron homogenizer, Poly-Labo) deux fois pendant 6 sec dans 150 ml de milieu A (Tableau 2).

Le mélange est filtré sur une mousseline de 250  $\mu\text{m}$  de porosité, puis sur une mousseline de 60  $\mu\text{m}$ . Après centrifugation (3000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min), les chloroplastes sont délicatement remis en suspension dans 5 ml de milieu A et déposés sur un gradient discontinu de Percoll composé d'une couche supérieure de 20 ml à 40 % (v/v) et d'une couche inférieure de 10 ml à 90 % (v/v) dans du milieu A. Lors d'une centrifugation dans un rotor à godets oscillants (5000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min), les chloroplastes intacts migrent à l'interphase des deux coussins de Percoll. Les mitochondries et les débris chloroplastiques ne pénètrent pas dans la phase à 40 % de Percoll, et l'amidon se retrouve dans le culot au fond du tube.

Les chloroplastes intacts sont délicatement récupérés par aspiration et lavés dans 20 ml de milieu A. En vue de l'extraction de protéines, après centrifugation (3000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 5 min), le culot est repris dans un tampon de stockage (Tableau 3) et conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La transition congélation/décongélation et la faible osmolarité du tampon de stockage permettent la lyse des chloroplastes.

**Tableau 2: Composition du milieu A**

Tricine-NaOH pH 7,8	50 mM
Sorbitol	0,33 M
EDTA	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
Acide Ascorbique	2 mM
DTT (extemporanément)	5 mM

**Tableau 3: Composition du tampon de stockage hypotonique des chloroplastes.**

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	2 mM
NaCl	15 mM
Inhibiteur de protéases :	
- ACA	5 mM
- BAM	2 mM
- PMSF (extemporanément)	1 mM

Un volume de 200  $\mu$ L de suspension chloroplastique lysée est incubé avec un volume de 800  $\mu$ L de tampon (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, ACA 5 mM, BAM 2 mM, PMSF 1 mM) soumis à une agitation forte à 4°C pendant 1 h. Les protéines solubles du stroma sont récupérées dans le surnageant après centrifugation (10000 g, 4°C, 10 min), puis précipitées par addition d'un volume d'acétone et conservées à -20°C.

### 3.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé selon une méthode basée sur l'acide bicinchoninique, BCA, (Kit BCAssay, référence UP40840A, Interchim). Ce dosage permet de déterminer la quantité de protéines contenues dans un échantillon de 200 $\mu$ l de mélange surnageant/acétone.

Après précipitation de la fraction protéique par centrifugation (14000g, 4°C, 10 minutes), le culot est repris dans 50 $\mu$ l d'une solution de SDS 0.2%. Le réactif BCA est préparé en mélangeant 50 volumes de la solution 'A' incolore contenant le BCA (référence UP95424A) et 1 volume de la solution 'B' bleu contenant du sulfate de cuivre (référence UP95425). Le mélange prend une coloration bleu-vert pâle et on ajoute 1ml du réactif dans chaque échantillon. Un blanc est préparé avec 50 $\mu$ l de SDS 0.2% sans fraction protéique. Après incubation des échantillons dans une étuve à

37°C pendant 30 minutes, on remarque l'apparition d'une coloration violette qui correspond à la formation du complexe coloré BCA-cuivre-protéines. L'absorbance des complexes colorés est lue par spectrophotométrie (Cary 50, Varian) à 562 nm.

La concentration protéique des échantillons est déterminée à partir d'une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (référence UP36859A) mémorisée dans l'ordinateur du spectrophotomètre. Chaque mesure est effectuée contre le blanc du dosage. Les résultats sont exprimés en µg par mL de réactif dans la cuve. La valeur obtenue correspond à la quantité de protéines contenue dans le culot.

### 3.3. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes

L'électrophorèse SDS-PAGE est une technique de séparation des protéines principalement selon leur masse dans un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Laemmli, 1970).

Le SDS, détergent anionique fort, se fixe de façon uniforme sur les protéines par interaction hydrophobe, les charge négativement et les dénature. Les protéines dénaturées possèdent la même densité de charges négatives et migrent donc en fonction de leur masse moléculaire.

A partir des extraits précipités à l'acétone, on prélève les volumes correspondant à 150 µg de protéines sur la base du dosage des protéines. Les échantillons sont centrifugés (14000g, 10 minutes, 4°C). Le culot est repris et solubilisé dans 150µL de tampon de charge (Tris-HCl 10 mM pH 6.8, DTT 0.4M, SDS 8%, glycérol 40%, bleu de bromophénol 0.08%), à 1µg.µL<sup>-1</sup>.

Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 5 minutes pour les protéines solubles. Les tubes sont centrifugés quelques secondes pour culotter les protéines non solubilisées et éliminer la condensation.

Les protéines sont déposées (de 5 à 30 µl volume) sur un gel de concentration à 5 % d'acrylamide (m/v) (Tableau 4), le reste des échantillons est stocké à -20°C. Après 15 à 20 minutes à 90 V, les protéines pénètrent dans un gel de séparation à 13 % d'acrylamide (m/v) (Tableau 5) où la migration dure 1 h 30 minutes environ à 150 V jusqu'à la sortie du gel du front de migration. L'électrophorèse se déroule dans un tampon de migration dénaturant (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1%), en employant le système "Modular Mini-PROTEAN II" (Bio-Rad).

Des marqueurs de taille (All Blue, Bio-Rad) sont utilisés pour chaque gel et déposés dans un puits de manière à déterminer les masses apparentes des protéines séparées.

**Tableau 4: Composition du gel de concentration à 5% d'acrylamide (m/v) (pour 4 gels d'épaisseur 1 mm).**

Acrylamide (Sigma) 40 % (m/v)	1,25 ml
Tris-HCl pH 6,8 (1,5 M)	2,5 ml
SDS 10 % (m/v)	100 µl
Eau milli-Q ultra-pure	6 ml
Temed	10 µl
APS 10 % (m/v)	100 µl

**Tableau 5: Composition du gel de séparation à 13% d'acrylamide (m/v) (pour 4 gels d'épaisseur de 1 mm).**

Acrylamide (Sigma) 40 % (m/v)	6.5 ml
Tris-HCl pH 8,8 (1,5 M)	5 ml
SDS 10 % (m/v)	200µL
milli-Q ultra-pure	8.1 ml
Temed	8 µl
APS 10 % (m/v)	200µl

### 3.4. Immunodétection sur membrane (ou Western blot)

#### 3.4.1. Electrotransfert

Après électrophorèse en conditions dénaturantes, les protéines sont transférées en semi-sec sur une membrane de nitrocellulose de porosité 0,45 µm (Pall Gellman Science) avec un appareil de transfert (Trans-blot SD, BIO-RAD) constitué d'une électrode en inox (cathode) et d'une électrode en platine (anode). Le gel est déposé sur la membrane de nitrocellulose, l'ensemble étant pris en "sandwich" entre du papier épais absorbant (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD) imprégné de tampon de migration SDS-PAGE contenant 10% d'éthanol (Towbin *et al.*, 1979).

Le transfert s'effectue pendant 30 minutes sous voltage constant de 10 Volts. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration réversible des protéines dans une solution à 2% (m/v) de rouge Ponceau-S (Sigma) contenant 5% (v/v) d'acide acétique.

### 3.4.2. Immunodétection sur membrane (ou Western blot)

#### 3.4.2.1. Révélation chromogénique avec le système phosphatase alcaline

Les membranes de nitrocellulose sont placées pendant au moins 30 minutes à température ambiante sous agitation douce dans 20 mL de tampon TBS-T (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, NaCl 159 mM, Tween 20 à 0,02%) additionné de lait écrémé en poudre à 5 % (m/v) afin de bloquer les sites non spécifiques de reconnaissance par les anticorps (étape de passivation).

Les membranes sont ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante ou une nuit à 4°C dans 10 ml par membrane de TBST contenant l'anticorps primaire. Les révélations avec les sérums dirigés contre MSRB1 d'Arabidopsis et MSRA4 de peuplier (Vieira Dos Santos et al., 2005) ont été effectuées en utilisant des anticorps primaires dilués 500 fois .

Après 3 lavages de 10 minutes dans le tampon TBST, une incubation d'une heure est réalisée à température ambiante dans 10 ml de TBST par membrane contenant l'anticorps secondaire, produit chez la chèvre (Sigma, A3687) dirigé contre les immunoglobulines G de lapin et couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/10000ème.

Après 3 lavages dans le tampon TBST, la révélation de l'activité phosphatase alcaline est effectuée par addition de 66 µL du substrat BCIP (2,5% dans du N,N-diméthylformamide) et de 66 µl de NBT (5% dans du N,N-diméthylformamide à 70%), dans 10 ml par membrane de tampon de révélation (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM). L'énergie libérée par la déphosphorylation du NBT entraîne la précipitation du NBT sous forme de formazan, composé de couleur brun-violet et permet de visualiser la protéine recherchée. La réaction est arrêtée par rinçage des membranes dans de l'eau distillée.

#### 3.4.2.2. Révélation basée sur la fluorescence (système Licor)

La première étape de passivation se déroule comme précédemment dans du tampon TBS-T additionné de lait écrémé. La membrane est ensuite incubée dans 10 ml de TBS-T 1 X contenant des

anticorps primaires dirigés contre la 2-Cys peroxirédoxine (Prx) d'Arabidopsis (Broin et al., 2002), la forme suroxydée de cette Prx (Rey et al., 2007), la PrxQ de peuplier (Rouhier *et al.*, 2004) ou la catalase (Agrisera, Vännäs, Suède), respectivement diluées au 1:10000 ème, 1:2500 ème, 1:2000 ème et 1:1000 ème.

Trois lavages de 10 min au TBS-T 1X sont réalisés, puis la membrane est incubée pendant 30 min à l'obscurité avec l'anticorps secondaire dilué au 1/10000ème dans du TBST 1X. Cet anticorps anti-IGG de lapin a été produit chez la chèvre et est couplé à un marqueur fluorescent, absorbant à 680nm "Alexa Fluor® 680" IgG (Invitrogen).

Après trois lavages au TBS-T 1X pendant 10 min à l'obscurité, la membrane subit un dernier lavage au TBS (TBST sans Tween-20) pendant 1 heure à une nuit afin d'éliminer le Tween qui inhibe l'émission de fluorescence du marqueur. La membrane est ensuite scannée avec le système « Odyssey » de chez LICOR de façon à détecter les complexes antigènes-anticorps fluorescents. La quantification de l'intensité des bandes est ensuite effectuée avec un logiciel associé à ce système.

## 1. Résultats

---

D'un point de vue agronomique, on peut définir la tolérance à la sécheresse d'une variété cultivée comme la capacité à maintenir une productivité élevée malgré une baisse de la disponibilité en eau au niveau du sol.

Des essais de rendement au champ ont permis d'apprécier que les deux variétés d'orge choisies pour ce travail présentent une sensibilité différentielle vis-à-vis du déficit hydrique. La variété française Express (6 rangs) est très productive en conditions optimales, mais se caractérise par une grande sensibilité à la sécheresse. La variété locale algérienne Saïda présente une stabilité de rendement même lors de périodes de déficits hydriques intenses (Bouzerzour et Monneveux, 1993; Arnau *et al.*, 1997). Nous avons donc tout d'abord testé le comportement de ces deux variétés lors d'un déficit hydrique appliqué dans des conditions de culture entièrement contrôlées.

### 1.1. Effets physiologiques du déficit hydrique sur les plantes de deux variétés d'orge Saïda et Express

---

En premier lieu, nous avons étudié les effets du déficit hydrique sur les deux géotypes d'orge cultivés dans des conditions contrôlées en effectuant des observations visuelles et des mesures sur le contenu relatif en eau (CRE) sur les feuilles afin de vérifier que les caractéristiques connues des deux variétés se retrouvent dans des essais effectués en pot contenant une même quantité de terreau et en phytotron (1.1. Matériel végétal et conditions de culture).

Après le semis des graines et après 15 jours de croissance, un lot de plantes au stade 4 feuilles bien développées a été soumis à un déficit hydrique progressif par arrêt de l'arrosage pendant 8 jours. Une partie de ces plantes stressées a été ensuite réarrosée pendant 3 jours. Quatre expériences indépendantes dans le temps ont été réalisées.

Dans des conditions optimales d'arrosage, les plantes des deux variétés Express et Saïda affichent un développement et une croissance très comparables (Figure 24A) avec un CRE foliaire similaire de l'ordre de 98% (Tableau 6).

A la fin de la période de 8 jours sans arrosage, la plupart des feuilles, à l'exception des plus jeunes, sont sévèrement flétries, en particulier pour la variété Express. Les plantes de ce génotype présentent un plus grand nombre de feuilles endommagées par rapport à celles de la variété Saïda (Figure 24B).

Nous avons mesuré le contenu relatif en eau des feuilles (CRE) et avons noté une baisse de ce contenu du fait du déficit hydrique. Dans les conditions de manque d'eau appliquées en phytotron, on observe une diminution du CRE foliaire beaucoup plus marquée chez la variété Express par comparaison à Saïda. En effet, après 8 jours sans arrosage, les valeurs de CRE sont de respectivement 32% et 43% pour Express et Saïda (Tableau 6). Ces résultats sont en total accord avec les observations visuelles de l'état général des plantes et montrent une meilleure tolérance de la variété Saïda par rapport à Express dans des conditions similaires de manque d'eau.

Après un réarrosage, la plupart des feuilles jeunes des deux cultivars retrouvent une turgescence complète au bout de 3 jours. Ces plantes affichent alors des valeurs de CRE foliaires très proches de celles mesurées dans les plantes témoins, respectivement 96 et 97% pour Express et Saïda.

Mais une différence phénotypique persiste entre les deux variétés après réarrosage. Elle se situe au niveau du nombre des feuilles entièrement ou partiellement nécrosées qui sont présentes en nombre significativement plus élevé chez la variété Express avec une moyenne de 2.8 contre 1.9 pour Saïda (Tableau7; Figure 24C et D).

L'ensemble de ces résultats montre clairement plus de dommages chez la variété Express, que chez Saïda, lorsque ces deux génotypes sont soumis à des conditions similaires de déficit hydrique. Ces données sur la variété Express sont en accord avec celles rapportées par Arnau *et al.*, (1997) en ce qui concerne sa sensibilité à des conditions de sécheresse. Ces expériences montrent donc que le comportement des 2 variétés d'orge face à un déficit hydrique appliqué en conditions contrôlées est proche de celui décrit dans des essais au champ.

**Tableau 6: Contenu relatif en eau des tissus foliaires des génotypes d'orge Saïda et Express soumis à un déficit hydrique et un réarrosage.**

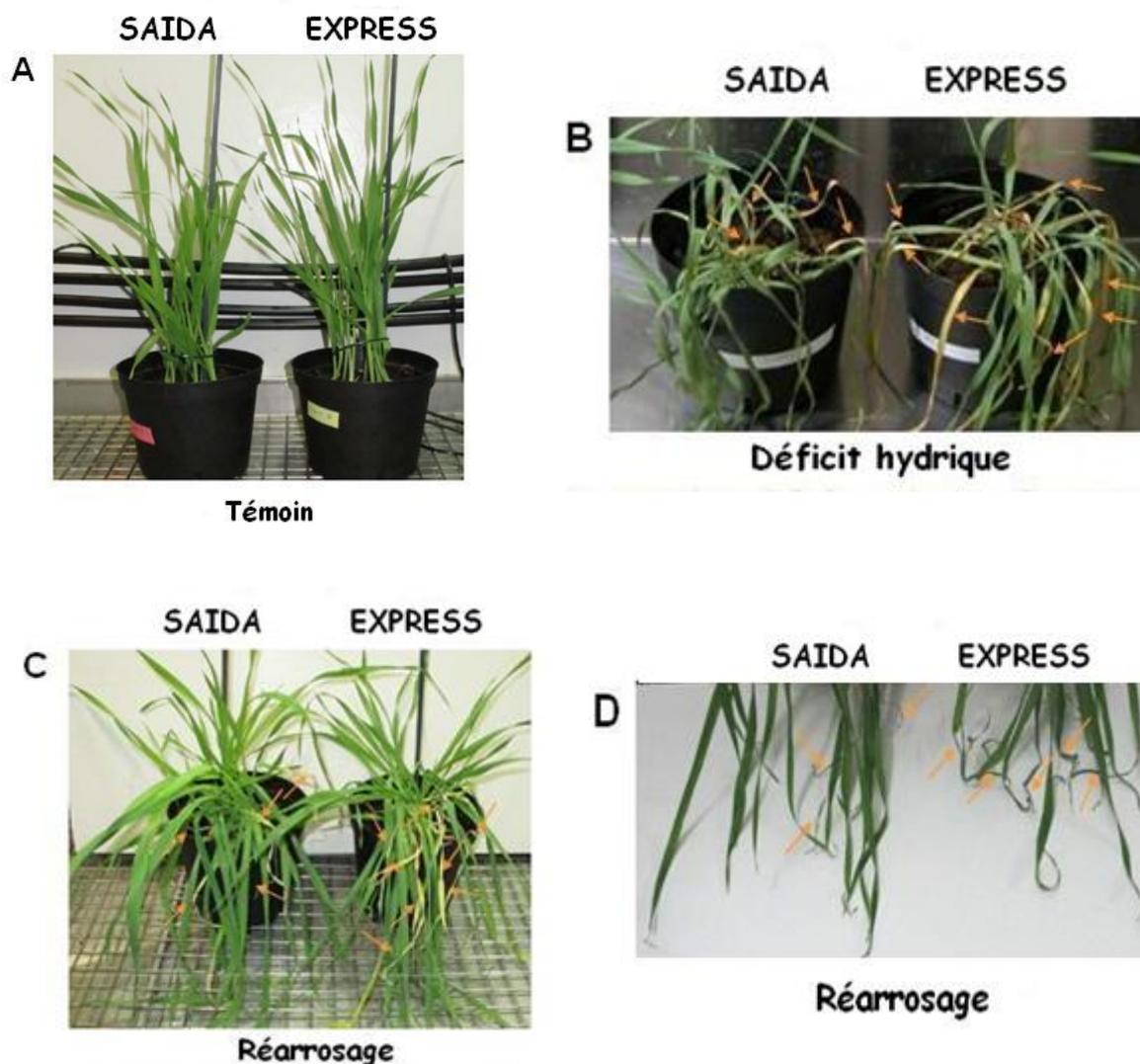
Genotype	Contenu relatif en eau des feuilles		
	Témoin	Déficit hydrique	Réarrosage
Saïda	98 ± 1 %	43 ± 5 %	97 ± 2 %
Express	98 ± 1 %	32 ± 5 % *	96 ± 3 %

Les données sont exprimées sous la forme de moyennes ± écart-type provenant de quatre expériences indépendantes. Les mesures ont été effectuées en utilisant des morceaux de feuilles jeunes bien développées (au moins 10 morceaux d'au moins 7 plantes par condition, par génotype et par expérience).  
Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours. \*, différence significative par rapport à la valeur mesurée pour Saïda dans le même traitement avec  $p < 0,05$  ( $t$ -test).

**Tableau 7: Nombre de feuilles présentant au moins 50% de la surface sèche ou nécrosée dans des plantes d'orge des variétés Saïda et Express soumises à un déficit hydrique pendant 8 jours, puis réarrosées pendant 9 jours.**

Genotype	Nombre de feuilles endommagées
Saïda	1.9 ± 0.2
Express	2.8 ± 0.5 ***

Les observations ont été effectuées sur des plantes âgées de 32 jours, soumises à un déficit hydrique pendant 8 jours ; 15 jours après le semis et réarrosées pendant 9 jours (32 plantes par génotype). \*\*\*, différence significative par rapport à la valeur mesurée pour Saïda dans le même traitement avec  $p < 0,001$  ( $t$ -test).



**Figure 24: Phénotype des plantes de deux variétés d'orge, Express et Saïda, soumises à un déficit hydrique et après réarrosage.**

(A) Témoïn: plantes bien arrosées pendant 23 jours.

(B) Déficit hydrique: 15 jours après semis (stade 4 feuilles), les plantes sont soumises à un arrêt de l'arrosage durant 8 jours.

(C) Réarrosage: les plantes stressées sont de nouveau arrosées pendant 3 jours.

(D) Pointes des feuilles des plantes stressées et réarrosées.

Quatre expériences indépendantes ont été réalisées et ont conduit à des résultats similaires.

(→: feuille endommagée ou nécrosée)

## 1.2. Contenus en chlorophylles, caroténoïdes et tocophérols

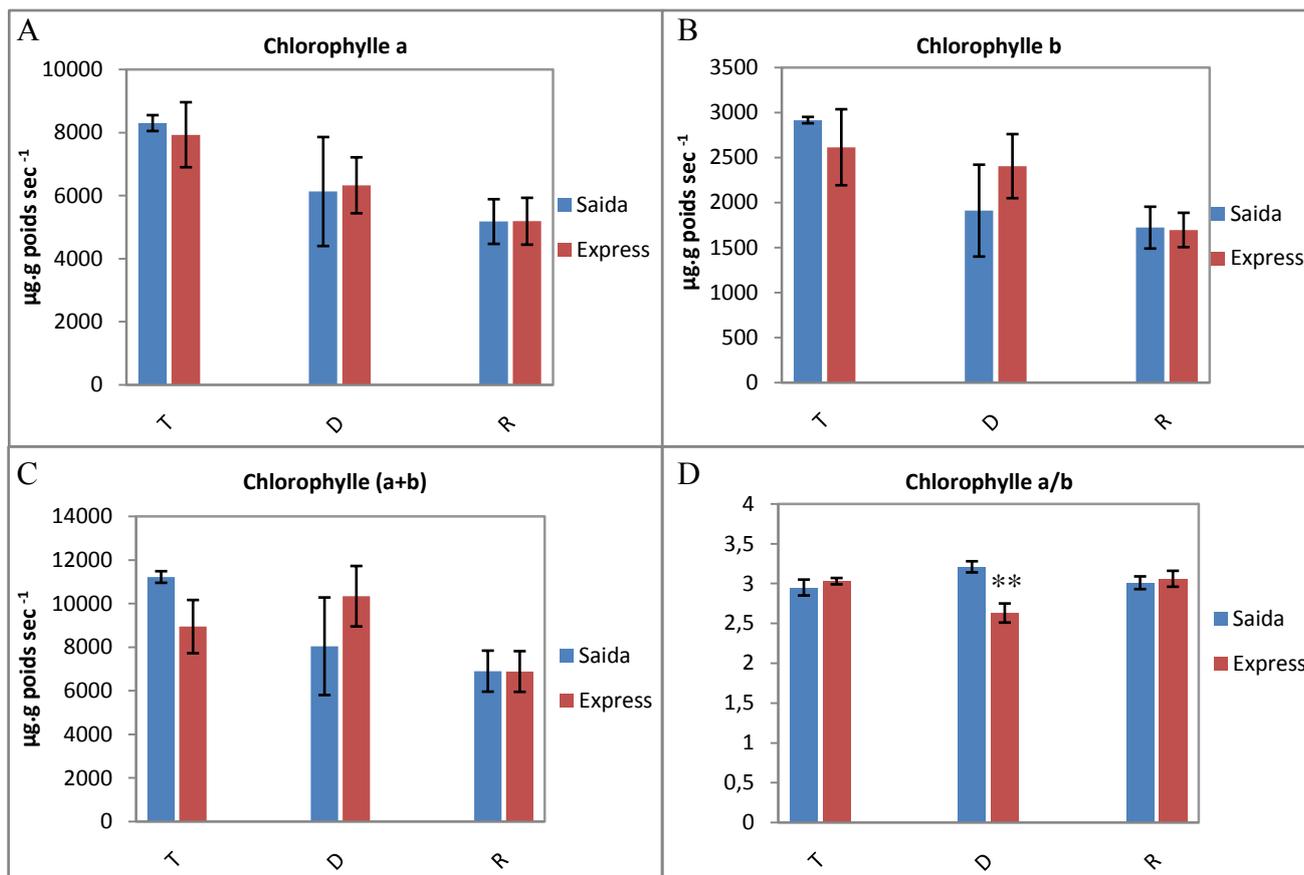
### 1.2.1. Composition en chlorophylles

Les quantités de pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) ont été déterminées par une méthode HPLC.

Chez les plantes témoins des deux variétés d'orge, les teneurs en chlorophylles sont assez proches et statistiquement comparables. En effet, les feuilles jeunes bien développées des variétés Saïda et Express affichent des teneurs en chlorophylles *a* et *b* de l'ordre de respectivement 8,3 et 2,7 mg.g poids sec<sup>-1</sup>. Le ratio Chl*a*/Chl*b* est le même pour les deux génotypes et est proche de 3.

En condition de manque d'eau, on remarque une diminution de la quantité en chlorophylle *a* avec une teneur de l'ordre de 6.2 mg.g poids sec<sup>-1</sup> chez les deux variétés. En ce qui concerne la chlorophylle *b*, une diminution substantielle a été observée chez les plantes stressées de la variété Saïda (1,9 mg.g poids sec<sup>-1</sup>) tandis que la variété Express affiche une teneur relativement moins affectée (2,4 mg.g poids sec<sup>-1</sup>) en condition de déficit hydrique. Le rapport Chl*a*/Chl*b* chez la variété Express est alors de l'ordre de 2,6 et est inférieur à celui mesuré chez Saïda, 3,2 Cette différence, statistiquement significative avec une probabilité  $p < 0,01$ , provient de la teneur en chlorophylle *b* nettement plus basse chez Saïda (Figure 25 ; Tableau 8).

Chez les plantes réarrosées, des teneurs en chlorophylles encore plus réduites ont été mesurées par rapport aux plantes témoins, avec des niveaux très comparables chez les deux variétés. Pour la Chl*a*, cette teneur est de l'ordre de 5,1 mg.g poids sec<sup>-1</sup>, pour la Chl*b*, elle est proche de 1,7 m.g poids sec<sup>-1</sup>. Pour le ratio Chl*a*/Chl*b*, le rapport est identique pour les deux variétés et revient à une valeur de 3 (Figure 25 ; Tableau 8).



**Figure 25 : Teneurs en chlorophylles chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique**

Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Les mesures ont été effectuées en utilisant des disques (diamètre 0,6 cm) de feuilles jeunes bien développées avec trois essais indépendants au minimum par génotype et par traitement. Les dosages ont été effectués en utilisant une méthode HPLC. Les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types provenant de trois à quatre mesures indépendantes. \*\*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec  $p < 0,01$ .

### 1.2.2. Composition en caroténoïdes

Les caroténoïdes sont impliqués dans la capture de l'énergie lumineuse et dans des mécanismes antioxydants. Ainsi, certains d'entre eux participent au cycle des xanthophylles, qui constitue une composante essentielle du réseau antioxydant chez les plantes (Havaux et Niyogi, 1999). Au cours du cycle des xanthophylles, la violaxanthine est convertie en zéaxanthine par l'intermédiaire de l'anthéroxanthine. L'anthéroxanthine et la zéaxanthine possèdent des fonctions protectrices permettant l'évacuation d'un excès d'énergie lumineuse sous forme de chaleur (Jahns et Holzwarth, 2012).

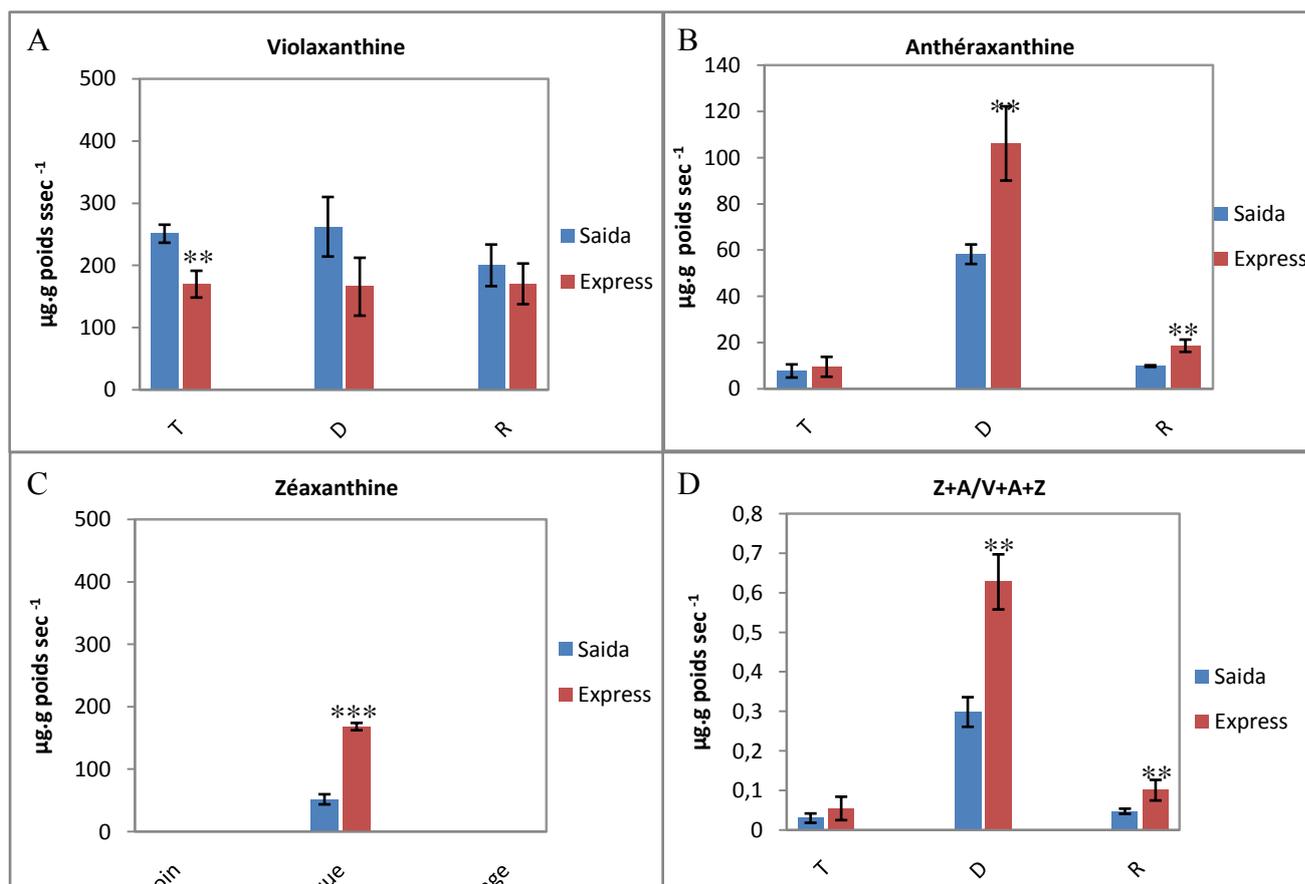
Chez les plantes des deux variétés en conditions de déficit hydrique ou de réarrosage, on ne remarque pas des changements notables pour le contenu en violaxanthine par rapport aux conditions

témoins. La teneur en violaxanthine apparaît toutefois inférieure chez Express par rapport à Saïda dans les trois conditions de régime hydrique testées. Ainsi, dans des conditions d'arrosage optimal, les plantes des deux variétés Saïda et Express affichent un contenu en violaxanthine de l'ordre de respectivement 260 et 170  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ , la différence entre les deux génotypes étant statistiquement significative (Figure 26 A).

En ce qui concerne l'anthéroxanthine, les plantes des deux génotypes présentent une teneur très faible et similaire dans des conditions témoins puisque ce pigment n'est pas détecté.

En condition de déficit hydrique, la quantité en anthéroxanthine augmente fortement chez les deux variétés, mais de façon beaucoup plus marquée et significative chez le génotype Express, où la teneur est deux fois plus élevée (106  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ) que chez Saïda (58  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ) (Figure 26 C). Dans les plantes réarrosées, ces quantités diminuent très significativement dans les deux variétés, avec toujours une différence entre les génotypes, le génotype Express présentant une quantité supérieure par rapport à Saïda (respectivement 18  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  et 9,9  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ).

Comme observé pour l'anthéroxanthine en condition de manque d'eau, le contenu en zéaxanthine est nettement plus élevé chez la variété Express par comparaison avec la variété Saïda (169 contre 52  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ). Il est à noter que ce pigment n'est pas détecté chez les plantes bien arrosées ou après réarrosage (Figure 26 B).



**Figure 26: Teneurs en violaxanthine, anthéroxanthine et zéaxanthine chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique**

Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Z : zéaxanthine ; A : anthéroxanthine ; V : violaxanthine.

Les mesures ont été effectuées en utilisant des disques (diamètre 0,6 cm) de feuilles jeunes bien développées avec trois essais indépendants au minimum par génotype et par traitement. Les dosages ont été effectués en utilisant une méthode HPLC.

Les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types provenant de quatre mesures indépendantes. \*\* et \*\*\*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec respectivement,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$

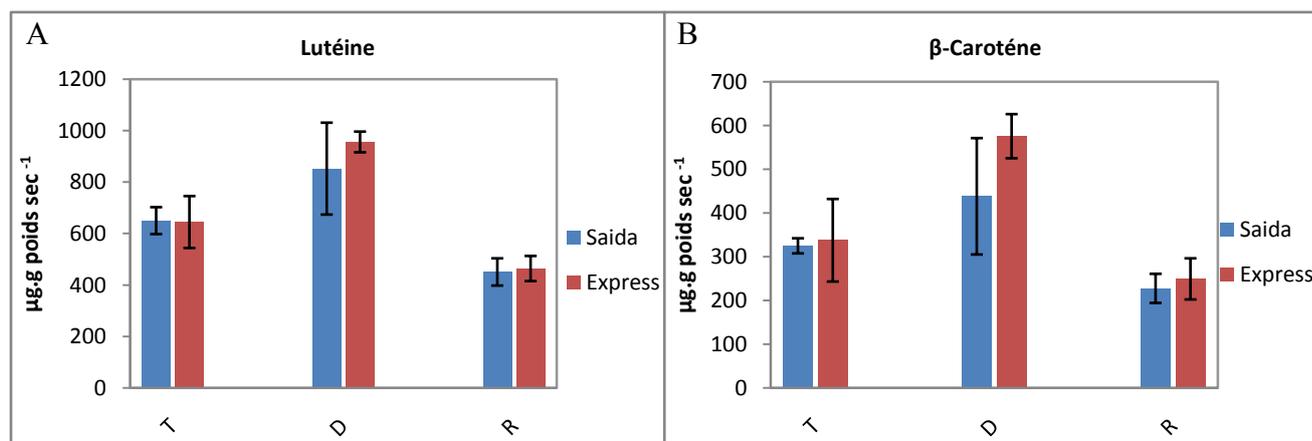
En conséquence, la proportion de xanthophylles photoprotecteurs (anthéroxanthine + zéaxanthine) / (anthéroxanthine + zéaxanthine + violaxanthine) est deux fois plus élevée chez la variété Express par rapport à Saïda lors d'un déficit hydrique, alors que les deux cultivars affichent des ratios beaucoup plus faibles et plus proches en condition d'arrosage optimal ou après réarrosage (Figure 26D).

Ensuite, nous avons analysé le contenu en lutéine, un caroténoïde de type xanthophylle très abondant dans les membranes thylacoïdienne végétales. Ce caroténoïde possède également des

fonctions protectrices en conditions environnementales générant un stress photooxydant (Havaux *et al.*, 2005). Chez les feuilles des variétés Saïda et Express, nous avons mesuré des teneurs en lutéine similaires de l'ordre de 650  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  dans des plantes témoins (Figure 27A).

Le déficit en eau entraîne une augmentation notable de la quantité de lutéine de l'ordre de 30% (852  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ) chez la variété Saïda et de 50% chez la variété Express (956  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ). Après réarrosage, les deux cultivars affichent une diminution de la teneur en lutéine similaire (à environ 460  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ). Cette teneur apparait nettement inférieure à celle mesurée dans les plantes témoins.

Nous avons également déterminé la teneur en  $\beta$ -carotène et observé une plus grande quantité de ce pigment en condition de déficit hydrique chez les deux variétés, avec un niveau plus élevé chez la variété Express (576  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ) par rapport à Saïda (438  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$ ) (Figure 27B). Après réarrosage, une quantité du  $\beta$ -carotène similaire a été mesurée dans les deux génotypes d'orge. Cette quantité est inférieure à celle relevée en condition témoin dans les deux génotypes



**Figure 27: Teneurs en lutéine et en  $\beta$ -carotène chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique**

Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Les mesures ont été effectuées en utilisant des disques (diamètre 0,6 cm) de feuilles jeunes bien développées provenant de trois essais indépendants au minimum par génotype et par traitement. Les dosages ont été effectués en utilisant une méthode HPLC.

### 1.2.3. Composition en tocophérols

L' $\alpha$ -tocophérol est un autre type d'antioxydant liposoluble, c'est la forme la plus abondante de la vitamine E et il est synthétisé exclusivement par les organismes photosynthétiques. Il est localisé

dans les membranes thylacoïdiennes où il joue un rôle essentiel dans les mécanismes de protection contre les dommages oxydants (Havaux *et al.*, 2005). Nous avons mesuré la teneur de ce composé ainsi que celle d'une forme mineure, le  $\gamma$ -tocophérol, chez les deux variétés d'orge.

Les deux variétés Saïda et Express montrent une quantité similaire de tocophérols dans des conditions d'arrosage optimal avec des valeurs de respectivement 350 et 8  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  pour les formes  $\alpha$  et  $\gamma$  chez les plantes témoins (Figures 28).

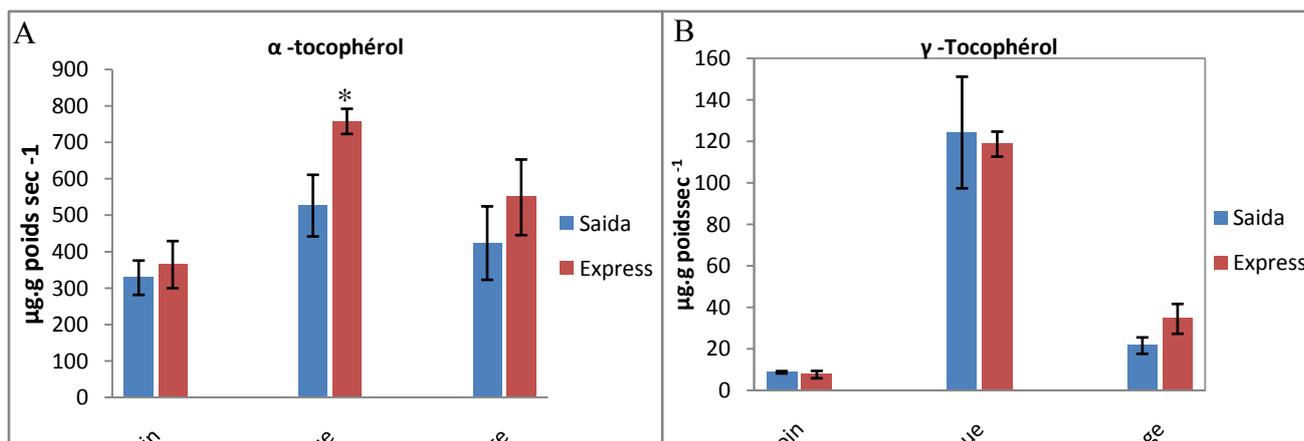
Pendant le déficit hydrique, une très forte augmentation est observée concernant le contenu en  $\gamma$ -tocophérol par rapport aux plantes témoins. Cette augmentation est d'environ respectivement 1300% chez le génotype Saïda et de 1450 % chez Express.

En condition de réarrosage, on enregistre une diminution très importante chez les deux variétés du contenu en  $\gamma$ -tocophérol (Figure 28B), mais la quantité de ce composé est toujours beaucoup plus élevée que celle mesurée en condition témoin pour les deux génotypes, elle passe de 124 à 21.7  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  (-82%) pour le génotype Saïda et de 119 à 34.6  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  (-70%) pour le génotype Express.

Aucune différence n'a donc été observée entre les deux génotypes durant les trois conditions de l'expérimentation pour ce type de tocophérol (Figure 28B).

La teneur en  $\alpha$ -tocophérol augmente de manière moins prononcée de 350 à 527 et 759  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  dans des feuilles de respectivement Saïda et Express, soit d'environ 50 et 120%. Ces valeurs révèlent une différence statistiquement significative entre les deux génotypes (Figure 28A ; Tableau 8).

Après réarrosage, le contenu en  $\alpha$ -tocophérol diminue, mais reste toujours à un niveau plus élevé par rapport aux plantes témoins, en particulier chez Express avec une quantité de 550  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  chez les plantes réhydratées contre 366  $\mu\text{g.g poids sec}^{-1}$  chez les plantes témoins. Ces données révèlent clairement une plus grande accumulation d' $\alpha$ -tocophérol dans la variété d'orge Express exposée à un déficit hydrique par comparaison à Saïda.



**Figure 28: Teneurs en α-tocophérol et γ-tocophérol chez les génotypes d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique.**

Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours. Les mesures ont été effectuées en utilisant des disques (diamètre 0,6 cm) de feuilles jeunes bien développées avec trois essais indépendants au minimum par génotype. Les dosages ont été effectués en utilisant une méthode HPLC.

Les données sont des valeurs moyennes ± écarts-types provenant de trois à quatre mesures indépendantes. \*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec  $p < 0,05$ .

En conclusion de ces dosages de chlorophylles et d'antioxydants lipophiles, nous n'avons pas observé de différences très marquées entre les deux génotypes d'orge en ce qui concerne les chlorophylles, excepté un ratio  $Chla/Chlb$  plus élevé et significativement différent en état de déficit hydrique chez Saïda par rapport à Express.

En revanche, les autres dosages d'antioxydants lipophiles (Tableau 8) ont révélé des différences marquées entre les deux cultivars avec des teneurs plus élevées chez Express. En particulier, les contenus en anthéroxanthine et en zéaxanthine sont très supérieurs chez ce génotype en condition de déficit hydrique et après réarrosage. Ainsi, le ratio  $(Z+A)/(V+A+Z)$  est nettement et significativement plus élevé chez Express que chez Saïda lors du déficit hydrique. De même, la concentration en α-tocophérol est plus élevée chez Express par rapport à Saïda dans des conditions de manque d'eau. Nos expériences montrent donc que pour la plupart des composés antioxydants liposolubles, la variété Express présente des teneurs supérieures par rapport à celles mesurées chez Saïda dans des conditions de manque d'eau, et parfois également après réarrosage.

**Tableau 8: Tableau récapitulatif des teneurs en chlorophylles, caroténoïdes et tocophérols ( $\mu\text{g}\cdot\text{g poids sec}^{-1}$ ) dans les tissus foliaires de plants d'orge des variétés Saïda et Express normalement arrosés, soumis à un déficit hydrique ou soumis à un déficit hydrique et réarrosés.**

	Saïda			Express		
	Témoin	Déficit hydrique	Réarrosage	Témoin	Déficit hydrique	Réarrosage
<b>Chl a</b>	8599 $\pm$ 752	6129 $\pm$ 1727	5177 $\pm$ 708	7929 $\pm$ 1031	6327 $\pm$ 887	5187 $\pm$ 742
<b>Chl b</b>	2916 $\pm$ 35	1911 $\pm$ 510	1721 $\pm$ 232	2615 $\pm$ 422	2405 $\pm$ 356	1696 $\pm$ 191
<b>Chl a/Chl b</b>	2.95 $\pm$ 0.10	3.21 $\pm$ 0.07	3.01 $\pm$ 0.08	3.03 $\pm$ 0.04	2.63 $\pm$ 0.12**	3.06 $\pm$ 0.10
<b>Violaxanthine</b>	252 $\pm$ 14	262 $\pm$ 48	200 $\pm$ 33	170 $\pm$ 21**	166 $\pm$ 47	170 $\pm$ 33
<b>Anthéroxanthine</b>	7.8 $\pm$ 2.8	58.3 $\pm$ 4.2	9.9 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 4.3	106 $\pm$ 16**	18.7 $\pm$ 2.7**
<b>Zéaxanthine</b>	n.d	52.1 $\pm$ 8.1	n.d	n.d	169 $\pm$ 6 ***	n.d
<b>(Z+A)/(V+A+Z)</b>	0.03 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.07	0.04 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.03	0.62 $\pm$ 0.07**	0.10 $\pm$ 0.03**
<b>Lutéine</b>	650 $\pm$ 52	852 $\pm$ 179	451 $\pm$ 53	645 $\pm$ 101	956 $\pm$ 40	464 $\pm$ 49
<b><math>\beta</math>-Carotène</b>	325 $\pm$ 17	438 $\pm$ 133	228 $\pm$ 33	338 $\pm$ 94	576 $\pm$ 50	249 $\pm$ 47
<b><math>\alpha</math>-Tocophérol</b>	330 $\pm$ 47	527 $\pm$ 85	425 $\pm$ 101	366 $\pm$ 65	759 $\pm$ 35*	550 $\pm$ 104
<b><math>\gamma</math>-Tocophérol</b>	8.84 $\pm$ 0.56	124 $\pm$ 27	21.7 $\pm$ 4.0	7.72 $\pm$ 1.79	119 $\pm$ 6	34.6 $\pm$ 7.2

Les expériences ont été effectuées en utilisant des disques d'un diamètre de 0.6 cm de feuilles jeunes bien développées et les dosages ont été effectués en utilisant des méthodes HPLC. Les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  écart écart provenant de trois à quatre mesures indépendantes. \*, \*\* et \*\*\*, la valeur chez Express est significativement différente de la valeur mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec respectivement  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  (test t). n.d., non détecté. Témoin: plantes bien arrosées pendant 23 jours; déficit hydrique : après 15 jours de semis les plantes sont soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; réarrosage: après le déficit hydrique, les plantes stressées sont arrosées pendant 3 jours. Chl, chlorophylle; A, anthéroxanthine V, violaxanthine, Z, zéaxanthine.

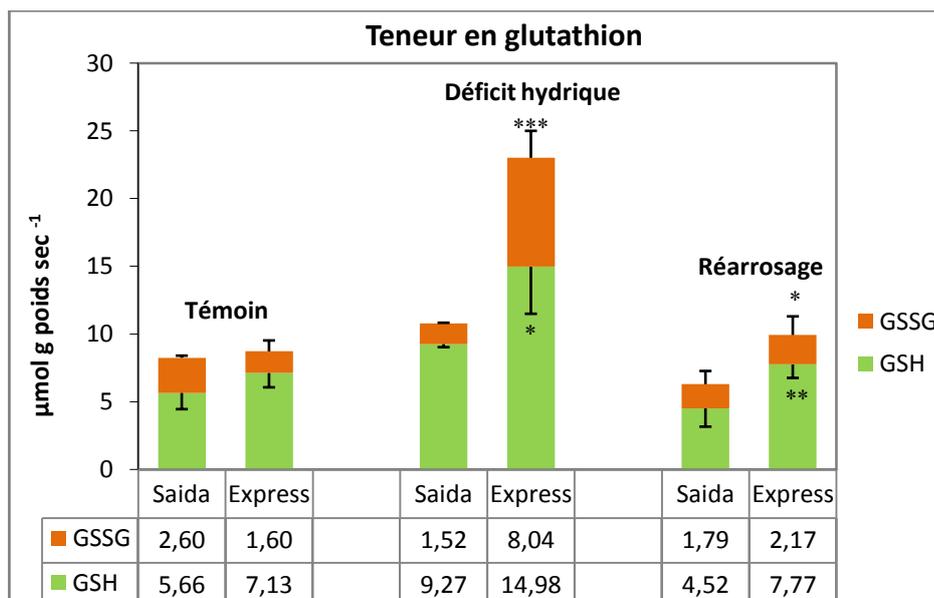
### 1.3. Contenu en glutathion

Le glutathion est une molécule soluble de bas poids moléculaire présentant des propriétés antioxydantes. C'est un composé très abondant qui remplit des rôles majeurs dans le métabolisme cellulaire de tous les organismes vivants (Noctor et Foyer, 1998). Le glutathion est un tripeptide présentant un thiol lui conférant des propriétés réductrices. Il est présent sous deux formes : réduite, GSH, et oxydée GSSG. La forme oxydée comprend deux molécules de glutathion reliées par un pont disulfure. Chez les jeunes feuilles de plantes témoins bien arrosées des variétés Express et Saïda, une quantité totale de glutathion (réduit + oxydé) de l'ordre de  $8,5 \mu\text{mol. g poids sec}^{-1}$  a été mesurée dans les deux génotypes, mais avec une proportion différente de glutathion oxydé (GSSG), 30% chez Saïda et 20% chez Express (Figure 29).

Après une période de déficit hydrique appliqué pendant 8 jours, une légère augmentation de la quantité de glutathion total a été remarquée dans les feuilles de la variété locale Saïda, ceci avec une baisse de la proportion de la forme oxydée de 30 à 15%. En revanche, une augmentation très marquée de la concentration en glutathion a été observée dans les feuilles de la variété Express (à plus de  $23 \mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ) avec une proportion plus élevée de GSSG (supérieure à 35%) par rapport à des plantes témoins (20%) et par rapport à la variété Saïda (15%) en l'absence d'arrosage (15%) (Figure 29).

Après réarrosage des plantes, la teneur totale en glutathion diminue chez les deux variétés d'orge, avec des proportions de forme oxydée proches de celles mesurées chez les plantes témoins.

Néanmoins, les plantes réarrosées de la variété Express montrent encore une teneur supérieure en glutathion total par rapport à celles de la variété Saïda (respectivement,  $10,9$  et  $6,3 \mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ).



**Figure 29: Teneur en glutathion chez les génotypes d’orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique.**

Témoïn: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l’arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours. Les mesures ont été effectuées en utilisant des disques de feuilles jeunes bien développées (diamètre 0,6 cm) avec trois essais indépendants par génotype et par traitement. Les dosages ont été effectués en utilisant une méthode HPLC. Les données sont des valeurs moyennes ± écarts-types provenant de trois mesures indépendantes. \*, \*\* et \*\*\*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec respectivement  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

#### 1.4. Contenu en ascorbate

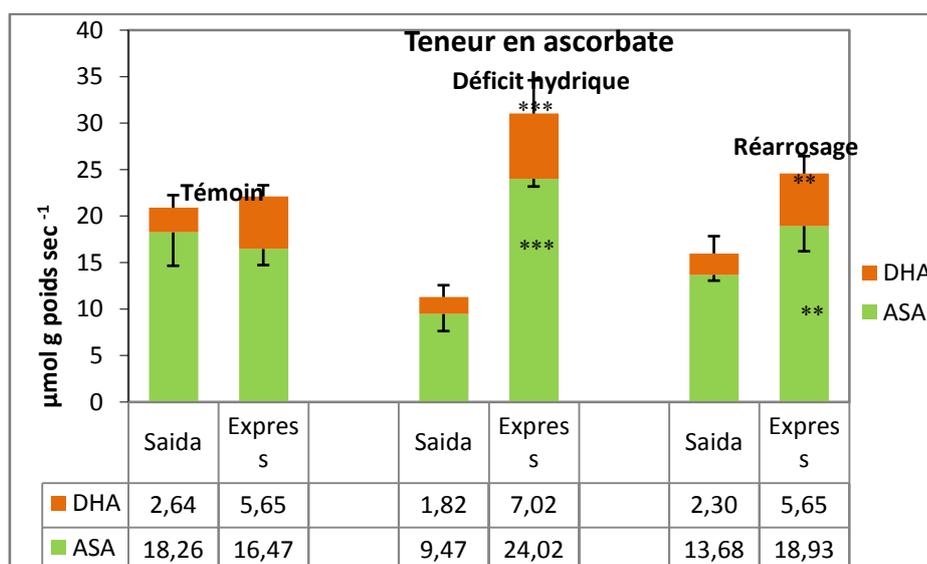
L’ascorbate est l’autre antioxydant majeur soluble de bas poids moléculaire dans tous les organismes vivants. C’est un composé qui est métaboliquement lié au glutathion (Noctor et Foyer, 1998). Nous avons mesuré le contenu en ascorbate à partir d’échantillons prélevés sur les mêmes plantes que celles utilisées pour les analyses de glutathion. Ce composé est présent sous deux formes : réduite, ASC (acide ascorbique), et oxydée DHA (déhydroascorbate). Dans des feuilles jeunes bien développées des deux variétés d’orge, une teneur totale en ascorbate (ASC + DHA) similaire a été enregistrée dans des conditions d’arrosage optimal avec une concentration de l’ordre de  $21,5 \text{ nmol.g poids sec}^{-1}$ , mais avec un taux d’oxydation (DHA) supérieur chez la variété Express (25%) par rapport à la variété Saïda (12%) (Figure 30).

En condition de déficit hydrique, on note une diminution de près de 50% de la teneur totale en ascorbate (ASC + DHA) chez la variété Saïda, à une valeur de 11,29  $\mu\text{mol g poids sec}^{-1}$ , contre 20,90  $\mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$  chez les plantes témoins de ce génotype.

La quantité de la forme oxydée, le déshydroascorbate (DHA), est légèrement diminuée dans ce génotype en état de déficit hydrique (1,82  $\mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ) par rapport aux conditions témoins (2,64) (Figure 30).

En revanche, chez les plantes stressées de la variété Express, un contenu en ascorbate total fortement augmenté (31  $\mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ) a été mesuré avec une proportion de forme oxydée comparable à celle relevée dans les plantes témoins (de l'ordre de 25%).

Le réarrosage des plantes entraîne une augmentation de la teneur en ascorbate total (ASC+DHA) dans les plantes Saïda (15,99  $\mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ) par rapport aux conditions du déficit hydrique (11,29  $\mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ).



**Figure 30: Teneur en ascorbate chez les génotypes d’orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique.**

Témoins: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l’arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Les mesures ont été effectuées en utilisant des disques (diamètre 0,6 cm) de feuilles jeunes bien développées avec trois essais indépendants par génotype et par traitement. Les dosages ont été effectués en utilisant une méthode HPLC.

Les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types provenant de trois mesures indépendantes. \*\* et \*\*\*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec respectivement  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$ .

La teneur en forme oxydé (DHA) chez le génotype Saïda mesurée ( $2,30 \mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ) dans ces conditions reste inférieure à celle relevée chez les plantes témoins ( $2,64 \mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ), mais est toujours supérieure à celle notée en condition de déficit hydrique ( $1,82 \mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$ ).

En revanche, les plantes du génotype Express montrent une diminution dans la teneur en ascorbate total après réarrosage avec une teneur de l'ordre de  $25 \mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$  contre  $31,22$  chez les plantes soumises au déficit hydrique (Figure 30). Les teneurs en ascorbate alors observées sont assez proches de celles observées en condition témoin.

En conclusion, ces données révèlent un comportement différent en ce qui concerne les contenus en glutathion et en ascorbate des variétés Saïda et Express en conditions de déficit hydrique et après réarrosage. Pour les deux composés, la variété Express présente, par rapport à Saïda, un contenu total et un taux d'oxydation beaucoup plus élevés lors d'un manque d'eau.

### 1.5. Décomposition du peroxyde d'hydrogène et activité catalase

L'activité des systèmes enzymatiques de décomposition du peroxyde d'hydrogène,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dans les extraits de feuilles a été évaluée par spectrophotométrie en suivant la diminution de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  à  $240 \text{ nm}$  dans un tampon auquel on ajoute des extraits de feuilles contenant les protéines solubles végétales et de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  exogène. Il est à noter que le taux de décomposition du  $\text{H}_2\text{O}_2$  mesuré à l'aide de cette méthode provient principalement de l'activité catalase, CAT, comme l'ont montré Quéval *et al.* (2007) en utilisant cette procédure pour la caractérisation de mutants d'*Arabidopsis* déficients pour l'expression de gènes codant pour la catalase.

Les essais réalisés ont montré que chez les plantes témoins, la variété Express affiche un niveau significativement plus élevé d'activité de décomposition de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  par rapport à la variété Saïda avec des valeurs significativement différentes de respectivement  $175$  et  $130 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Figure 31A).

Dans des conditions de manque d'eau, des résultats inverses ont été notés avec une forte augmentation de l'activité chez la variété Saïda (à près de  $200 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ), alors que cette activité de décomposition diminue légèrement chez la variété Express (à  $150 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (Figure 31A).

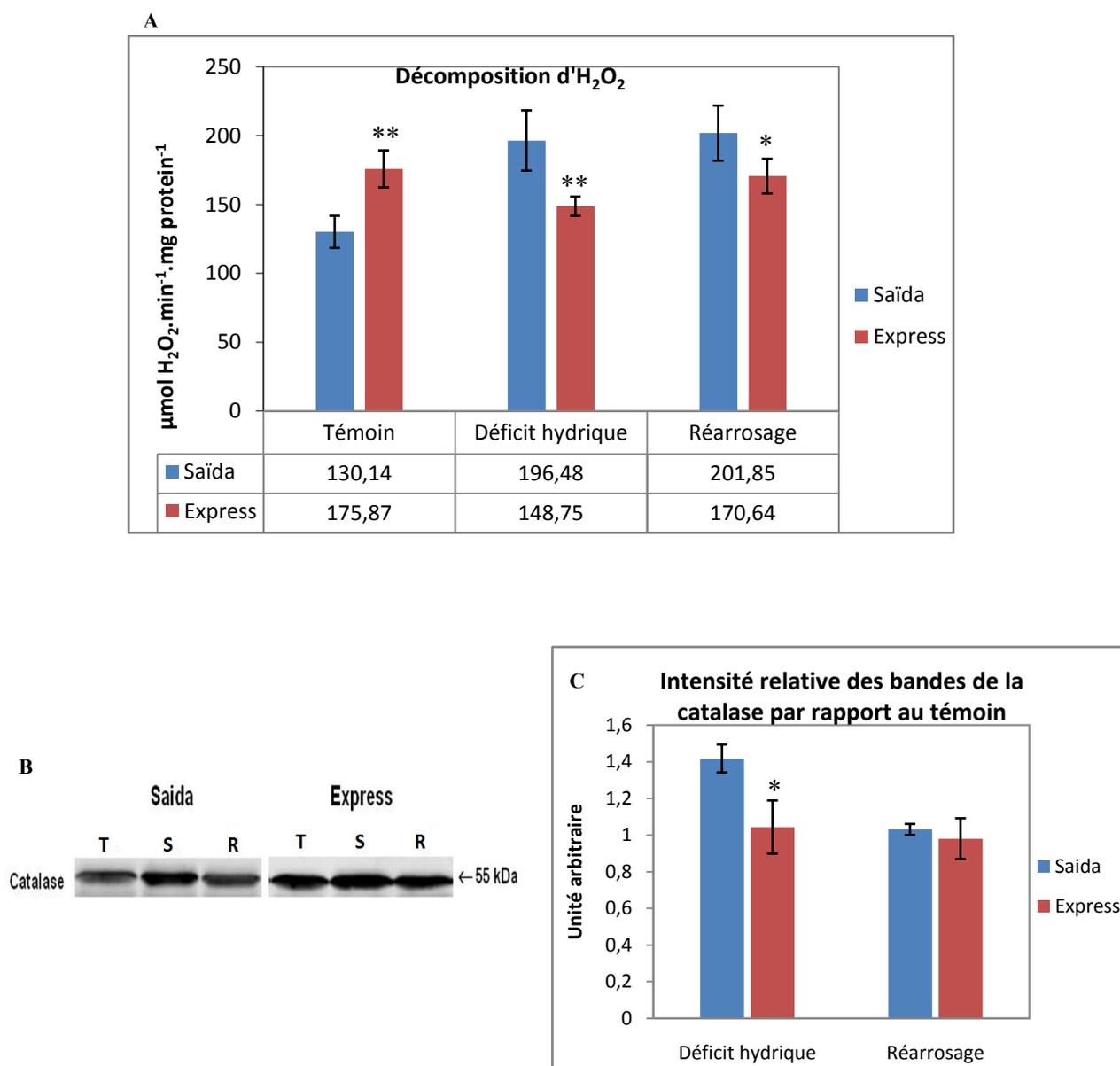
Après réarrosage, la capacité de décomposition du peroxyde d'hydrogène ne varie pas sensiblement chez les deux variétés par rapport aux conditions de déficit hydrique, à l'exception d'une légère augmentation chez la variété Express (Figure 31A).

Nous avons ensuite étudié l'abondance de la catalase, CAT, dans les feuilles d'orge par analyse de type Western blot, en utilisant un anticorps généré contre la protéine d'*Arabidopsis* qui révèle spécifiquement la protéine vers 50 kDa dans les échantillons d'orge.

Nous n'avons pas observé de changement dans la quantité de la protéine CAT chez les plantes de la variété Express stressées et réarrosées par rapport aux conditions hydriques optimales (Figure 31, B et C).

Chez les plantes Saïda, une augmentation notable (d'environ 40%) dans l'abondance de la protéine CAT a été observée au cours de la période sans arrosage et aucune variation notable n'a été notée après réarrosage par rapport aux conditions témoins (Figure 31, B et C).

Ces données révèlent une réponse différentielle des deux variétés, puisque la capacité de décomposition d' $H_2O_2$  et l'abondance de la CAT sont augmentées chez la variété locale Saïda en condition de déficit hydrique, alors qu'aucun changement notable n'est enregistré chez Express dans les mêmes conditions. L'ensemble de ces données, ainsi que le fait que l'activité de décomposition du peroxyde d'hydrogène dans les extraits végétaux provient essentiellement de la catalase (Quéval *et al.*, 2007), indiquent que l'activité de cette enzyme est très probablement stimulée en période de déficit hydrique chez le cultivar Saïda.



**Figure 31: Activité de décomposition du peroxide d'hydrogène et abondance de la catalase dans des feuilles de deux variétés d'orge, Saïda et Express, dans différentes conditions de régime hydrique.**

(A) Les mesures de l'activité de décomposition d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été réalisées par spectrophotométrie comme décrit dans "Matériels et méthodes" en utilisant des extraits de feuilles jeunes bien développées. Les valeurs présentées proviennent de trois essais indépendants par génotype et par traitement. Les données sont des valeurs moyennes ± écarts-types de ces trois mesures.

(B) Analyse par immunodétection sur membrane de l'abondance de la catalase dans les protéines solubles de feuilles d'orge (20 µg par piste) séparées par SDS-PAGE. La dilution du sérum et les procédures de révélation sont décrites dans "Matériels et méthodes". Des résultats similaires ont été obtenus sur trois essais indépendants par génotype et par traitement.

T, témoin : plantes bien arrosées pendant 23 jours. S, déficit hydrique appliqué sur des plantes de 15 jours (stade 4 feuilles) pendant 8 jours R, plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

(C) Quantification de l'intensité des bandes révélées par l'anticorps dirigé contre la catalase à partir des données d'immunodétection en utilisant l'outil d'analyse du logiciel Odyssey Licor.

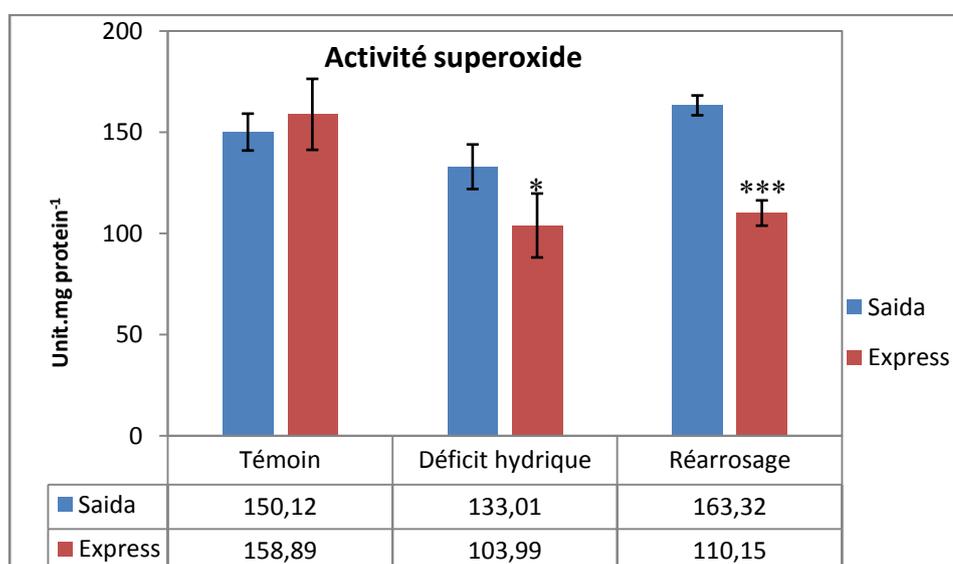
Les données sont des valeurs moyennes ± écarts-types provenant de trois à quatre mesures indépendantes. \* et \*\*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec respectivement  $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ .

## 1.6. Activité superoxyde dismutase

### 1.6.1. Mesure par spectrophotométrie

L'activité SOD des extraits de feuilles a été mesurée par spectrophotométrie en utilisant le système xanthine/xanthine oxydase pour générer du superoxyde et en suivant la vitesse de réduction du cytochrome *c* à 550 nm (cf. Matériels et Méthodes 2.7.1). Dans les feuilles de la variété Saïda, aucune modification marquée n'a été observée dans le niveau d'activité SOD en fonction du régime hydrique, une activité de l'ordre de 150 units.mg prot<sup>-1</sup> étant mesurée chez les plantes témoins, stressées et réarrosées (Figure 32).

En revanche, dans les feuilles de la variété Express, si une activité SOD tout à fait comparable à celle déterminée chez Saïda a été enregistrée dans des conditions témoins, cette activité diminue très sensiblement à un niveau de l'ordre de 100 units.mg prot<sup>-1</sup> en condition de déficit hydrique et après réarrosage. Ces valeurs sont alors nettement et significativement inférieures à celles mesurées chez Saïda (Figure 32).



**Figure 32: Activité superoxyde dismutase chez les génotypes d'orge Saïda et Express dans différentes conditions de régime hydrique**

Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Les mesures de l'activité ont été réalisées par spectrophotométrie en utilisant des extraits de feuilles jeunes bien développées. Les valeurs présentées proviennent de trois essais indépendants par génotype et par traitement. Les données sont des valeurs moyennes ± écarts-types provenant de trois mesures indépendantes. \* et \*\*\*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec respectivement p <0,05 et p <0,001.

Ces données montrent que l'activité enzymatique de type superoxyde dismutase est maintenue chez la variété locale Saïda en condition de déficit hydrique et après réarrosage alors qu'elle est sensiblement réduite chez la variété Express dans ces mêmes conditions.

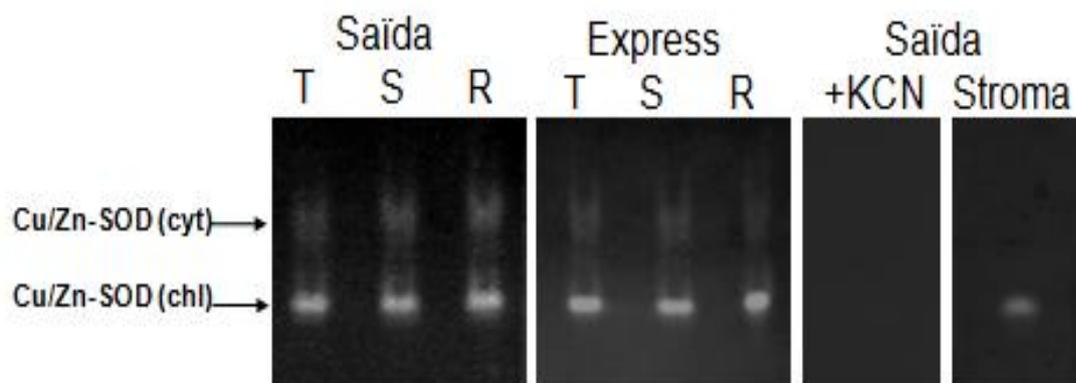
### 1.6.2. Séparation des isoformes SOD par électrophorèse

Pour compléter les mesures de l'activité de type SOD, les différentes isoenzymes de cette protéine ont été visualisées dans des gels d'électrophorèse en conditions natives, pour ne pas dénaturer les complexes et ainsi préserver l'activité enzymatique, en utilisant une méthode photochimique décrite dans la partie Matériels et Méthodes (cf. 2.7.2).

Chez les deux variétés, deux bandes principales ont été révélées et attribuées à l'isoenzyme Cu/ZnSOD (Figure 33). Ces deux bandes disparaissent en effet lorsque les gels sont traités avec du KCN, un inhibiteur spécifique de ce type de SOD (Beauchamp et Fridovich, 1971).

En utilisant des protéines solubles de chloroplastes purifiés à partir de feuilles de plantes d'orge bien arrosées, nous avons identifié la bande Cu/ZnSOD localisée dans les chloroplastes (Figure 33). Cette bande se situe dans la partie basse du gel et migre donc plus rapidement en conditions natives. Cette forme plastidiale plus abondante migre plus loin dans le gel et correspond donc très probablement à un complexe de plus petite taille par rapport à la forme minoritaire cytosolique qui reste dans la partie supérieure du gel.

En se basant sur les données de quantification de l'intensité des deux bandes révélées dans le gel, l'intensité de l'activité SOD apparaît 20% plus intense chez la variété Saïda lors du déficit hydrique par rapport aux conditions optimales d'arrosage alors que chez Express la différence est moins marquée entre ces deux régimes hydriques. Plus précisément la bande Cu/ZnSOD (cytosolique) paraît plus abondante lors du déficit hydrique et après réarrosage chez Saïda. Cette bande est beaucoup moins visible chez Express dans ces mêmes conditions (Figures 33 et 34).

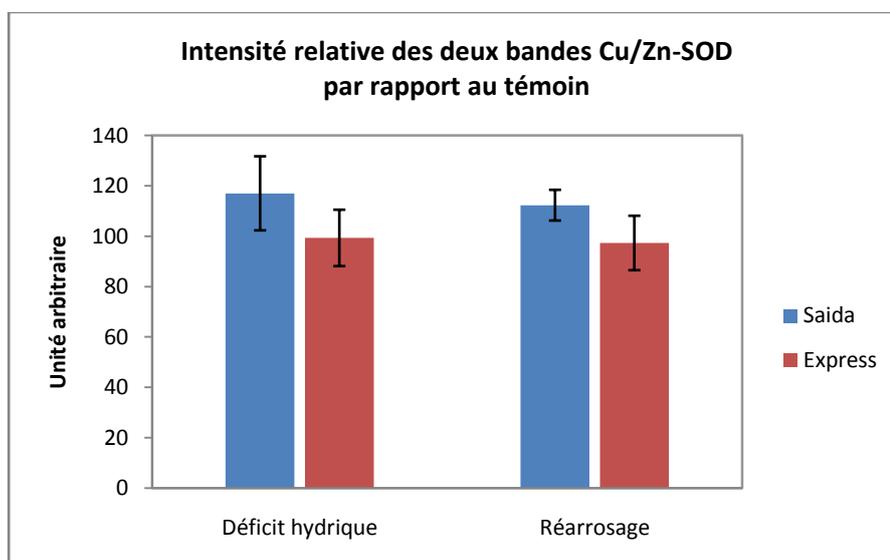


**Figure 33: Analyse de l'activité des isoenzymes de la SOD sur gel à partir d'extraits de feuilles de deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises à différentes conditions de régime hydrique**

T : plantes témoins arrosées pendant 23 jours; S : plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; R : plantes soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours et réarrosées pendant 3 jours.

Cu/Zn-SOD (cyt) : superoxyde dismutase à cuivre et zinc localisée au niveau du cytosol

Cu/Zn-SOD (chl) : superoxyde dismutase à cuivre et zinc localisée au niveau du chloroplaste



**Figure 34: Intensité relative par rapport au témoin des deux bandes SOD révélées sur gel à partir d'extraits de feuilles de deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises au déficit hydrique et au réarrosage.**

Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Quantification des bandes d'activité SOD à partir des données des gels natifs en utilisant l'outil d'analyse du logiciel G:BOX (Syngene). Les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types provenant de trois à quatre essais indépendants.

---

## 1.7. Contenu en oxydoréductases à thiol et activité méthionine sulfoxyde réductase (MSR)

---

### 1.7.1. Contenu en oxydoréductases à thiol

Au cours des dernières années, de nombreux travaux ont montré le rôle essentiel des oxydoréductases à thiol dans la réponse des plantes au stress oxydant généré par des contraintes environnementales (Vieira Dos Santos et Rey, 2006). Ces enzymes fonctionnent grâce à des cystéines rédox actives capables notamment de transférer du pouvoir réducteur à différents types de cibles.

Nous avons analysé par immunodétection sur membrane l'abondance de peroxirédoxines, Prx, plastidiales (2-Cys Prx, PrxQ et Prx IIE) et méthionine sulfoxyde réductases (MSRA4, MSRB1 et MSRB2) dans les feuilles d'orge des deux variétés. Ces deux types d'enzymes sont impliqués dans respectivement la détoxification des peroxydes d'hydrogène et organiques et la réparation des protéines oxydées au niveau de la méthionine.

#### 1.7.1.1. Abondance des peroxirédoxines (Prx)

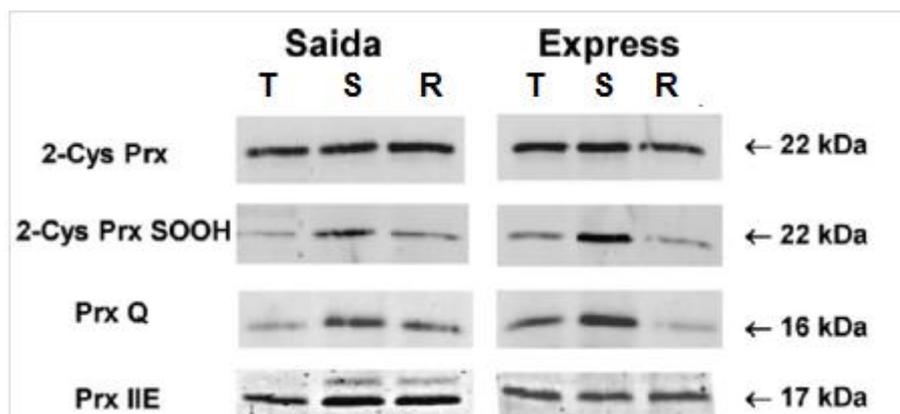
Nous avons tout d'abord analysé la quantité et l'état rédox des Prx plastidiales : 2-Cys-Prx, PrxQ et PrxIIE, qui constituent les isoformes les plus abondantes dans les cellules végétales. Des anticorps dirigés contre les Prx d'Arabidopsis et de peuplier ont révélé spécifiquement des bandes avec des masses moléculaires attendues dans les extraits de protéines d'orge (Figure 35).

Chez les plantes soumises à un déficit hydrique ou soumises à cette contrainte, puis réarrosées, aucun changement significatif pour l'abondance de 2-Cys Prx et de PrxIIE n'a été observé par rapport aux plantes témoins chez les deux variétés (Figure 35).

En revanche, une augmentation de la quantité de PrxQ a été notée chez les deux variétés en condition de déficit hydrique, avec une quantité de protéine supérieure chez Express par rapport à Saïda. Dans les plantes réarrosées, nous avons remarqué une forte réduction de la quantité de PrxQ chez la variété Express, alors que cette protéine reste relativement plus abondante chez Saïda (Figure 35).

Nous avons également utilisé un sérum dirigé contre la forme de 2-Cys Prx suroxydée, qui pourrait jouer un rôle essentiel dans les processus de signalisation liés à des conditions de stress

oxydant (Rey *et al.*, 2007). Nous avons observé une augmentation de l'abondance de la 2-Cys Prx suroxydée dans les deux génotypes d'orge soumis à un déficit hydrique. La quantité de protéine oxydée apparaît toutefois supérieure chez Express. Dans les deux génotypes, une baisse marquée de la quantité de cette forme de Prx, jusqu'au niveau observé dans les plantes témoins, est notée après réarrosage (Figure 35).



**Figure 35: Analyse de l'abondance foliaire des Prx plastidiales par Western blot chez deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises à différents conditions de régime hydrique.**

L'analyse Western a été réalisée en utilisant des protéines solubles de feuilles (20µg par puits pour PrxQ et Prx IIE et 10µg par puits pour 2-Cys Prx et 2-CysPrxSOOH) séparées par SDS-PAGE. Les dilutions de sérums et les procédures de révélation sont décrites dans "Matériels et méthodes (3.4.2)". Des résultats similaires ont été obtenus dans trois essais indépendants.

T: plantes témoins bien arrosées pendant 23 jours; S, après 15 jours, les plantes sont soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours ; R: après la période de déficit hydrique, les plantes stressées sont réarrosées pendant 3 jours.

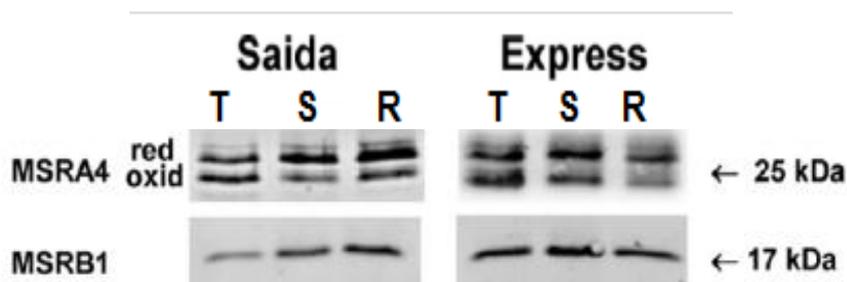
En conclusion, on peut dire qu'il y a une certaine différence entre les deux génotypes pour la forme oxydée de 2-Cys Prx (cystéine sufinique ou SOOH) et pour Prx Q avec la présence de quantités plus importantes pour ces deux formes en condition de déficit hydrique chez le génotype sensible Express par rapport à Saïda.

#### 1.7.1.2. Abondance et activité des méthionine sulfoxyde réductases (MSR)

##### A. Abondance des MSR

Des immunodétections ont également été réalisées pour étudier les quantités de trois isoformes de MSR plastidiales qui représentent l'essentiel de la capacité MSR cellulaire (Laugier *et al.*, 2010 ;

2013). Les anticorps dirigés contre les protéines MSRB1 et MSRA4 du peuplier ont clairement reconnu des bandes spécifiques à respectivement environ 17 et 25 kDa, dans les protéines des deux variétés d'orge (Figure 36). En revanche, en ce qui concerne le sérum dirigé contre MSRB2 d'Arabidopsis, aucun signal non ambigu n'a été détecté chez l'orge (données non présentées) du fait peut-être d'un manque de réactivité du sérum généré chez Arabidopsis contre les isoformes de MSRB2 chez les céréales.



**Figure 36 : Analyse de l'abondance foliaire des MSRs plastidiales par Western blot dans les deux variétés d'orge, Saïda et Express, soumises à différents conditions de régime hydrique**

L'analyse Western a été réalisée en utilisant des protéines solubles de feuilles (20 µg par puits pour MSRA4 et MSRB1) séparées par SDS-PAGE. Les dilutions de sérums et les procédures de révélation sont décrites dans "Matériels et méthodes 3.4.2.". Des résultats similaires ont été obtenus dans trois essais indépendants.

T: plantes témoins bien arrosées pendant 23 jours; S, après 15 jours, les plantes sont soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours ; R: après la période de déficit hydrique, les plantes stressées sont réarrosées pendant 3 jours.

Pour le type MSRA, il est à noter que comme chez Arabidopsis (Vieira Dos Santos *et al.*, 2005), deux bandes correspondant aux formes réduites et oxydées de MSRA4, sont révélées dans les extraits d'orge, la forme réduite étant celle migrant le plus lentement. Pour cette protéine, une intensité similaire des deux bandes protéiques est observée dans les plantes témoins bien arrosées des deux génotypes (Figure 36).

En condition de déficit hydrique et après réarrosage, la forme réduite de MSRA4 est relativement plus abondante par comparaison aux plantes témoins, en particulier dans les feuilles de la variété Saïda.

Globalement, on n'observe pas de changement marqué dans la quantité totale (réduite + oxydée) de l'isoforme MSRA chez les deux génotypes d'orge dans les différents régimes hydriques analysés (Figure 36).

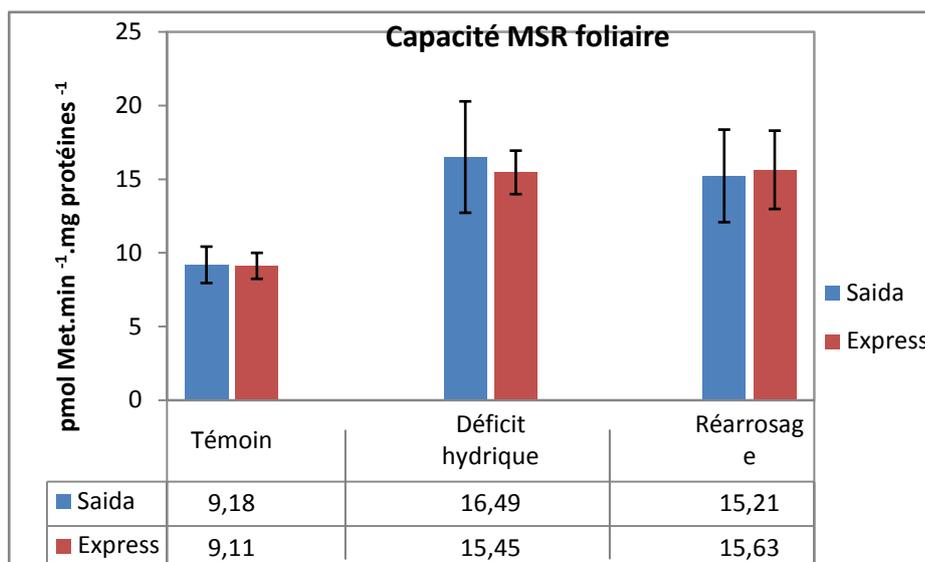
En ce qui concerne MSRB1, une quantité plus élevée en protéine a été observée en conditions de déficit hydrique et de réarrosage chez les plantes Saïda, alors qu'aucun changement substantiel n'a été remarqué dans les extraits de feuilles de la variété Express lors des mêmes traitements.

### B. Quantification de l'activité MSR par HPLC

Nous avons mesuré l'activité totale ou capacité des MSR dans les extraits de feuilles d'orge par une méthode HPLC en utilisant le dabsyl méthionine sulfoxyde (dabsyl-MetO), un substrat des MSR mimant la MetO liée dans des peptides et couplée à un groupement coloré (le dabsyl) permettant sa détection par absorption. Dans les deux génotypes cultivés dans des conditions contrôles, une activité légèrement inférieure à  $10 \text{ pmol Met.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$  a été enregistrée (Figure 37). Il est à noter que cette valeur est relativement faible en comparaison avec celle rapportée chez *Arabidopsis*, qui est de l'ordre de  $50 \text{ pmol Met.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$  (Laugier *et al.*, 2010).

En condition de déficit hydrique, le niveau d'activité MSR augmente sensiblement à une valeur de  $16 \text{ pmol Met. mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , ceci de façon similaire chez les deux génotypes d'orge (Figure 37). Après réarrosage, les plantes des deux génotypes présentent une stabilité de l'activité MSR par rapport aux conditions de déficit hydrique.

En conclusion, les données obtenues sur la quantité et/ou l'activité des différents types étudiés de reductases à thiols ne montrent pas de différences notables entre les plantes des variétés Saïda et Express soumises à un déficit hydrique, exceptés, en condition de manque d'eau, où une certaine augmentation de la quantité de protéine MSRB1 chez Saïda et des niveaux plus élevés de Prx Q et de 2-Cys Prx suroxydée chez Express ont été observés.



**Figure 37: Activité MSR dans des extraits de feuilles de deux variétés d’orge, Saïda et Express, soumises à différentes conditions de régime hydrique**

Témoin: plantes arrosées pendant 23 jours; Déficit hydrique: plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l’arrosage pendant 8 jours; Réarrosage: plantes stressées réarrosées pendant 3 jours. Les mesures ont été effectuées en utilisant des feuilles jeunes bien développées provenant de trois essais indépendants par génotype et par traitement. Les dosages ont été effectués en utilisant une méthode HPLC.

## 1.8. Mesures du niveau de peroxydation lipidique

Suite aux essais précédents qui ont révélé des modifications dans les contenus en antioxydants et dans les activités enzymatiques des deux génotypes en fonction du régime hydrique, nous avons entrepris de mesurer le degré de peroxydation des lipides, macromolécules très sensibles aux processus d’oxydation. Dans ce but, deux méthodes de mesure par HPLC et par imagerie par capture de la luminescence ont été utilisées.

### 1.8.1. Quantification des différents hydroxy acides gras par dosage HPLC

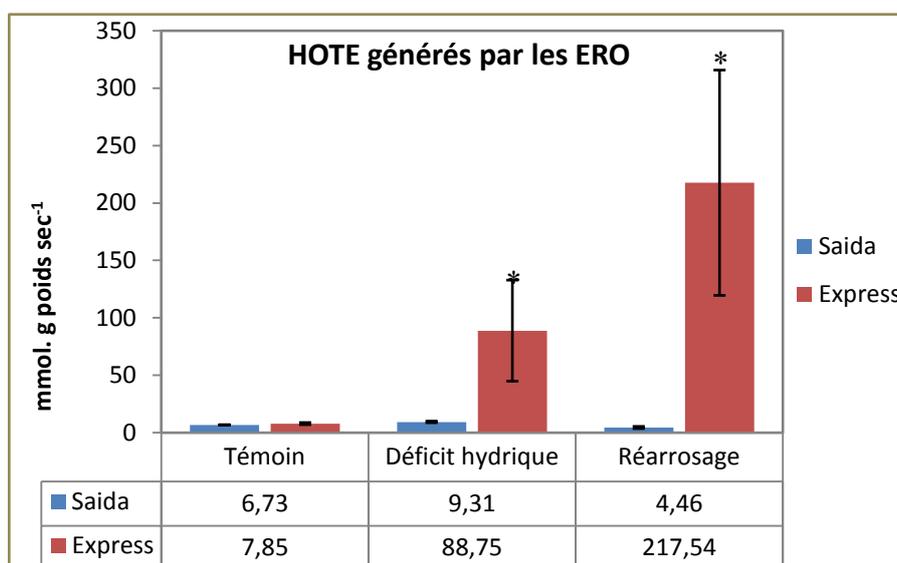
Nous avons effectué des mesures par HPLC du niveau de peroxydation lipidique générée soit par des mécanismes non enzymatiques dépendant des ERO, soit par le système enzymatique lié aux lipoxygénases.

Par HPLC, nous avons tout d’abord déterminé les quantités d’hydroperoxydes lipidiques (HOTE) qui sont des marqueurs de l’homéostasie rédox. Les plantes témoins des deux génotypes d’orge,

Saïda et Express, affichent des niveaux très faibles et similaires d'hydroperoxydes lipidiques générés par les ERO (Figure 38).

En condition de manque d'eau, le niveau en HOTE ne varie que très légèrement chez la variété Saïda par rapport aux conditions optimales de croissance. En revanche, chez la variété Express, on enregistre une très forte augmentation de la quantité en HOTE dans les plantes soumises au déficit hydrique (d'un facteur 20 par rapport aux plantes témoins) (Figure 38).

Après réarrosage, on observe également un niveau de peroxydation lipidique induite par les ERO très nettement supérieur chez la variété Express par rapport aux conditions contrôles (x 50) et par rapport à Saïda qui présente toujours des niveaux très bas et stables (Figure 38). Il est à noter une certaine hétérogénéité dans les valeurs mesurées chez Express.



**Figure 38: Teneur en hydroperoxydes de lipides (HOTE) générés par des ERO chez les deux génotypes d'orge, Saïda et Express, soumis à différentes conditions de régime hydrique.**

Témoïn : plantes arrosées pendant 23 jours ; Déficit hydrique : plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours ; Réarrosage : plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

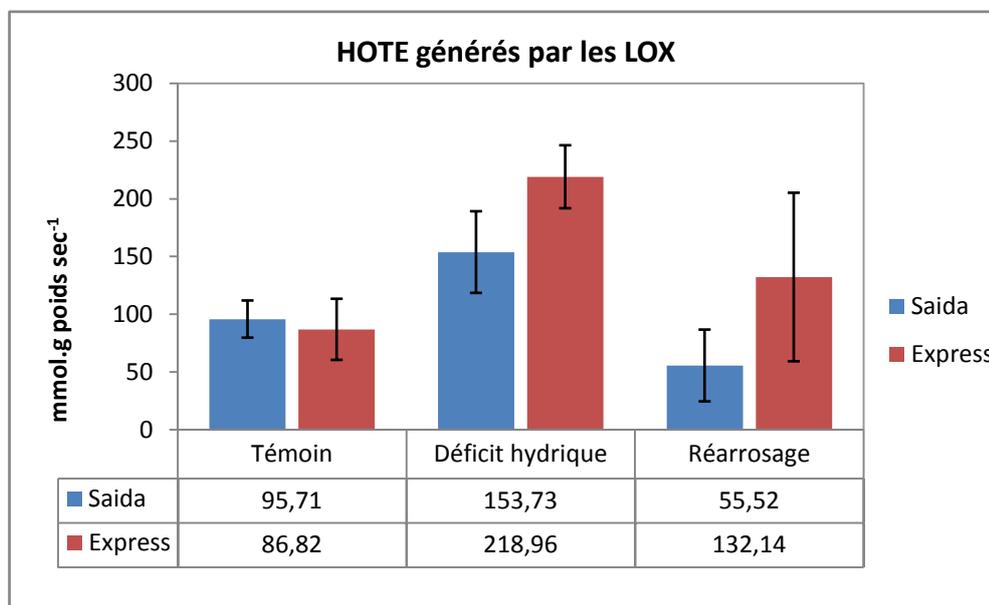
Les mesures ont été effectuées, à partir d'1g de feuilles jeunes bien développées avec trois essais indépendants au minimum par génotype et par traitement, en utilisant une méthode HPLC.

Les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types provenant de trois à quatre mesures indépendantes. \*, la valeur mesurée chez Express est significativement différente de celle mesurée chez Saïda dans les mêmes conditions avec  $p < 0,05$ .

En parallèle, nous avons mesuré le niveau de peroxydation lipidique provoquée par l'activité des lipoxygénases (LOX), qui pourraient participer à des processus de signalisation du stress oxydant par

la génération de molécules participant à ces mécanismes et issues de la dégradation des macromolécules lipidiques (op den Camp *et al.*, 2003).

En condition d'arrosage optimal, les géotypes Saïda et Express présentent un contenu similaire en HOTE induits par les LOX et inférieur à 100 nmol.g poids sec<sup>-1</sup> (Figure 39).



**Figure 39: Teneur en hydroperoxydes de lipides générés par des LOX chez les deux géotypes d'orge, Saïda et Express, soumis à différentes conditions de régime hydrique.**

Témoin : plantes arrosées pendant 23 jours ; Déficit hydrique : plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours ; Réarrosage : plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

Les mesures ont été effectuées, à partir d'1g de feuilles jeunes bien développées avec trois essais indépendants au minimum par géotype et par traitement, en utilisant une méthode HPLC. Les données sont des valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types provenant de trois à quatre mesures indépendantes.

Lors d'un déficit hydrique, une augmentation du contenu en HOTE provenant de l'activité des LOX se produit chez les deux variétés, mais de façon plus marquée chez la variété Express par rapport à Saïda avec respectivement environ 220 et 150 nmol.g poids sec<sup>-1</sup> (Figure 39).

Après réarrosage, une diminution de la teneur en ces composés est observée chez les deux variétés. Cette diminution est beaucoup plus accentuée chez Saïda avec une teneur en HOTE qui revient à environ 55 nmol g poids sec<sup>-1</sup> contre 132 pour Express.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il y a une différence génotypique concernant la teneur en hydroperoxydes de lipides générés par les LOX en condition de déficit hydrique et en condition de réarrosage avec des quantités plus importantes chez le géotype sensible Express. Mais, il est à noter

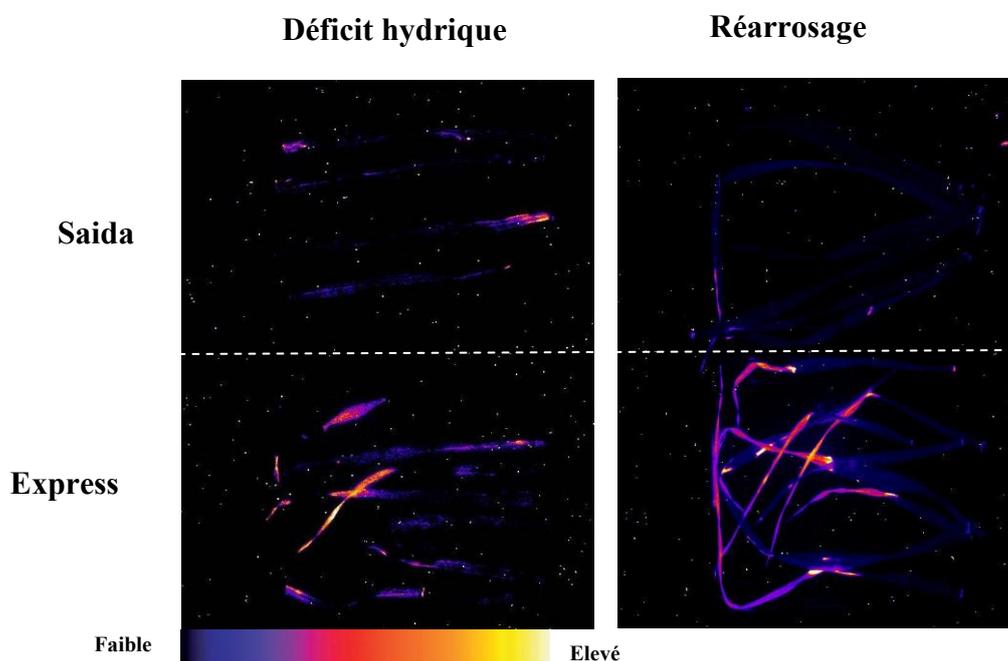
que ces résultats ne présentent pas une différence statistiquement significative avec le test *t* du fait d'une certaine hétérogénéité des données.

L'ensemble de ces données HPLC montre que, pendant une contrainte hydrique et après réarrosage, la variété Express montre une forte augmentation des niveaux d'acides gras hydroxylés par rapport à Saïda. Cette augmentation est principalement liée aux voies dépendant des ERO (Figure 38), car les mesures des HOTE générés par les LOX ont révélé des quantités d'HOTE du même ordre de grandeur dans les deux cultivars (Figure 39). Ainsi, nous pouvons conclure que les ERO sont très vraisemblablement produites à un niveau très supérieur chez la variété Express par rapport à la variété Saïda au cours de la période sans arrosage et après un réarrosage. Cette conclusion est basée sur le niveau beaucoup plus élevé de peroxydation lipidique liée aux ERO chez ce génotype

### 1.8.2. Evaluation du niveau de peroxydation lipidique par imagerie

Le degré de peroxydation des lipides, qui est un marqueur du niveau de stress oxydant, a été également étudié par une technique d'imagerie par autoluminescence des feuilles d'orge. Cette technique mesure la faible lumière émise spontanément par les plantes. Cette lumière provient spécifiquement de l'oxygène singulet, de l'état triplet excité du groupe carbonyle et des sous-produits de la décomposition spontanée lente de peroxydes lipidiques et d'endoperoxides (Havaux *et al.*, 2006 ; Birtic *et al.*, 2011). Le niveau de luminescence permet ainsi d'apprécier le degré de peroxydation des lipides.

Chez les plantes bien arrosées témoins, aucun signal d'autoluminescence n'a été détecté dans les deux génotypes (données non montrées). Lors du déficit hydrique et en condition de réarrosage, un signal fort a été observé dans les plantes Express par rapport à Saïda. Ce signal se traduit par la visualisation des feuilles en couleur jaune/ blanc très visible pour les feuilles chez Express et à peine détectable chez Saïda (Figure 40).



**Figure 40: Imagerie du stress oxydant par autoluminescence chez les feuilles des deux génotypes d'orge, Saïda et Express, soumis à un déficit hydrique pendant 8 jours et après réarrosage durant 3 jours.**

Déficit hydrique : plantes âgées de 15 jours (stade 4 feuilles) soumises à un arrêt de l'arrosage pendant 8 jours ;  
Rearrosage : plantes stressées réarrosées pendant 3 jours.

L'échelle des couleurs indique l'intensité du signal de luminescence du plus faible (bleu/violet) au plus élevé (jaune/blanc).

Ces données d'imagerie sont cohérentes avec les mesures par HPLC des quantités de peroxydes lipidiques et révèlent un niveau élevé de stress oxydant dans les feuilles de la variété Express soumise à un déficit hydrique, mais aussi lors de la phase de récupération après réarrosage.

## 2. Discussion

---

Au sein d'un même génotype, différents types de mécanismes aux niveaux moléculaire et biochimique contribuent au degré de tolérance vis-à-vis de contraintes environnementales telles que le manque d'eau. Nous avons développé au cours de ce travail plusieurs approches pour analyser des marqueurs biochimiques de tolérance ou de sensibilité au déficit hydrique chez deux génotypes d'orge en relation avec l'homéostasie rédox. En effet, une des conséquences directes et majeures de la déshydratation cellulaire résultant d'un manque d'eau au niveau de la plante est l'apparition d'un stress oxydant, notamment au niveau du compartiment chloroplastique du fait d'un flux important d'électrons vers l'oxygène au cours de la photosynthèse. Des perturbations métaboliques liées à des contraintes environnementales génèrent ainsi une production accrue d'ERO dans ce compartiment et de nombreuses études ont décrit l'intervention de plusieurs systèmes antioxydants lors de contraintes environnementales pour limiter ou retarder les effets néfastes des ERO.

L'objectif de ce travail a consisté à déterminer parmi les différents acteurs du réseau antioxydant ceux potentiellement impliqués dans les mécanismes de tolérance au manque d'eau chez l'orge en utilisant deux génotypes contrastés pour cette contrainte environnementale.

Nous avons tout d'abord noté que, pendant un déficit hydrique, la variété Express présente un contenu relatif en eau foliaire nettement inférieur par rapport à Saïda ce qui se traduit par un flétrissement plus marqué et une nécrose prononcée de certaines feuilles, observable même après réhydratation (Tableau 6 et 7 ; Figure 24). Ces observations chez Express sont associées à des niveaux beaucoup plus élevés de la peroxydation des lipides liée aux ERO par rapport à la variété Saïda. Plus intéressant encore, l'homéostasie rédox due aux ERO est toujours fortement altérée chez Express après réarrosage, mais pas chez le génotype Saïda. Ainsi, on note des taux de l'ordre de 2200 nmol.g poids sec<sup>-1</sup> d'HOTE chez Express contre 5 chez Saïda dans ces conditions. Ces niveaux de peroxydation lipidique sont en accord avec les données obtenues par imagerie, qui montrent un signal fort d'autoluminescence chez Express et révèlent ainsi un niveau élevé de stress oxydant dans ce génotype (Figure 40).

Ces dernières données signifient que la phase de récupération est une étape critique et qu'Express pourrait être également caractérisée par une faible tolérance à l'évolution rapide du contenu hydrique dans la cellule. Une réhydratation trop rapide pourrait être associée à des perturbations des structures cellulaires et entraîner des dommages autres que ceux provoqués par

la déshydratation. Il est à noter que cette situation peut se retrouver en conditions naturelles lors par exemple d'une forte chute de pluie après une longue période de sécheresse.

L'ensemble de ces données confirme bien que dans le matériel végétal faisant l'objet de notre étude, le degré de tolérance au manque d'eau est associé au niveau de stress oxydant. En effet, le cultivar tolérant, Saïda, présente beaucoup moins de dommages oxydants que le cultivar sensible lorsqu'ils sont soumis aux mêmes conditions de déficit hydrique.

### ***Rôles des enzymes antioxydantes dans la réponse au déficit hydrique des deux génotypes d'orge.***

Pour comprendre alors comment les divers acteurs du réseau antioxydant participent aux réponses des deux génotypes d'orge, nous avons tout d'abord étudié les enzymes permettant la détoxification des ERO et peroxydes organiques ou impliquées dans la réparation des protéines oxydées.

En ce qui concerne les peroxyrédoxines (Prxs), enzymes qui réduisent les peroxydes organiques, nous n'avons pas remarqué de différence très prononcée pour les quantités de ces enzymes entre les deux génotypes, à part pour PrxQ et la forme oxydée de 2-Cys Prx, qui sont un peu plus abondantes chez Express lors du déficit hydrique et pourraient donc participer à la protection contre les dommages oxydants chez ce cultivar (Figure 35).

Pour un autre type de thiol réductase, nous n'avons pas observé d'importants changements dans la quantité des méthionine sulfoxyde réductases (MSR) (Figure 36), exceptée une légère augmentation de la teneur en MSRB1 chez Express lors du déficit hydrique. En revanche, une forte augmentation (environ 60%) de l'activité totale MSR a été mesurée dans les extraits de feuilles des deux génotypes soumis à un déficit hydrique. De façon intéressante et en accord avec nos données, Ferguson et Burke (1994) ont rapporté une augmentation du même ordre de grandeur en mesurant l'activité MSR dans les plants de blé soumis à un déficit hydrique par rapport à celle de plants normalement arrosés.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'augmentation de l'activité MSR observée dans notre travail, n'est pas liée à l'abondance des protéines MSR, qui ne varie quasiment pas, mais proviendrait d'une teneur plus élevée d'agents réducteurs protéiques qui sont en mesure de fournir des électrons aux MSRs. Il est à noter qu'une thiorédoxine spécifique des plantes, nommée CDSP32 et localisée

dans le chloroplaste, est impliquée dans la protection contre les dommages dus au stress oxydant en condition de manque d'eau. Cette protéine a été identifiée par les travaux réalisés sur son niveau d'expression chez des plants de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) lors d'un déficit hydrique par comparaison des profils de gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines chloroplastiques de plantes témoins à ceux de plantes non arrosées (Rey *et al.*, 1998). Une abondance accrue de cette protéine a été constatée dans des conditions de stress osmotique chez différentes espèces végétales (Pruvot *et al.*, 1996). Cette thiorédoxine est capable de réduire certains types de MSRs plastidiales comme MSRB1 (Tarrago *et al.*, 2010). La participation de CDSP32 dans la régénération de l'activité de la 2-Cys Prx et ainsi de la limitation de la peroxydation lipidique, a été mise en évidence grâce à l'obtention de plantes de pomme de terre sous-exprimant cette Trx (Broin *et al.*, 2002, Broin et Rey 2003). Il est donc possible que CDSP32 participe à l'augmentation de la capacité MSR observée chez l'orge en condition de déficit hydrique.

L'ensemble de ces données révèle que les réductases à thiol de types MSR et Prx ne sont probablement pas impliquées dans la tolérance au déficit hydrique chez la variété locale Saïda, puisque les analyses concernant ces deux types d'enzymes n'ont pas permis de mettre en évidence de différence marquée avec Express.

En revanche, les plantes de la variété Express affichent durant le déficit hydrique et après réarrosage une activité de décomposition du peroxyde d'hydrogène, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus faible par rapport à Saïda (Figure 31). Par ailleurs, une abondance sensiblement plus élevée de la protéine CAT a été remarquée par immunodétection sur membrane chez Saïda par rapport à Express en condition de déficit hydrique.

La corrélation positive chez Saïda entre les niveaux de décomposition du peroxyde d'hydrogène et l'abondance de la CAT indique très probablement un rôle accru de cette enzyme dans le piégeage du peroxyde d'hydrogène chez ce cultivar en condition de manque d'eau. Ces données nous amènent à proposer que cette activité plus élevée de la CAT pourrait participer à la tolérance au manque d'eau du cultivar Saïda.

La catalase est en effet un piègeur d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> majeur dans la matrice des peroxysomes. Chez les espèces végétales de type C3 comme l'orge, l'activité photorespiratoire nécessite l'intervention de la catalase pour se développer normalement et aussi mieux tolérer des contraintes environnementales. Ainsi, un déficit en catalase chez l'orge entraîne une diminution de la survie des plantes et affecte les performances agronomiques, en diminuant le poids des graines et le rendement (Acevedo, 2001).

Sairam et Srivastava (2001) ont observé chez le blé une corrélation positive entre la tolérance au déficit hydrique et les niveaux d'activité des systèmes enzymatiques CAT et SOD pour 5 géotypes présentant des niveaux différentiels de tolérance au déficit hydrique. De façon similaire, des niveaux plus faibles pour les activités de types SOD et CAT ont été mesurés dans ce travail chez les plantes Express soumises à un déficit hydrique ou réarrosées par rapport à ceux relevés chez les plantes Saïda soumises aux mêmes régimes hydriques (Figure 31 et 32). Ces données nous amènent à proposer que la SOD, comme la CAT, pourrait être également impliquée dans la meilleure tolérance de ce cultivar au manque d'eau.

Cette hypothèse est en accord avec les nombreuses preuves acquises au cours des dernières années en ce qui concerne la participation des enzymes antioxydantes, CAT et SOD, dans la tolérance des plantes au déficit hydrique (cf. revue par Jubany-Mari *et al.*, 2010).

Ces enzymes pourraient empêcher l'accumulation des ERO, une conséquence bien connue du stress osmotique dans les cellules végétales, et ainsi limiter les phénomènes d'oxydation engendrés par ces espèces toxiques (Miller *et al.*, 2010). Nos travaux paraissent en accord avec ce modèle puisque nous avons noté une capacité moindre pour la SOD et la CAT chez la variété Express pendant un déficit hydrique par rapport à Saïda.

### ***Rôle des composés antioxydants solubles de faible poids moléculaire dans la réponse au déficit hydrique chez les deux variétés d'orge***

L'ascorbate et le glutathion sont des antioxydants métaboliquement liés et très abondants dans les cellules végétales (Noctor et Foyer, 1998; Rouhier *et al.*, 2008). Ils peuvent atteindre des concentrations de l'ordre du mM ou plus dans certains compartiments subcellulaires. Ces deux composés sont présents sous deux formes, réduite et oxydée. La forme réduite est en général très majoritaire puisqu'elle représente environ 80 à 90% du pool total pour ces deux composés.

Dans nos expériences, des contenus totaux similaires en ascorbate et en glutathion ont été mesurés dans les deux géotypes d'orge chez les plantes témoins, normalement arrosées.

En condition de déficit hydrique, de fortes augmentations ont été observées pour les deux composés chez Express avec plus de 100% pour le glutathion et plus de 50% pour l'ascorbate. De plus, la proportion de forme oxydée pour le glutathion est nettement plus élevée (35%) chez le

génotype sensible du fait d'une quantité de glutathion oxydé nettement plus forte (8,04 en état de déficit hydrique contre 1,60  $\mu\text{mol.g poids sec}^{-1}$  chez les plantes témoins (Figure 28).

En revanche, la variété locale Saïda présente une quantité de glutathion qui n'augmente que légèrement en condition de déficit par rapport aux conditions témoins. De plus, le taux d'oxydation de ce composé reste très bas par rapport à celui mesuré chez Express en condition de déficit hydrique.

En ce qui concerne l'ascorbate, sa concentration montre une évolution très différente entre les deux génotypes. Nos données révèlent en effet une teneur beaucoup plus élevée en condition de déficit hydrique chez le génotype Express par rapport à Saïda, avec également une proportion très supérieure de la forme oxydée.

Ces données montrent clairement que les quantités d'ascorbate et du glutathion varient d'une manière similaire dans le génotype sensible Express soumis à un déficit hydrique et elles signifient que le glutathion et l'ascorbate ne participent probablement pas à la tolérance de Saïda au déficit hydrique puisque les teneurs de ces deux composés antioxydants ne varient quasiment pas ou même diminuent chez cette variété lors du manque d'eau.

Ces résultats sont quelque peu différents de ceux généralement rapportés chez les plantes sensibles au déficit hydrique, chez lesquelles un appauvrissement du pool d'ascorbate est observé avec une proportion accrue de sa forme oxydée (Jubany-Mari *et al.*, 2010).

L'augmentation des niveaux en glutathion et en ascorbate, antioxydants solubles, chez la variété Express dans des conditions de déficit hydrique, pourrait être liée à un système de compensation du système enzymatique (CAT, SOD) qui présente une capacité plus faible d'élimination des ERO chez ce cultivar comme nous l'avons rapporté précédemment.

Cette hypothèse est en accord avec les approches pharmacologiques et génétiques, qui ont montré une corrélation négative entre le niveau d'activité enzymatique et la teneur en glutathion et son état redox. Ainsi, dans les feuilles d'orge traitées avec des inhibiteurs de la CAT, Smith (1985) a mesuré une forte augmentation de la quantité de glutathion. Par ailleurs, des mutants d'orge et d'*Arabidopsis* déficients en catalase présentent un contenu en glutathion beaucoup plus élevé, avec une proportion très élevée de la forme oxydée, lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions favorisant l'activité du métabolisme photorespiratoire (faible  $\text{CO}_2$ ). Ces conditions se traduisent par une production d'une grande quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  au niveau des peroxysomes (Smith *et al.*, 1984; Quéval *et*

al., 2007 ). Par ailleurs, un autre type de mutant d'orge déficient en CAT présente des concentrations plus élevées en glutathion et en ascorbate par rapport à des plantes de type sauvage (Palatnik *et al.* , 2002).

### ***Rôle des composés antioxydants lipophiles de faible poids moléculaire dans la réponse au déficit hydrique chez les deux variétés d'orge***

En ce qui concerne les antioxydants lipophiles de bas poids moléculaire, nous avons mesuré le contenu en  $\alpha$ -tocophérol, composé représentant généralement plus de 90% de la teneur foliaire en vitamine E (Foyer et Noctor, 2005). L' $\alpha$ -tocophérol joue une fonction importante en tant que composé antioxydant en relation avec le glutathion et l'ascorbate (Foyer et Noctor, 2005). Dans un même cultivar, des niveaux plus élevés en  $\alpha$ -tocophérol sont généralement corrélés à une meilleure tolérance aux contraintes osmotiques telles qu'un manque d'eau, comme cela a été constaté chez des plantes transgéniques surexprimant des gènes impliqués dans la synthèse d' $\alpha$ -tocophérol chez *Brassica juncea* (Kumar *et al.*, 2013). Des travaux menés sur des mutants d'*Arabidopsis* dépourvus d' $\alpha$ -tocophérol ont révélé que ce composé empêche la photoinactivation du photosystème II, protège les lipides membranaires de la photooxydation et intervient également dans un autre mécanisme antioxydant, le cycle des xanthophylles (Havaux *et al.*, 2005).

Dans des conditions de déficit hydrique une teneur nettement plus élevée en  $\alpha$ -tocophérol a été relevée chez la variété Express par rapport à Saïda. Nous pouvons donc conclure que ce composé n'intervient pas dans les mécanismes de tolérance au manque d'eau chez Saïda, mais qu'il pourrait avoir plus un rôle de limitation des dommages chez Express.

Dans ce travail, nous avons analysé par ailleurs les contenus de différents caroténoïdes, et notamment ceux impliqués dans le cycle des xanthophylles. Ce cycle, durant lequel la violaxanthine est convertie en zéaxanthine par la forme intermédiaire anthéroxanthine, entraîne une dissipation efficace non radiative de l'énergie lumineuse dans les thylacoïdes (Jahns et Holzwarth, 2012), et par conséquent la préservation des membranes photosynthétiques vis-à-vis des dommages oxydants (Havaux et Niyogi, 1999).

Une réponse différentielle a été également constatée chez les deux génotypes d'orge en ce qui concerne le contenu en xanthophylles de types anthéroxanthine et zéaxanthine. Ces deux

caroténoïdes, qui ont un rôle photoprotecteur, présentent une teneur significativement plus élevée en condition de déficit hydrique. Chez le génotype sensible Express, la teneur en anthéroxanthine est de l'ordre de  $105 \mu\text{g.g.poids sec}^{-1}$  contre 60 chez Saïda. De même, le contenu en zéaxanthine est quatre fois plus élevé chez le génotype Express (environ  $170 \mu\text{g.g.poids sec}^{-1}$ ) que chez Saïda ( $40 \mu\text{g.g.poids sec}^{-1}$ ). En conséquence, lorsqu'elles sont exposées à la même période de déficit hydrique, la variété Express affiche alors un ratio deux fois plus élevé pour la quantité de xanthophylles photoprotecteurs,  $(A + Z) / (A + Z + V)$ , par rapport à la variété Saïda.

En caractérisant deux cultivars de blé différents pour leur niveau de tolérance à la sécheresse, Loggini *et al.*, (1999) ont également observé, de façon très intéressante, un rapport  $(A + Z) / (A + Z + V)$  deux fois plus élevé chez le cultivar sensible dans des conditions de déficit hydrique. D'après nos données sur l'orge et celles rapportées chez le blé, nous pouvons conclure que les systèmes antioxydants à base de caroténoïdes de type xanthophylles, ainsi que ceux impliquant l' $\alpha$ -tocophérol, constituent probablement des mécanismes de défense chez les céréales lorsque des dommages oxydants prononcés se produisent. En effet, les teneurs en ces composés varient de manière moins marquée dans des génotypes tolérant le déficit hydrique par rapport à ceux sensibles à cette contrainte.

## Conclusions et Perspectives

---

En considérant toutes les données obtenues dans ce travail et en les confrontant à celles rapportées dans la littérature, nous avons pu mettre à jour une implication distincte des mécanismes antioxydants dans les réponses des deux génotypes d'orge au déficit hydrique. En effet, nous avons constaté que la sensibilité d'Express, par rapport à Saïda, est associée à une plus faible capacité des systèmes enzymatiques de types CAT et SOD, mais aussi à des quantités beaucoup plus élevées de tous les composés antioxydants solubles ou non de bas poids moléculaires.

Comme proposé par Quéval *et al.* (2007) pour les mutants dépourvus de CAT, nous pouvons présumer que le déséquilibre redox en raison de la capacité enzymatique inférieure chez la variété Express déclenche la synthèse de composés antioxydants de faible poids moléculaire comme le glutathion, grâce à l'activation des voies de signalisation en liaison avec des concentrations plus élevées en ERO.

En accord avec cette hypothèse, le stress oxydant chez *Arabidopsis*, généré par des ERO, conduit à une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des tocophérols (Collin *et al.*, 2008) et de l'ascorbate (Dowdle *et al.*, 2007; Müller-Moulé, 2008). Sur la base de ces données, nous proposons que chez la variété sensible Express les composés antioxydants non enzymatiques de faible poids moléculaire sont induits du fait de la modification de la teneur en ERO découlant de l'activité moindre des systèmes antioxydants enzymatiques. Cette activité moindre serait associée au phénomène de déshydratation cellulaire qui entraîne des perturbations du métabolisme et des dommages à toutes les macromolécules. Chez la variété Saïda, les systèmes antioxydants enzymatiques pourraient être mieux préservés dans ces conditions de stress par des mécanismes restant à définir. Il est également possible que l'expression des gènes codant pour ces enzymes soit maintenue ou stimulée chez Saïda en condition de déficit hydrique.

Il paraît surprenant que les composés antioxydants de bas poids moléculaire soient plus abondants dans une variété sensible aux contraintes environnementales comme le montre notre travail. Mais ces composés pourraient constituer une ligne de défense secondaire par rapport aux systèmes enzymatiques qui seraient dans l'incapacité d'équilibrer l'état redox de la cellule et d'éliminer les ERO accumulés. Les composés antioxydants de bas poids moléculaire seraient ainsi cruciaux pour la survie des cultivars sensibles.

L'accumulation de ces composés pourrait ainsi être considérée comme un marqueur de stress oxydant et des dommages consécutifs pour cribler des variétés sensibles par rapport à d'autres plus tolérantes. Le dosage des hydroperoxydes de lipides et l'imagerie du stress oxydant confirment les atteintes et les dommages oxydants dans les plantes du génotype sensible Express en condition déficit hydrique alors même que ces plantes présentent des contenus plus élevés en antioxydants de bas poids moléculaire. De plus, ces dommages paraissent se maintenir même après réarrosage, ce qui montre la difficulté de la plante à récupérer complètement des effets nocifs des ERO non prises en charge par les systèmes enzymatiques et la nécessité d'autres systèmes antioxydants.

Mais nous ne pouvons exclure que la variété tolérante Saïda possède d'autres protéines ou systèmes enzymatiques qui seraient plus abondants et lui conféreraient ainsi une stabilité de l'état rédox cellulaire en condition de déshydratation par rapport au génotype Express. Une approche de protéomique comparée pourrait permettre de mettre en évidence ces protéines et de confirmer ou non cette hypothèse.

D'autres travaux sont nécessaires pour valider les rôles distincts proposés dans ce mémoire pour des divers systèmes antioxydants. Il serait ainsi intéressant de valider l'hypothèse de l'intervention des antioxydants de bas poids moléculaire comme ligne secondaire de défense en comparant leurs contenus dans un nombre plus élevé de génotypes d'orge différant pour leur niveau de tolérance au déficit hydrique, mais aussi à d'autres contraintes osmotiques comme une forte salinité.

Enfin, notre travail suggère que les systèmes enzymatiques de types CAT et SOD jouent un rôle essentiel dans la tolérance au manque d'eau chez le cultivar Saïda. Ils ouvrent ainsi une voie de recherche dans le but de :

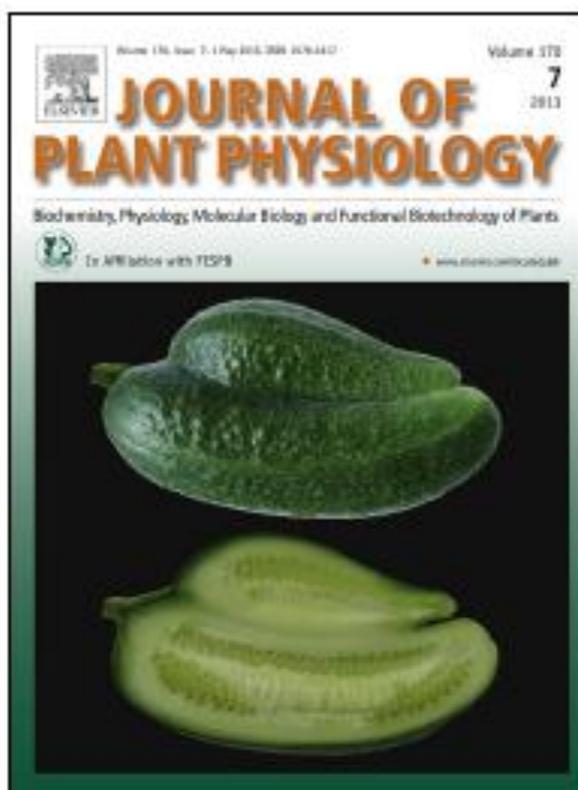
- ✓ sélectionner et/ou générer des variétés d'orge plus tolérantes vis-à-vis de cette contrainte par différentes méthodes comme la modification de l'expression des gènes codant pour ces enzymes antioxydantes (par des méthodes biotechnologiques de type transgénèse)
- ✓ la sélection de génotypes présentant naturellement des niveaux élevés d'expression pour ces enzymes (par des méthodes génétiques plus classiques et des croisements).

Article publié

---

**Marok M.A., Tarrago L., Ksas B., Henri P., Abrous-Belbachir O., Havaux M., Rey P. (2013)**  
*J Plant Physiol.* **170**:633-45.

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>

Author's personal copy

Journal of Plant Physiology 170 (2012) 633–645



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jplph](http://www.elsevier.com/locate/jplph)

Biochemistry

## A drought-sensitive barley variety displays oxidative stress and strongly increased contents in low-molecular weight antioxidant compounds during water deficit compared to a tolerant variety

Mohamed Amine Marok<sup>a,b,c,d</sup>, Lionel Tarrago<sup>a,b,c,1</sup>, Brigitte Ksas<sup>a,b,c</sup>, Patricia Henri<sup>a,b,c</sup>, Ouzna Abrous-Belbachir<sup>e</sup>, Michel Havaux<sup>a,b,c</sup>, Pascal Rey<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> CEA, U5V, INRA, Lab(Comptois) Molécul(Plantes), Saint-Paul-lès-Durance, F-13108, France

<sup>b</sup> CNRS, UMR 7263 Biol(Végét) & Microbiol(Environ), Saint-Paul-lès-Durance, F-13108, France

<sup>c</sup> Aix-Marseille Université, Saint-Paul-lès-Durance, F-13108, France

<sup>d</sup> Université de Khemis Miliana, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre, Ain Djeffra, Khemis Miliana, 44025, Algérie

<sup>e</sup> Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes, Faculté des Sciences Biologiques, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediène, BP 32, El-Alia, Bab El Ozaïer, 16111, Alger, Algérie

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 August 2012

Received in revised form

13 November 2012

Accepted 18 December 2012

Available online 8 February 2013

#### Keywords:

Antioxidant mechanisms

Barley

Oxidative stress

Sensitivity

Water deficit

### ABSTRACT

Barley displays a great genetic diversity, constituting a valuable source to delineate the responses of contrasted genotypes to environmental constraints. Here, we investigated the level of oxidative stress and the participation of antioxidant systems in two barley genotypes: Express, a variety known to be sensitive to drought, and Salda, an Algerian landrace selected for its tolerance to water deficit. Soil-grown 15-day-old plants were subjected to water deficit for 8 days and then rewatered. We observed that upon water stress Express exhibits compared to Salda accelerated wilting and a higher level of oxidative stress evaluated by HPLC measurements of lipid peroxidation and by imaging techniques. In parallel, Express plants also display lower levels of catalase and superoxide dismutase activity. No great difference was observed regarding peroxidoxin and methionine sulfide reductases, enzymes detoxifying peroxides and repairing oxidized proteins, respectively. In contrast, upon water stress and recovery, much higher contents and oxidation rates of glutathione and ascorbate were measured in Express compared to Salda. Express also shows during water deficit greater increases in the pools of lipophilic antioxidants like xanthophyll carotenoids and  $\alpha$ -tocopherol. Altogether, these data show that the differential behavior of the two genotypes involves distinct responses regarding antioxidant mechanisms. Indeed, the drought sensitivity of Express compared with Salda is associated with oxidative damage and a lower enzymatic ROS-scavenging capacity, but in parallel with a much stronger enhancement of most mechanisms involving low-molecular weight antioxidant compounds.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Water availability, which is mainly influenced by factors related to soil and climate, is a major determinant of plant growth and a critical factor in agriculture (Blum, 2005; Neumann, 2008). Among

cereals, barley (*Hordeum vulgare*) is one of the most widely cultivated species around the world. Thanks to its genetic diversity, barley exhibits a remarkable adaptability to a wide range of environments from arctic latitudes to tropical areas, and also at high altitude (von Bothmer et al., 2003). This diversity is a valuable source for crop improvement, and constitutes a fundamental basis to study the processes of adaptation and to identify genes involved in stress tolerance. Barley is extensively cultivated in the Mediterranean region and is generally rain fed, therefore subjected to highly variable and often weak rainfall patterns.

Adaptation to water shortage is achieved at the molecular, biochemical, physiological and anatomical levels. Numerous studies demonstrated that changes in stomatal conductance, water and nutrient uptake, hormones, osmolytes and antioxidants play important roles in plant tolerance to drought (Ingram and Bartels, 1996). Cell growth and photosynthetic metabolism are among

Abbreviations: ASC, ascorbic acid; CAT, catalase; DHA, dehydroascorbate; GSH, glutathione; LOX, lipoxygenase; MeSO, methionine sulfide; MSR, methionine sulfide reductase; Pro, peroxidoxin; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; Trx, thioredoxin.

\* Corresponding author at: Laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire des Plantes, Bâtiment 158, SIVME, CEA-Cadarache, 13108 Saint-Paul-lès-Durance Cedex, France. Tel.: +33 4 43 25 47 76; fax: +33 4 43 25 74 80.

E-mail address: [pascal.rey@cea.fr](mailto:pascal.rey@cea.fr) (P. Rey).

<sup>1</sup> Present address: Division of Genetics, Department of Medicine, Brigham & Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.

0176-1677/\$ – see front matter © 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.12.008>

## Author's personal copy

624

M.A. Marouf et al. / Journal of Plant Physiology 170 (2013) 620–635

the primary processes affected by water deficit (Clayton, 1991). Drought stress conditions lead generally to substantial oxidative damage (Smirnov, 1993), which partly results from impairment in photosynthetic machinery. Indeed, a decrease in photosynthetic activity is generally observed from the first stages of water shortage due to limited CO<sub>2</sub> diffusion through stomata (Flexas et al., 2004). As a consequence, plants are exposed to an excess of light energy, which cannot be converted into biochemical energy and leads to the production of reactive oxygen species (ROS) (Demmig-Adams and Adams, 1992; Foyer and Noctor, 2005).

Plants have evolved a complex array of antioxidant systems to prevent oxidative injury resulting from high levels of ROS, which are able to oxidize all macromolecules within cell and impair metabolism. They display various types of well-known enzymes scavenging ROS like superoxide dismutases (SODs), catalases (CATs) and peroxidases (Apet and Hirt, 2004). Further, they also possess numerous low-molecular weight antioxidant compounds either soluble like ascorbate and glutathione, or lipophilic like carotenoids and tocopherols (Noctor and Foyer, 1998; Havaux and Niyogi, 1999; Havaux et al., 2005). Many reports demonstrated that these systems participate in responses of cereals to water deficit. For instance, Loggini et al. (1999) showed a higher content in zeaxanthin, a carotenoid involved in lipid protection and dissipation of non-radiative energy, in a sensitive wheat cultivar compared to a tolerant one. Goranilla et al. (2007) identified drought-induced genes in rice and observed that genes encoding SOD and CAT isoforms are up-regulated in response to water deficit. Accordingly, in wheat, drought induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, GAT gene expression and CAT activity (Luna et al., 2005). Relatively few data are available regarding antioxidant systems in responses of barley to water deficit. Among 34 genes specifically expressed in drought-tolerant barley cultivars, several encode proteins involved in detoxification of ROS-induced compounds like aldehyde dehydrogenase, glutathione-S-transferase and ascorbate-dependent oxidoreductase (Guo et al., 2009). In other respects, thiol oxidoreductases, the activity of which is based on redox-active cysteines, have been recently found to participate in the plant antioxidant network (Rey et al., 2005; Vieira Dos Santos and Rey, 2006). These enzymes include thioredoxins (Trxs), which transfer reducing power to protein targets like peroxiredoxins (Prxs) involved in detoxification of organic peroxides. Interestingly, the CDSF32 Trx, which prevents oxidative damage (Broin et al., 2002), is induced by water deficit in Solanaceae (Rey et al., 1998) and the abundance and redox status of some Prx types are modified in response to drought in Arabidopsis (Gama et al., 2008; Rey et al., 2007). Trxs are also able to reduce methionine sulfoxide reductases (MSRs), enzymes regenerating methionine from methionine sulfoxide (MetO; Tarrago et al., 2009). Note that Met oxidation in proteins could participate in ROS scavenging (Levine et al., 1996). In cereals, the knowledge about the involvement of thiol oxidoreductases in drought stress responses is very poor. Only the expression of a Trx h gene has been reported to be triggered by water deficit (Goranilla et al., 2007).

In this study, we investigated the implementation of various antioxidant systems in the responses to drought of two barley genotypes reported to display a contrasted behavior: Express, a variety known to be sensitive to water deficit (Arnao et al., 1997) and Salda, a tolerant Algerian landrace. We show that when exposed to water deficit for the same period, Express exhibits compared to Salda accelerated wilting and oxidative stress. We then investigated how antioxidant mechanisms involving well-known ROS-scavenging enzymes, thiol reductases and low-molecular weight compounds either soluble or lipophilic are involved in the distinct responses to drought of the two genotypes.

## Materials and methods

### Plant material and water regime conditions

Two *Hordeum vulgare* L. genotypes were chosen based on differential tolerance to water stress. Seeds from Express, a variety sensitive to drought (Arnao et al., 1997), were obtained from S.I.S. (Via Mirandola, San Lazzaro di Savena, Italy). Seeds from Salda, an Algerian landrace tolerant to drought, were obtained from ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures, BP 16 El-Harrach, Alger, Algeria). After sowing in pots containing the same weight of compost soil, plants were grown under controlled conditions of temperature (25/20 °C, day/night), light (350 μmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 12 h photoperiod) and air humidity (60%) in a phytotron. Seven seedlings were grown in 2-L pots. All pots were similarly watered with the following frequency: 2 days with tap water and the 3rd day with a Colic-Lesaint nutritive solution (Colic and Lesaint, 1971). Fifteen days after sowing (4th leaf stage), three treatments were applied: one group of plants was grown under optimal watering for 8 days (control) and a second group was subjected to water stress by withholding watering for 8 days. Subsequently, some stressed plants were re-irrigated for 3 or 8 days. Leaf relative water content (RWC) was determined immediately after sampling. Pieces from young well-expanded leaves were weighed to determine fresh weight (FW) and then immersed in distilled water for 6 h at room temperature. Leaves were then blotted to remove water and weighed to measure water saturated weight (SW). Then, leaf samples were dried at 80 °C for 48 h to measure dry weight (DW). Leaf RWC was determined as follows: leaf RWC = (FW – DW)/(SW – DW).

### Lipid peroxidation measurements

Lipid peroxidation was assessed by HPLC analysis of hydroxy fatty acids recovered from leaf tissues after triphenylphosphine reduction and saponification of total lipids. Leaf pieces (0.5 g) from four plants were sampled, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. Extraction was achieved according to Montillet et al. (2004). An aliquot (100 μl) was subjected to straight phase HPLC (Waters Alliance 2690 and Dual Absorbance Detector 2487, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) using a Zorbax rx-SIL column (4.6 × 250 mm, 5-μm particle size, Hewlett Packard, Les Ulis, France), isocratic elution with 70:29.31:0.69 (v/v/v) hexane:diethyl ether:acetic acid at a flow rate of 1.5 ml min<sup>-1</sup>, and UV detection at 234 nm. ROS-mediated lipid peroxidation was evaluated from the level of different hydroxyoctadecatrienoic acid (HOTE) isomers using 15-hydroxy-11,13-(Z,E)-eicosadienoic acid as internal standard (Montillet et al., 2004). LOX-induced lipid peroxidation was estimated from the level of 13-HOTE after subtraction of racemic 13-HOTE (attributable to ROS-mediated lipid peroxidation) as explained in Montillet et al. (2004).

### Autoluminescence imaging

Lipid peroxidation was visualized in leaves using autoluminescence imaging, as previously described (Havaux et al., 2006; Birtic et al., 2011). Spontaneous photon emission due to spontaneous decomposition of lipid peroxides was recorded at room temperature using a highly sensitive charge coupled device camera (VersArray LN/CCD 1340–1300B, Roper Scientific), with a liquid nitrogen cooled sensor to reduce thermal noise and enable measurement of faint light by signal integration (Havaux et al., 2006). Treated plants were dark-adapted for 2 h before imaging. Acquisition time was 20 min.

## Author's personal copy

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 170 (2013) 620–626

625

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition activity**

Two 0.6-cm diameter leaf discs were ground in liquid nitrogen and the powder resuspended in 500  $\mu$ l 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). After centrifugation (16,000  $\times$  g, 20 min, 4°C), the supernatant was rapidly used for enzymatic assay. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition activity was monitored spectrophotometrically at 240 nm following the method of Aebi (1984). The reaction mixture contained 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma–Aldrich) and 5–20  $\mu$ l supernatant in a final volume of 1 ml. Calculations of activity were achieved according to Aebi (1984). Protein concentration was determined using a bicinchoninic acid assay (BC Assay Reagent, Interchim).

**SOD enzymatic activity**

Frozen leaf discs were ground in liquid nitrogen and extraction of soluble proteins was performed at 4°C in 1 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM PMSF. After centrifugation (16,000  $\times$  g, 20 min, 4°C), the supernatant was stored on ice and used within a few hours. Protein concentration was determined as above. Total SOD activity was assayed spectrophotometrically according to McCord (1999) using xanthine/xanthine oxidase as a system generating superoxide radicals (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). The reaction mixture (10 ml) contained 1.5 ml 50 mM phosphate buffer pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 7.5 ml 1 mM xanthine, 1.5 ml 1 mM cytochrome c solution, 20  $\mu$ l xanthine oxidase solution (Sigma) and 3  $\mu$ l supernatant from leaf extract. The absorbance was read at 550 nm at 25°C. The reduction rate of cytochrome c in the absence of supernatant was used as a control. One unit of SOD activity was defined as the amount of enzyme inhibiting the reduction rate of cytochrome c by 50% in the coupled system with xanthine oxidase.

SOD activity was also investigated using 70  $\mu$ g leaf proteins separated using non-denaturing gel electrophoresis in Tris–glycine buffer as described by Beauchamp and Fridovich (1971) and M'rah et al. (2006). Activity was revealed by incubating gels in the dark for 20 min in 2.45 mM nitro blue tetrazolium, and then in a 35 mM phosphate buffer (pH: 7.8) containing 28 mM TEMED and 28  $\mu$ M riboflavin. Thereafter, the gels were exposed to intense white light and quantification of the intensity of bleached SOD bands was achieved using the G-BOX (Syngene) software analysis tool.

**Protein extraction, SDS-PAGE and Western blotting analysis**

For total protein extraction, frozen leaves were ground in liquid nitrogen and the powder was resuspended in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM PMSF and centrifuged (30,000  $\times$  g, 20 min, 4°C). Soluble proteins were precipitated at –20°C by adding 3 volumes of acetone to the supernatant. The protein content was determined as described above. Proteins were separated using SDS-PAGE 13% (w/v) gel and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Pall Corporation). For AtMSR1 and poplar MSRA4 (Vieira Dos Santos et al., 2005), Western analysis were carried out using primary antibodies diluted 1:500 and detected using an anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma) diluted 1:10,000. Antibodies raised against At2-CysPrx (Broin et al., 2002), over-oxidized 2-Cys Prx (Rey et al., 2007), poplar PrxQ (Rouhier et al., 2004) and CAT (Agrisera, Vännäs, Sweden) were diluted 1:10,000, 1:2500, 1:2000 and 1:1000, respectively. For these four sera, bound antibodies were detected at 680 nm using the goat anti-rabbit Alexa Fluor® 680 IgG from Invitrogen using the "Odyssey Infrared Imager" from Licor (Lincoln, NE, USA).

**Total methionine sulfoxide reductase activity assay**

MSR activity in barley leaf extracts was determined by monitoring the reduction of the synthetic substrate, dabsyl-MeO, in the presence of dithioerythritol (DTE) (Laugier et al., 2010). Briefly, after blending leaves and resuspension in extraction buffer, the content in soluble proteins was determined as above. The reaction was initiated by adding 0.25 mM dabsyl-MeO in a mixture containing 15 mM HEPES, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM KCl, 20 mM DTE and 300  $\mu$ g leaf proteins. The reaction proceeded at 37°C for 3 h and was stopped by adding 900  $\mu$ l ethanol:acetate buffer 29 mM, pH 4.16 (50:50, v/v). After centrifugation (12,000  $\times$  g, 30 min, 4°C), the supernatant (160  $\mu$ l) was analyzed for dabsyl-MeO and dabsyl-MeO content using HPLC, a C18 reverse phase SunFire™ column (Waters, Milford, MA), acetate buffer 29 mM, pH 4.16, and acetonitrile as eluent (Laugier et al., 2010).

**Determination of glutathione content**

Frozen leaf discs were ground to a fine powder and extracted in 600  $\mu$ l 6.3 mM diethylene triamine-pentaacetic acid (DTPA), 40  $\mu$ M N-acetyl-L-cysteine and 0.15% trifluoroacetic acid (TFA). After centrifugation (15,000  $\times$  g, 10 min), the supernatant was filtered on 0.2  $\mu$ m nylon membrane. 125  $\mu$ l were added to 225  $\mu$ l buffer A (6.3 mM DTPA, 0.2 M 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-propane-sulfonic acid, pH 8.2) or buffer B (buffer A+0.5 mM Tris(2-carboxy-ethyl)phosphine hydrochloride (TCEP)). For measurements of GSH content, samples in buffer A were immediately alkylated with monobromobimane in acetonitrile at a final concentration of 500  $\mu$ M and stabilized by adding 150  $\mu$ l cold 1 M methanesulfonic acid after 20 min incubation in the dark. For measurements of total glutathione, samples in buffer B were alkylated for 45 min at room temperature. 20  $\mu$ l were analyzed by HPLC as described by Collin et al. (2008). The concentration of oxidized glutathione (GSSG) was calculated as the difference between total glutathione and reduced glutathione (GSH) values.

**Determination of ascorbate content**

Ascorbate content was determined using an HPLC-based method (Havaux et al., 2005). Two 0.6-cm diameter leaf discs were ground in 750  $\mu$ l chilled 4.5% metaphosphoric acid. The mobile phase used for chromatography analysis was distilled water acidified to pH 2.5 with sulfuric acid and the flow rate was 0.65 mL min<sup>-1</sup>. Ascorbate was detected by UV absorption at 245 nm. For measurements of reduced ascorbate (ascorbic acid, ASC), 20  $\mu$ l extract was immediately injected in HPLC for analysis. Total ascorbate (ASC + dehydroascorbate (DHA)) was determined after reduction at a final concentration of 10 mM TCEP. The mixture was left at room temperature in the dark for 4 h before injection of 20  $\mu$ l for HPLC analysis. The concentration of DHA was calculated as the difference between total ascorbate and ASC values.

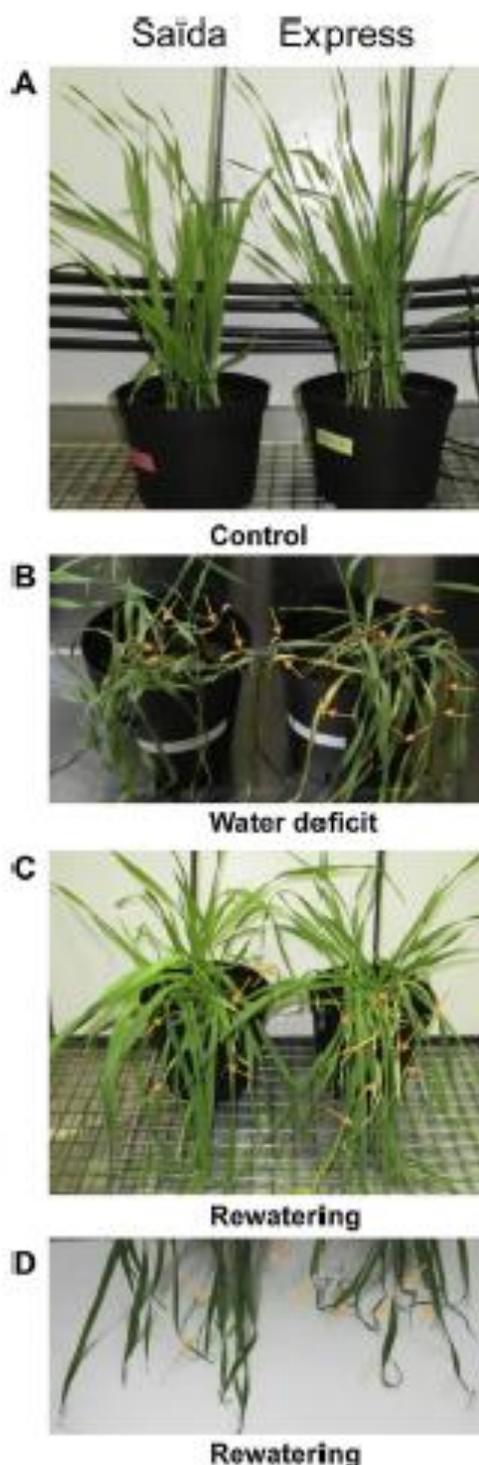
**Pigment and tocopherol analysis**

Leaf discs (0.6-cm diameter) were frozen in liquid nitrogen and kept at –80°C before analysis. Pigment extraction and HPLC analysis were conducted using the method described by Collin et al. (2008). Carotenoids (zeaxanthin, violaxanthin, antheraxanthin, lutein, zeaxanthin and  $\beta$ -carotene) and chlorophylls a and b were detected at 445 nm.  $\gamma$ - and  $\alpha$ -tocopherol were detected by fluorescence at  $\lambda_{em}$  = 295 nm and  $\lambda_{em}$  = 340 nm. The degree of de-epoxidation of xanthophyll-cycle components was expressed as  $Z + A/(V + A + Z)$ , where Z is zeaxanthin, A is antheraxanthin and V is violaxanthin.

Author's personal copy

66

MA Marok et al. / Journal of Plant Physiology 170 (2013) 613–615

**Table 1**

Leaf relative water content in leaf tissues of Saïda and Express barley genotypes subjected to water deficit and rewatering.

Barley genotype	Leaf relative water content		
	Control	Water deficit	Rewatering
Saïda	98 ± 1%	43 ± 5%	97 ± 2%
Express	98 ± 1%	32 ± 5%	96 ± 2%

Data are mean values ± standard deviation from four independent experiments. Measurements were performed using leaf pieces from young well-expanded leaves (at least 10 pieces from 7 plants per experiment). Control: well-watered plants for 21 days; water deficit: 15-day old plants subjected to water shortage for 8 days; rewatering: drought-stressed plants watered for 3 days.

\* Significantly different from the value in Saïda plants with  $p < 0.05$  (t-test).

#### Statistical analyses

Experiments were completely random-designed with at least three pots per genotype and per treatment. The Student's t-test (SigmaStat) was used to compare the mean values of data obtained with the two barley genotypes subjected to different water regimes.

#### Results

##### Effects of water deficit on barley Express and Saïda plants

First, we investigated the effects of water deficit on the two barley genotypes grown in phytotron conditions by performing visual observations and leaf relative water content (RWC) measurements in four independent experiments. Under optimal watering conditions, Express and Saïda plants display a very comparable development (Fig. 1A) and a similar RWC (98%) (Table 1). In conditions of water deficit, plants display wilting after 3–4 days, the Express plants being more affected compared to Saïda plants. At the end of the 8-day stress period, most leaves, except the youngest, were severely wilted, particularly in Express plants, which exhibit a higher number of leaves turning yellow (Fig. 1B). Accordingly, a more dramatic decrease in RWC was observed in Express, since we measured leaf RWC values of 43% and 32% in Saïda and Express plants, respectively (Table 1). Following rewatering, both cultivars rapidly recover since after 3 days they display leaf RWC values (96 and 97%) very close to that measured in control plants. Note that these measurements were performed using turgid leaves. Compared to Saïda, rehydrated Express plants display a significantly higher number of leaves entirely or partly necrotic or showing dried tips (Table 2; Fig. 1C and D). These data clearly show more damage in Express, compared to Saïda, when subjected to similar conditions of water shortage. They are in full agreement with the data reported by Armau et al. (1997) regarding Express sensitivity to drought conditions.

##### Lipid peroxidation level

Then we investigated whether water shortage and rewatering were associated with oxidative stress and damage in the two contrasted varieties. We first measured using HPLC the level of lipid peroxidation generated through either ROS-dependent or lipoxygenase (LOX)-mediated mechanisms. Under control conditions, both barley genotypes display very low and similar levels

**Fig. 1.** Phenotype of Express and Saïda barley plants subjected to water deficit and rewatering. (A) Control: Well-watered plants for 21 days; (B) water deficit: 15-day-old plants subjected to water shortage for 8 days; (C) rewatering: drought-stressed plants watered for 3 days; (D) leaf tips of drought-stressed plants rewatered for 3 days. Four independent experiments were performed and lead to similar results. The orange arrows indicate yellow and necrotic leaves in water-stressed and rewatered plants.

**Table 2**  
Number of leaves displaying large dried or necrotic areas (at least 50% of the surface) in Salda and Express barley plants subjected to water deficit and then rewatered.

Barley genotype	Number of damaged leaves
Salda	1.9 ± 0.3
Express	2.8 ± 0.5**

Observations were performed on plants subjected to water deficit for 8 days, 15 days after sowing, and rewatered for 8 days (32 plants per genotype).

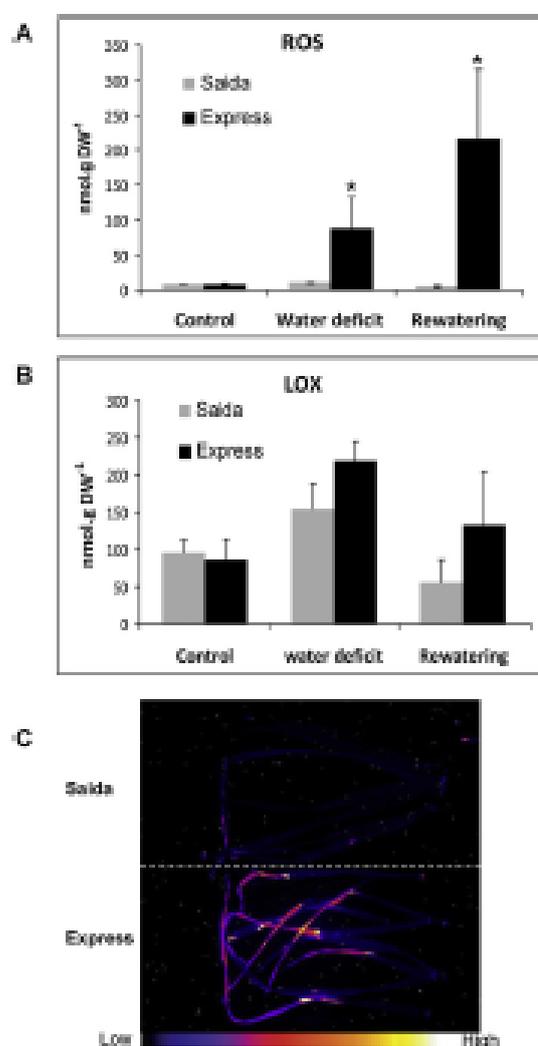
\*\* Significantly different from the value in Salda plants with  $p < 0.001$  (t-test).

of hydroxy fatty acids (HOTE) generated by ROS (Fig. 2A). Upon drought conditions, HOTE levels slightly vary in Salda whereas a huge increase occurs in Express (20-fold more compared to control). Most interestingly, Express plants still display a much more elevated level ( $>50$ ) of ROS-induced lipid peroxidation than Salda plants during recovery (Fig. 2A). In parallel, we measured the level of lipid peroxidation caused by the activity of LOXs, which might be related to stress signaling (op den Camp et al., 2003). Salda and Express plants display similar contents in LOX-induced HOTES in control conditions. Upon water shortage, an increase occurs in both varieties, followed by a decrease particularly in Salda. These HPLC data show that during water stress and also following rewatering, Express plants display strongly increased levels of hydroxy fatty acids, mainly originating from ROS-dependent pathways.

The degree of oxidative stress in detached barley leaves was also investigated using autoluminescence imaging. This technique measures the faint light emitted spontaneously by plants and originating from singlet oxygen and excited triplet state carbonyl groups, the by-products of slow spontaneous decomposition of lipid peroxides and endoperoxides (Havaux et al., 2006; Birtic et al., 2011). In well-watered plants, no signal of autoluminescence was detected (data not shown). Upon water deficit and rewatering, a strong signal was observed in Express plants, but not in Salda (Fig. 2C and data not shown). These imaging data are consistent with HPLC measurements of hydroxy fatty acids and reveal a high level of oxidative stress in Express plants subjected to drought stress and interestingly, also during recovery. Altogether, investigations based on HPLC and imaging show that the sensitivity of Express to water deficit is associated with oxidative damage.

#### $H_2O_2$ decomposition and superoxide dismutase activities

To gain insight into the participation of antioxidant mechanisms in the responses of the two barley varieties to drought, we first investigated the activity of enzymatic systems scavenging hydrogen peroxide.  $H_2O_2$  decomposition activity in plant extracts was evaluated by following spectrophotometrically the decrease in  $H_2O_2$  concentration at 240 nm in reaction assays containing leaf soluble proteins and  $H_2O_2$  (Fig. 3A). The  $H_2O_2$  decomposition rate measured using this method mainly originates from CAT activity as shown by Queval et al. (2007) in the characterization of a knockout *Arabidopsis* mutant. In control conditions, Express plants display a significantly higher level of  $H_2O_2$  decomposition activity than Salda (175 against  $130 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ , respectively). Upon water deficit, opposite results were noticed since an increase in activity occurs in Salda (almost  $200 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) whereas the activity decreases in Express ( $150 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) (Fig. 3A). After rewatering, no great change was noticed in the  $H_2O_2$  scavenging capacity measured in both cultivars compared to water stress conditions, except a slight increase in Express. We then investigated CAT abundance in barley leaves using Western blot analysis (Fig. 3B and C). We observed no change in CAT amount



**Fig. 2.** Lipid peroxidation in leaves of Express and Salda barley plants subjected to water deficit and rewatering. (A) Evaluation of ROS-mediated lipid peroxidation: HPLC-measurements of the amount of the different hydroxyoctadecatrienoic acid (HOTE) isomers. Data are means of 3 replicates<sup>a</sup>, the Express value is significantly different from the Salda value with  $p < 0.05$  (t-test). (B) Evaluation of LOX-mediated lipid peroxidation: HPLC-measurements of 13-HOTE amount after subtraction of racemic 13-HOTE (due ROS-mediated peroxidation). Data are means of 3 replicates. (C) Image of spontaneous autoluminescence in rewatered Salda and Express plants. The false color scale indicates signal intensity from very low (blue) to very high (white).

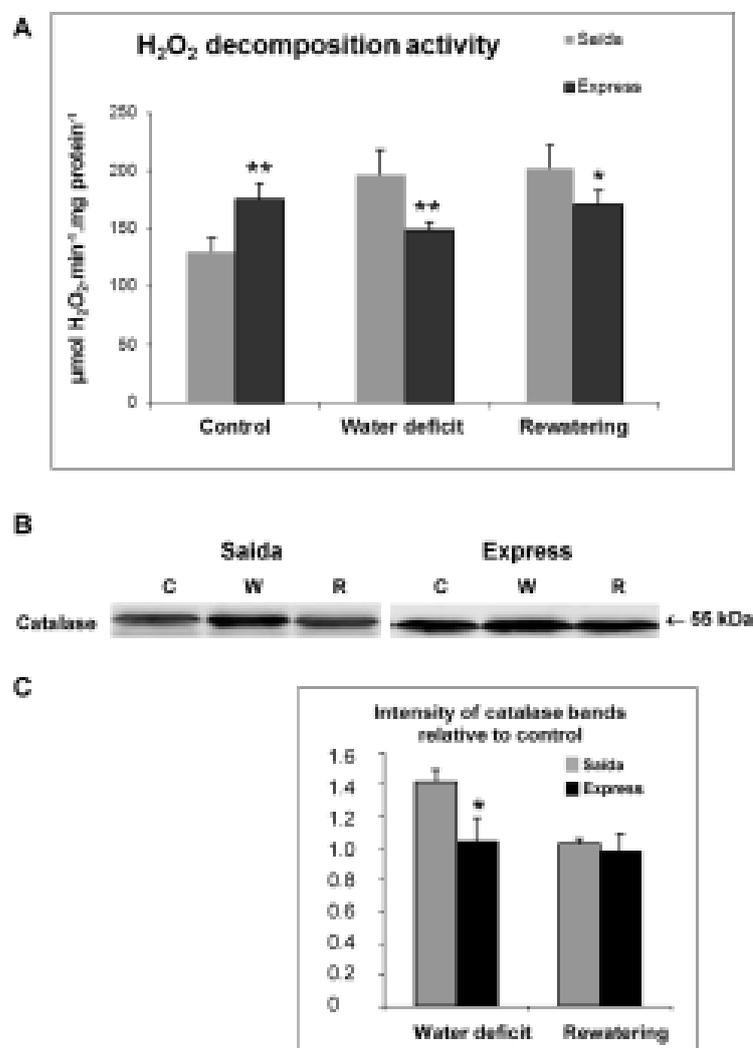
in Express plants during water deficit and following rewatering. In Salda plants, a substantial increase (ca. 40%) in protein abundance was noticed during water stress and no change was observed after recovery. Altogether, these data reveal a differential response of the two cultivars, since  $H_2O_2$  scavenging capacity and CAT abundance are noticeably increased in Salda upon water stress, but not in Express.

To investigate superoxide scavenging capacity, we first measured SOD activity in leaf extracts using xanthine/xanthine oxidase

Author's personal copy

G38

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 170 (2013) 633–643



**Fig. 3.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition activity and Western analysis of catalase abundance in leaves of Saldia and Express barley plants subjected to water deficit and rewatering. (A) Measurements of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition activity were performed spectrophotometrically as described in "Materials and methods" using extracts from young well-expanded leaves. Data are mean values  $\pm$  standard deviations from at least four independent experiments. (B) Western analysis of catalase abundance in barley leaf soluble proteins (20 µg per lane) separated by SDS-PAGE. (C) Quantification of catalase protein amount from Western data using the Licor Odyssey software analysis tool. Data from three independent experiments were analyzed. Control (C): well-watered plants for 23 days; water deficit (W): 15-day old plants subjected to water shortage for 8 days; rewatering (R): drought-stressed plants watered for 3 days. \* and \*\*, the Express value is significantly different from the Saldia value in the same condition with  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively (t-test).

to generate superoxide and following the rate of reduction of cytochrome *c* at 550 nm by spectrophotometry. In leaf extracts of Saldia plants, no marked change could be observed in SOD activity as a function of watering regime, since an activity of ca. 150 units mg prot<sup>-1</sup> was measured in control, drought-stressed and rewatered plants (Fig. 4A). In striking contrast, the measured SOD activity in Express leaves quite comparable to that determined in Saldia under control conditions, drops down to values in the range of 100 units mg prot<sup>-1</sup> upon water deficit and following re-irrigation (Fig. 4A), significantly lower than those recorded in Saldia. These data show that SOD activity is maintained in Saldia upon

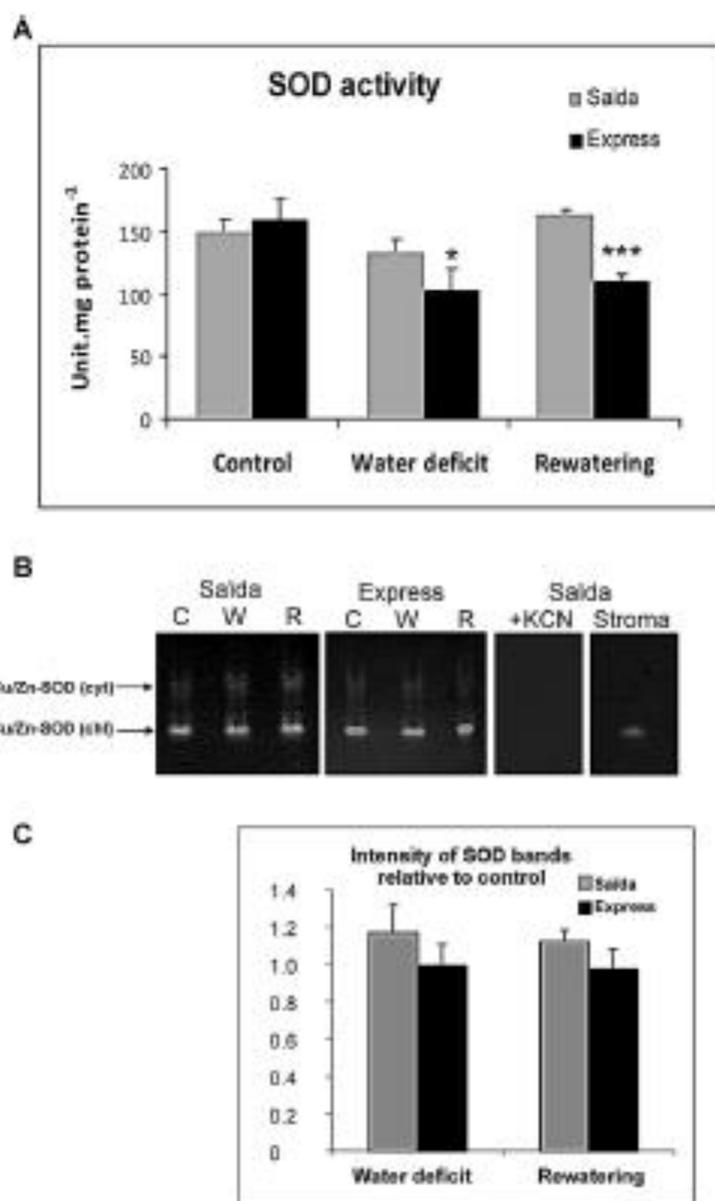
water stress and recovery, whereas it is noticeably reduced in Express.

To further analyze SOD activity and isozymes, activity was visualized in native gels using a photochemical method (Fig. 4B). In both cultivars, two main bands were observed and attributed to Cu/ZnSOD isozymes since both disappeared when gels were treated with KCN, a specific inhibitor of this SOD type (Beauchamp and Fridovich, 1971). Using stromal proteins prepared from purified chloroplasts, the major and lower band was found as localized in chloroplasts (Fig. 4B). Based on quantification data, the intensity of SOD bands appeared 20 and 15% higher in Saldia than in Express

Author's personal copy

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 170 (2013) 613–616

615



**Fig. 4.** Superoxide dismutase activity and electrophoregram from leaf extracts of *Saldia* and *Express* barley plants subjected to water deficit and rewatering. (A) Superoxide dismutase measurements activity were performed spectrophotometrically as described in "Materials and methods" using extracts from young well-expanded leaves. Data are mean values  $\pm$  standard deviations from at least four independent experiments. (B) Separation in non-denaturing gels and activity revelation of SOD isoforms in leaf extracts (70  $\mu$ g proteins per lane). The third gel shows the effect of KCN, a specific inhibitor of CuZn-SOD and the fourth the electrophoregram obtained when analyzing stromal proteins (120  $\mu$ g) prepared from purified chloroplasts. (C) Quantification of SOD activity from electrophoregram data using the G-BOX (SynGene) software analysis tool. Data from three independent experiments were analyzed. Control (C): well-watered plants for 21 days; water deficit (W): 15-day old plants subjected to water shortage for 8 days; rewatering (R): drought-stressed plants watered for 3 days. \* and \*\*\*, the Express value is significantly different from the *Saldia* value in the same condition with  $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively ( $t$ -test).

in water-deficit and rewatering conditions, respectively (Fig. 4C). This higher SOD activity in *Saldia* likely partly originates from the cytosolic CuZn isoform, which is clearly visible in this genotype, but barely detectable in extracts from wilted and rewatered *Express* plants.

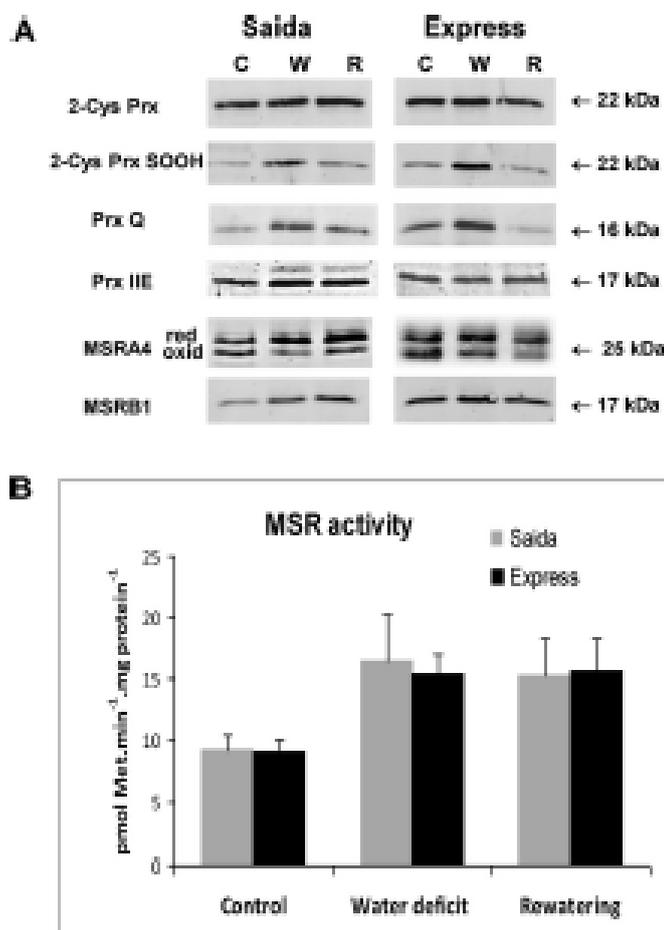
#### Content in thiol oxidoreductases and MSR activity

In the past years, growing evidence has been gained regarding the essential role of thiol peroxidases and thiol oxidoreductases in plant responses to oxidative stress (Vieira Dos Santos and Rey,

Author's personal copy

640

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 178 (2013) 632–645



**Fig. 5.** Western analysis of plastidial Prx and MSR abundance (A) and HPLC-measurements of peptide MSR activity (B) in leaves of Saida and Express barley plants subjected to water deficit and rewatering. (A) Western analysis was performed using leaf soluble proteins (20 µg per lane for MSRA4, MSRB1, Prx Q and 10 µg for 2-Cys Prx and 2-Cys PrxSOOH) separated by SDS-PAGE. The sera dilutions and revelation procedures are described in "Materials and methods". Similar results were obtained in at least two independent experiments. (B) Peptide MSR activity was measured using HPLC as described in "Materials and methods". Data are mean values of at least four independent measurements per genotype and per treatment. Control (C): well-watered plants for 23 days; water deficit (W): 15-day old plants subjected to water shortage for 8 days; rewatering (R): drought-stressed plants watered for 3 days.

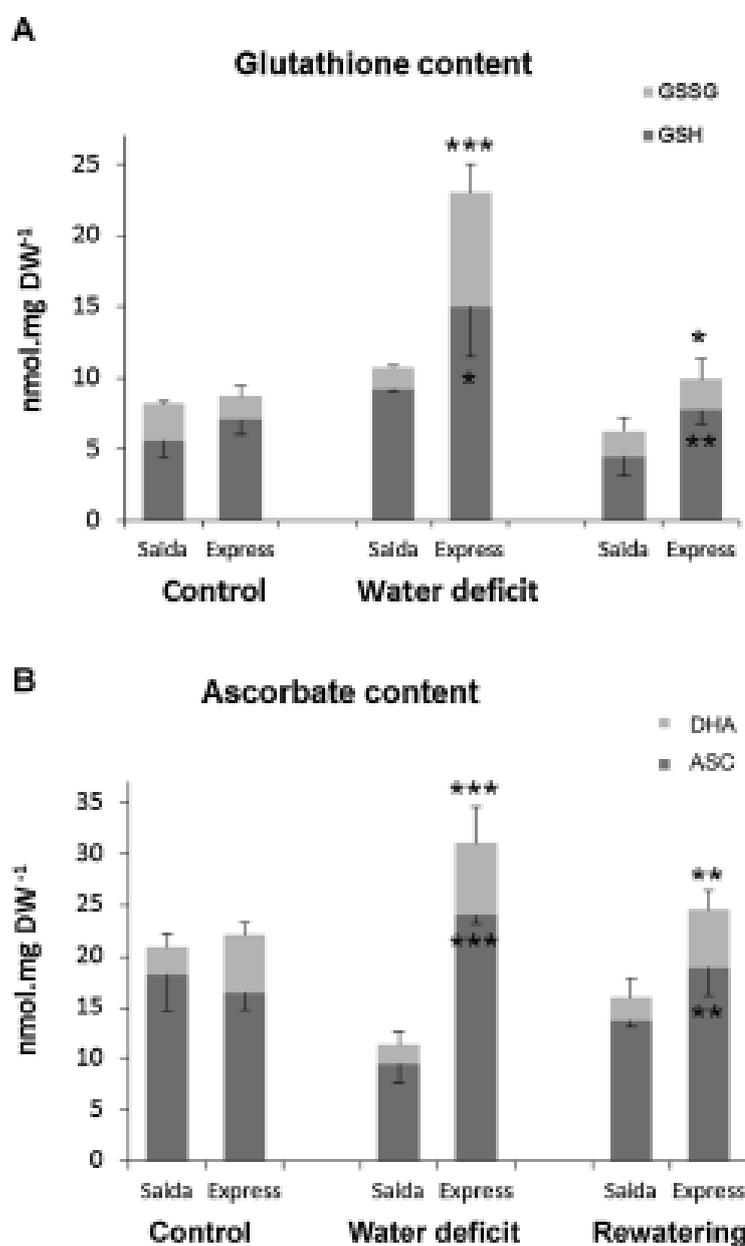
2006) through their roles in peroxide detoxification and in protein repair. We analyzed the abundance of plastidial Prxs (2-Cys Prx, PrxQ, Prx IIE) and MSRs (MSRA4, MSRB1 and MSRB2) in barley leaves. Antibodies raised against Arabidopsis and poplar Prx homologues specifically revealed bands with expected molecular masses in barley extracts (Fig. 5A). In plants subjected to water deficit or rewatered, no change or only slight variations were observed in the abundance of 2-Cys Prx and PrxIIE compared to control conditions. In contrast, an increase in PrxQ amount was observed in both cultivars upon water stress, the protein amount being higher in Express than in Saida. In rewatered plants, a strong decrease in PrxQ amount occurs in Express. We also used a serum raised against the over-oxidized 2-Cys Prx form, which could play an essential role in signaling processes during stress conditions (Rey et al., 2007). We observed an increase in the abundance of oxidized 2-Cys Prx in both barley genotypes subjected to water deficit, and a decrease down to the control level upon recovery (Fig. 5A).

MSRB1 and MSRA4 antibodies clearly recognized specific bands in barley proteins (Fig. 5A), unlike the serum raised against Arabidopsis MSRB2, for which no unambiguous signal was observed (data not shown). Note that like in Arabidopsis (Vieira Dos Santos et al., 2005), two bands, corresponding to MSRA4 reduced and oxidized forms are revealed in barley extracts. They display a similar intensity in well-watered plants in both genotypes. Upon water deficit and following rewatering, the MSRA4 reduced form is more abundant compared to control conditions, particularly in Saida plants. Regarding MSRB1, a higher protein abundance was observed in water-stressed and rewatered Saida plants, whereas no substantial change was noticed in Express. We measured the total MSR capacity in barley leaf extracts using dabsyl-MetO, a substrate mimicking peptide-bound MetO. In both genotypes grown under control conditions, an activity in the range of 10 pmol Met/mg prot<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> was recorded (Fig. 5B). Note that this value is relatively low taking into consideration that reported in Arabidopsis, ca. 50 pmol Met/mg prot<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> (Laugier et al.,

Author's personal copy

M.A. Mirak et al. / Journal of Plant Physiology 179 (2013) 602–606

641



**Fig. 6.** Content in reduced and oxidized glutathione (A) and ascorbate (B) in leaf extracts of Saida and Express barley plants subjected to water deficit and rewatering. (A) Dark gray bars: reduced glutathione (GSH); light gray bars: oxidized glutathione (GSSG). (B) Dark gray bars: reduced ascorbate (ASC); light gray bars: oxidized ascorbate or DHA. Measurements were performed using HPLC as described in "Materials and methods" using disks from young well-expanded leaves. Control: well-watered plants for 21 days; water deficit: 15-day old plants subjected to water shortage for 8 days; rewatering: drought-stressed plants watered for 3 days. Data are mean values  $\pm$  standard deviations from at least four independent experiments. \*, \*\*, and \*\*\*, the Express value is significantly different from the Saida value in the same condition with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively (*t*-test).

2010). During water deficit conditions, MSR activity noticeably increases to a value in the range of  $16 \text{ pmol Met mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$  in both barley genotypes. When rewatered, plants display no noticeable change in MSR activity compared to water deficit

conditions. Altogether, the data gained on the abundance and/or activity of various types of thiol reductases show no great difference between Saida and Express plants subjected to water shortage.

## Author's personal copy

642

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 179 (2013) 632–645

## Glutathione and ascorbate pools

To delineate the participation of other antioxidant systems in the responses of the two barley varieties, we then measured leaf contents in glutathione and ascorbate, which are metabolically linked soluble antioxidants and fulfill major roles in cell metabolism (Noctor and Foyer, 1998). In young leaves of well-watered Express and Salda plants, a glutathione content of ca. 8.5 nmol mg DW<sup>-1</sup> was measured in both genotypes, but with a different proportion of oxidized glutathione (GSSG), 30% in Salda and 20% in Express (Fig. 6A). Upon drought conditions, a slight increase in the glutathione pool was noticed in leaves of Salda plants, with a GSSG proportion lowered to 15%. In contrast, a dramatic higher concentration was observed in Express leaves (more than 23 nmol mg DW<sup>-1</sup>). Of note also is the much higher proportion (more than 35%) of GSSG in this variety compared to control conditions and to Salda (Fig. 6A). Following recovery, the total glutathione content decreases in the two genotypes, with oxidation ratios close to those measured in control conditions. Nevertheless, rehydrated Express plants still display a higher glutathione content than Salda plants (10.9 and 6.3 nmol mg DW<sup>-1</sup>, respectively).

Young well-expanded leaves of both barley varieties display a similar total ascorbate content in control conditions (ca. 21.5 nmol g DW<sup>-1</sup>), with an oxidation ratio higher in Express (25%) than in Salda (12%) (Fig. 6B). Upon water deficit, a 50% decrease in the ascorbate pool occurs in Salda, the proportion of oxidized form, DHA, being slightly decreased. In contrast, wilted Express plants exhibit a strongly increased ascorbate pool (31 nmol mg DW<sup>-1</sup>) and no change in the redox state. Rewatering leads to an increase in ascorbate content in Salda plants, but to a value still lower than that measured in control plants. In Express plants a decrease to ca. 25 nmol ASC mg DW<sup>-1</sup> was noticed following rehydration (Fig. 6B). In both varieties, the ascorbate redox state is almost similar in control and recovery conditions. Taken together, these data reveal a highly contrasted behavior regarding glutathione and ascorbate pools in Salda and Express plants upon water deficit and during recovery, the content and oxidation ratio being much higher for both compounds in Express.

## Chlorophyll and carotenoid composition

Finally, to get an overall picture of the antioxidant responses of the two varieties, we measured the leaf content in low-molecular weight lipid-soluble antioxidants. The carotenoid content was determined using a HPLC method together with that in chlorophyll

as a function of water regime. Well-expanded leaves of Salda and Express display chlorophyll a and b contents in the range of 8.3 and 2.7 mg g DW<sup>-1</sup>, respectively, with a similar Chl a/Chl b ratio (Table 3). During water deficit, decreases in chlorophyll a content to ca. 6.2 mg g DW<sup>-1</sup> occur in both varieties. Regarding Chl b, a decrease to 1.9 mg g DW<sup>-1</sup> occurs in Salda plants whereas Express plants display a relatively less altered content (2.4 mg g DW<sup>-1</sup>). Rewatering resulted in further decreases in chlorophyll content to very comparable values in the two genotypes (Table 3). These measurements show that the two barley varieties do not exhibit substantial difference regarding content and composition in chlorophyll pigments whatever the water regime.

We then analyzed carotenoids participating in xanthophyll cycle, an essential component of the antioxidant network in plants (Havaux and Niyogi, 1999). During the cycle, violaxanthin is converted, via the intermediate antheraxanthin and thanks to reducing power provided by ascorbate, to zeaxanthin which has a direct photoprotective function besides a role in non-photochemical quenching (Jahns and Holzwarth, 2012). Under well-watered conditions, Salda and Express plants display violaxanthin contents in the range of 260 and 170 μg g DW<sup>-1</sup>, respectively (Table 3). Water deficit and rewatering are not associated with noticeable change in violaxanthin content in both genotypes, except a somewhat reduced level in rehydrated Salda plants. Regarding antheraxanthin, plants from both genotypes display a low and similar content in control conditions. Upon water deficit, the antheraxanthin pool strongly increases, but is twice higher in Express (106 μg g DW<sup>-1</sup>) than in Salda (58 μg g DW<sup>-1</sup>) (Table 3). Similarly, the zeaxanthin level is significantly more elevated in Express than in Salda (169 against 52 μg g DW<sup>-1</sup>) upon water deficit, whereas this pigment is not found in well-watered plants or following rewatering. As a consequence, the proportion of photoprotective xanthophylls (antheraxanthin+zeaxanthin)/(antheraxanthin+zeaxanthin+violaxanthin) is twice higher in Express than in Salda upon water deficit (Table 3).

We also analyzed the content in lutein, the major xanthophyll carotenoid in plant thylakoid membranes (Table 3). In Salda and Express leaves, we measured lutein contents of ca. 650 μg g DW<sup>-1</sup>, respectively. Water deficit resulted in increases in lutein content, +31% in Salda and +48% in Express. Both genotypes display a similar lutein content (ca. 460 μg g DW<sup>-1</sup>) when rewatered. Finally, we determined the content in β-carotene and observed increased values during water deficit in both varieties, with a higher level in Express (576 μg g DW<sup>-1</sup>) than in Salda (438 μg g DW<sup>-1</sup>) (Table 3). Following rewatering, a similar β-carotene content was measured in the two barley genotypes.

Table 3

Pigment, carotenoid and isoprenoid content (μg g dry weight<sup>-1</sup>) in leaf tissues of Salda and Express barley plants subjected to water deficit and rewatering.

	Salda			Express		
	Control	Water deficit	Rewatering	Control	Water deficit	Rewatering
Chl a	8586 ± 752	6729 ± 1727	5777 ± 708	7628 ± 1031	6227 ± 887	5187 ± 742
Chl b	2916 ± 35	1911 ± 510	1721 ± 232	2615 ± 452	2405 ± 256	1696 ± 191
Chl a/Chl b	2.95 ± 0.10	3.21 ± 0.07	3.07 ± 0.08	3.02 ± 0.04	2.62 ± 0.12**	3.06 ± 0.10
Violaxanthin	252 ± 14	262 ± 48	208 ± 13	170 ± 21**	166 ± 47	170 ± 33
Antheraxanthin	7.8 ± 2.8	58.2 ± 4.2	9.9 ± 0.4	9.6 ± 4.2	106 ± 16**	182 ± 22**
Zeaxanthin	n.d.	52.1 ± 8.1	n.d.	n.d.	169 ± 6***	n.d.
(Z+A)/(V+A+Z)	0.03 ± 0.01	0.30 ± 0.07	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.62 ± 0.07**	0.10 ± 0.02**
Lutein	620 ± 52	852 ± 179	451 ± 53	645 ± 101	856 ± 40	464 ± 49
β-Carotene	325 ± 17	438 ± 133	238 ± 13	338 ± 94	576 ± 50	349 ± 47
α-Tocopherol	330 ± 47	527 ± 85	425 ± 101	362 ± 63	759 ± 257	559 ± 104
γ-Tocopherol	8.94 ± 0.56	124 ± 27	21.7 ± 4.0	7.72 ± 1.79	119 ± 6	34.6 ± 7.2

The experiments were performed using 1-cm diameter disks from well-expanded leaves and measurements were performed using a HPLC-method. Data are mean values ± standard deviations of three to four independent measurements. \*, \*\* and \*\*\*, the Express value is significantly different from the Salda value in the same condition with  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively (t-test). n.d., not detected. Control: well-watered plants for 23 days; water deficit: 15-day-old plants subjected to water shortage for 8 days; rewatering: drought-stressed plants watered for 3 days. Chl, chlorophyll; A, antheraxanthin; V, violaxanthin; Z, zeaxanthin.

## Author's personal copy

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 179 (2013) 603–610

603

## Tocopherol content

$\alpha$ -Tocopherol, another type of lipid-soluble antioxidant, is the most abundant form of vitamin E and is exclusively synthesized by oxygenic photosynthetic organisms. We measured in barley the leaf content of this compound and also that of a minor form,  $\gamma$ -tocopherol. In control conditions, both Salda and Express plants display similar tocopherol contents in the range of 350 and 8  $\mu\text{g g DW}^{-1}$  for the  $\alpha$ - and  $\gamma$ -forms, respectively (Table 3). A strong and comparable increase in  $\gamma$ -tocopherol content was noticed in both cultivars during water deficit. With regard to  $\alpha$ -tocopherol, the content increases to ca. 530 and 760  $\mu\text{g g DW}^{-1}$  in leaves of water-stressed Salda and Express plants, respectively, with a significantly higher value in Express. Following rewatering, the  $\alpha$ -tocopherol content decreases, but is still substantially higher than in control conditions, particularly in Express plants. These data clearly reveal a higher accumulation of  $\alpha$ -tocopherol in the drought sensitive barley variety exposed to water shortage.

## Discussion

The drought sensitivity of Express is associated with a lower capacity of antioxidant scavenging enzymes and oxidative damage compared to Salda

In this work, we aimed to delineate the participation of various antioxidant mechanisms in the responses of two barley varieties contrasted for water deficit tolerance. First, to validate the choice of varieties, we performed experiments on soil-grown plants in controlled growth chambers. These experiments clearly showed that Express displays accelerated wilting during water shortage compared to Salda (Fig. 1; Tables 1 and 2). Despite limitations due for instance to pot size, which can alter root growth, these data are in full agreement with the known characteristics of the two barley genotypes. Indeed, Express is an improved variety selected for high yield, although displaying susceptibility and impaired photosynthetic performance under water stress (Arnaud et al., 1997), whereas Salda is an Algerian landrace selected for its tolerance to drought in natural environment. We showed that during water shortage Express exhibits much more elevated levels of lipid peroxidation than Salda. This reveals the occurrence of oxidative stress in the improved variety. Most interestingly, redox homeostasis following rewatering is still strongly impaired in Express, but not in Salda (Fig. 2). This signifies that the recovery phase is a critical step and that Express could be also characterized by a low tolerance to rapid change in cell water status, resulting for instance from a rain fall after a long drought period. To decipher how various actors of the antioxidant network participate in the responses of the two barley genotypes, we first investigated ROS-related enzymes. Regarding thiol reductases, we did not observe any substantial change in the amount of plastidial MSR. In contrast, a strong increase (ca. 60%) in total MSR activity was measured in leaf extracts of both genotypes subjected to water deficit. Interestingly, Ferguson and Burke (1994) reported a similar increase in MSR activity in drought-stressed wheat plants. We can hypothesize that the activity increase observed in our work, which is not linked to protein abundance, originates from a higher content of reductants able to provide MSR with electrons. Accordingly, the plant specific thioredoxin, CDSP32, which shows increased abundance under osmotic stress conditions (Rey et al., 1998) is able to reduce plastidial MSR like MSR81 (Tarrago et al., 2010). With regard to Pox, enzymes reducing organic peroxides, we did not notice any difference between the two genotypes. These data reveal that MSR and Pox are likely not involved in the tolerance to water stress

of Salda. In contrast, Express plants display during water deficit and recovery lower  $\text{H}_2\text{O}_2$  decomposition and SOD activity levels than those measured in control conditions and also than those recorded in Salda (Figs. 3 and 4). Moreover, a substantially higher CAT abundance was noticed in Salda than in Express in water deficit conditions. These data prompt us to propose that the low tolerance of Express could be partly related to a reduced capacity of enzymatic scavenging systems under stress. Accordingly, Sairam and Srivastava (2001) observed in wheat a positive correlation between water stress tolerance and CAT/SOD activity levels among 5 genotypes differing in response to drought stress. More generally, strong evidence has been gained in the past years concerning the participation of ROS-scavenging enzymes in the tolerance of plants to water deficit as reviewed by Jubany-Mari et al. (2010). These enzymes would prevent ROS accumulation and limit oxidative injury, which is a well-known consequence of osmotic stress in plant cells (Miller et al., 2010) and has been observed to a much higher extent in Express during water stress compared to Salda (Fig. 2).

## Role of low-molecular weight antioxidant compounds in the response to drought of Express

Ascorbate and glutathione are highly abundant antioxidants in plant cells (Noctor and Foyer, 1998; Rouhier et al., 2008). In our experiments, similar contents in ascorbate and glutathione were measured in both barley genotypes in control conditions. Upon water deficit, strong increases occur for both compounds in Express, ca. +200% for glutathione and +50% for ascorbate, with a substantially higher oxidation ratio (35%) for the former. In contrast, the Salda landrace exhibits a slightly increased glutathione content and a decreased ascorbate concentration with low oxidation ratios. These data signify that these compounds do not likely participate in the tolerance of Salda to water stress. The increased level in glutathione in Express might be linked to the lower  $\text{H}_2\text{O}_2$ -scavenging capacity and CAT abundance in water deficit conditions (Fig. 3). This hypothesis is in agreement with pharmacological and genetic approaches, which showed a negative correlation between CAT activity level and glutathione content and redox state. Thus, in barley leaves treated with CAT inhibitors, Smith (1985) measured a strong increase in glutathione pool. In other respects, barley and Arabidopsis catalase-deficient mutants exhibit much higher glutathione contents, with a large proportion of oxidized form, when grown under photorespiratory conditions which result in high  $\text{H}_2\text{O}_2$  production (Smith et al., 1984; Queval et al., 2007). Regarding ascorbate, our data show a much higher content and oxidation ratio in the drought-sensitive barley genotype. These findings are somewhat different from those generally reported in plants susceptible to water deficit, in which ascorbate depletion is observed together with an increased proportion of DHA (Jubany-Mari et al., 2010). These data suggest that ascorbate and glutathione pools do not vary in a similar manner upon water shortage, possibly depending on species and stress conditions.

Regarding low-molecular weight lipophilic antioxidants, we measured in drought conditions a significantly higher  $\alpha$ -tocopherol content in Express than in Salda. Data concerning  $\alpha$ -tocopherol in cereals are very scarce. Those gained in Arabidopsis mutants revealed that this compound prevents photosystem II photoinactivation, protects membrane lipids from photooxidation and acts in concert with another antioxidant mechanism, the xanthophyll cycle (Havaux et al., 2005). This cycle allows the conversion from violaxanthin to zeaxanthin through the intermediate antheraxanthin form, resulting in efficient non-radiative dissipation of light energy within thylakoids (Jahns and Holzwarth, 2012) and in preservation of membranes from oxidative injury (Havaux and Niyogi, 1999). Interestingly, a differential response was noticed

## Author's personal copy

644

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 170 (2013) 633–645

regarding the content in carotenoids participating in this cycle in the two barley genotypes. When exposed for the same period to water shortage, Express displays a twice higher ratio of photo-protective xanthophylls,  $(A + Z)/(A + Z + V)$ , than Salda. Interestingly, when characterizing two wheat cultivars differing in drought tolerance, Loggini et al. (1999) also observed a twice higher  $(A + Z)/(A + Z + V)$  ratio in the sensitive cultivar in water deficit conditions. From our data in barley and those reported in wheat, we conclude that carotenoid-based antioxidant systems, as well as those involving  $\alpha$ -tocopherol, likely constitute defense mechanisms in cereals when severe oxidative damage occurs.

Taken collectively, our data reveal a distinct implementation of antioxidant mechanisms in the responses of the two barley genotypes to water deficit. Indeed, we found that the sensitivity of Express, compared to Salda, is associated with lower CAT and SOD enzymatic capacities and much higher amounts of all low-molecular-weight antioxidant compounds either soluble or not. As proposed by Queval et al. (2007) for mutants devoid of CAT, we can presume that the redox imbalance due to the lower enzymatic capacity in Express triggers the synthesis of low-molecular weight antioxidant components like glutathione, through the activation of signaling pathways. In agreement with this hypothesis, oxidative stress in *Arabidopsis* leads to enhanced expression of genes involved in the biosynthetic pathways of  $\alpha$ -tocopherol (Collin et al., 2008) and of ascorbate (Dowdle et al., 2007; Müller-Moué, 2008). Based on these data, we propose that in Express antioxidant low-molecular weight compounds are induced when the change in ROS content due to cell dehydration result in oxidative stress and severe damage. These compounds would constitute a secondary defense system and could be considered as markers of oxidative damage. Further work is needed to validate this hypothesis in other contrasted plant genotypes for water deficit.

### Acknowledgements

We are very grateful to the Groupe de Recherche Appliquée en Phytotechnologie (CEA, IBEB, SBVME) for technical assistance with growth chambers. We would like also to thank the "Agence Universitaire de la Francophonie (AUF)" for the grant (Ref: 1760, 2008–2009) attributed to M.A. Marok and the "Région Provence Alpes Cotes d'Azur" for financial support to L. Tarrago.

### References

- Abel H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–32.
- Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004;55:373–99.
- Aman G, Mounneveux P, Thin D, Alegre L. Photosynthesis of six barley genotypes as affected by water stress. *Photosynthetica* 1997;14:67–76.
- Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971;44:276–87.
- Berth S, Kuan B, Genty B, Mueller MJ, Triantaphyllidis C, Havaux M. Using spontaneous photon emission to image lipid oxidation patterns in plant tissues. *Plant J* 2011;67:1103–15.
- Bian A. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential: are they compatible, disjunct, or mutually exclusive? *Ann J Agric Res* 2005;56:1159–68.
- van Boekhorst R, Sato K, Komurodani T, Yasuda S, Flachberg G. The domestication of cultivated barley. In: van Boekhorst R, van Hintum T, Knipfler H, Sato K, editors. Diversity in barley (*Hordeum vulgare*). Amsterdam: Elsevier Science BV; 2003. p. 9–27.
- Brois M, Calah S, Eymery F, Roy P. The plastidic 3-cysteine peroxidase is a target for a thiorodoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* 2002;14:3413–22.
- opden Camp RG, Prybylo D, Ochsenbörin C, Lalić C, Kim C, Danon A, et al. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2002;15:2320–32.
- Chaves MM. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J Exp Bot* 1991;42:1–16.
- Cole Y, Lemaire C. Comment: oxazone use become nutrition on site of ions miniraze on horticulture. *Horticulture R* 1971;8:11–4.
- Collin W, Eymery F, Genty B, Roy P, Havaux M, Wiazani E. plays a crucial role in the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to oxidative stress induced by heavy metals. *Plant Cell Environ* 2008;31:344–57.
- Dennig-Adamo B, Adams III RW. Photo-protection and other responses of plants in high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1992;43:589–626.
- Dowdle J, Ishikawa T, Gatzek S, Bolinski S, Seimrock M. Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-L-glucose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J* 2007;52:73–89.
- Ferguson DL, Burke JJ. Methionyl sulfide content and protein-methionine-S-oxide reductase activity in response to water deficits or high temperature. *Physiol Plant* 1994;90:253–8.
- Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G, Sharkey TD. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol* 2004;6:239–52.
- Foyer CH, Noctor G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 2005;28:1056–71.
- Gama F, Berthelin C, Gellhaye E, Meyer Y, Jacquot JP, Roy P, et al. Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx III. *Physiol Plant* 2008;132:599–610.
- Gowaris M, Babu PK, Lachgari VJ, Reddy AM, Wiazani E, Benavides JL, et al. Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *J Exp Bot* 2007;58:253–65.
- Guo F, Ruan M, Grande S, Caccarelli S, Bai G, Li R, et al. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *J Exp Bot* 2008;59:2321–44.
- Havaux M, Eymery F, Perleova S, Roy P, Dörmann P, Wiazani E. protects against photo-inhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2005;17:2451–63.
- Havaux M, Nijogi KK. The violaxanthin cycle protects plants from photo-oxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8762–7.
- Havaux M, Triantaphyllidis C, Genty B. Autofluorescence imaging: a non invasive tool for mapping oxidative stress. *Trends Plant Sci* 2006;11:480–4.
- Ingram J, Bartlett D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996;47:377–403.
- Jahn P, Hothorn AR. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photo-protection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 2012;1817:183–93.
- Jabauy-Mari T, Munné-Busch S, Alegre L. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiol Biochem* 2010;48:251–8.
- Laguer E, Tarrago L, Verita Don Santos C, Eymery F, Havaux M, Roy P. *Arabidopsis thaliana* plastidial methionine sulfide reductase II, MSR2II, account for most leaf peptide MSR activity and are essential for growth under environmental constraints through a role in the preservation of photosystem antennae. *Plant J* 2010;61:271–82.
- Levine RL, Mosoni L, Berlett E, Stalzman ER. Methionine residues as endogenous antioxidant in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15036–40.
- Loggini R, Scarlata A, Brugnoli E, Navari-Iso F. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol* 1999;119:1091–103.
- Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten R, Bernard S, Boyer CH. Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J Exp Bot* 2005;56:417–23.
- McCord JM. Analysis of superoxide dismutase activity. In: Malins MB, editor. Current Protocols in Toxicology. New York: John Wiley & Sons Inc; 1998. p. 7.11–8.
- Miller G, Suzuki N, Chiba-Yaman S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 2010;33:453–67.
- Montillet J, Cacan B, Garnier L, Montcal MH, Douat T, Brocoulle JJ, et al. The upstream oxygen profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stressors. *Plant J* 2004;40:428–51.
- Muñiz S, Oueghizel Z, Berthomieu C, Havaux M, Jungas C, Hajji M, et al. Effects of NaCl on the growth, ion accumulation and photosynthetic parameters of *Thellungiella halophila*. *J Plant Physiol* 2006;163:1022–31.
- Müller-Moué F. An expression analysis of the ascorbate biosynthesis one year VTC2. *Plant Mol Biol* 2006;62:31–41.
- Neumann PM. Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Ann Bot* 2008;101:901–7.
- Noctor G, Boyer CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998;49:249–78.
- Queval G, Isidoro-Bougaret E, Heuberichs BA, Vandorpe M, Gabilho B, Varadaraj H, et al. Conditional oxidative stress responses in the *Arabidopsis* photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of daylength-dependent gene expression, and define photorespiration as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Plant J* 2007;52:640–57.
- Roy P, Bécroune N, Barrault MB, Rameau D, Havaux M, Béras B, et al. The *Arabidopsis thaliana* sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfenic acid reductase involved in photooxidative stress response. *Plant J* 2007;49:505–14.
- Roy P, Calah S, Eymery F, Genty B, Court M, Jacquot JP, et al. Analysis of the protein targeted by CDSF22, a plastidic-thiorodoxin participating in oxidative stress response. *Plant J* 2005;41:31–42.
- Roy P, Pruvot G, Bécroune N, Eymery F, Rameau D, Priller C. A novel thiorodoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant J* 1998;12:97–107.
- Rouhier G, Gellhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, de Roy E, Hirschman M, et al. Poplar peroxidase III, A thiorodoxin-linked antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol* 2004;134:1027–38.

## Author's personal copy

M.A. Marok et al. / Journal of Plant Physiology 170 (2013) 613–645

645

- Roubier N, Lemaire SD, Jacquot JF. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathioneS-transferase. *Ann Rev Plant Biol* 2008;59:143–65.
- Selvaraj RK, Selvaraj GC. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *J Agrom Crop Sci* 2007;185:63–70.
- Serafini M. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 1993;125:27–38.
- Smith K. Stimulation of glutathione synthesis in photosynthetic plants by catalase inhibitors. *Plant Physiol* 1985;79:1044–7.
- Smith K, Kendall AC, Keys AJ, Turner JC, Lea PJ. Increased level of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L). *Plant Sci Lett* 1984;37:29–33.
- Tarrago L, Laugier E, Rey P. Protein-repairing methionine sulfide reductases in photosynthetic organisms: gene organization, reduction mechanism, and physiological roles. *Mol Plant* 2006;2:203–17.
- Tarrago L, Laugier E, Zaffagnini M, Marchand C, Le Maréchal P, Lemaire SD, et al. Plant thioredoxin CD57D regenerates 1-Cys methionine sulfide reductase II activity through the direct reduction of methionic acid. *J Biol Chem* 2010;285:14964–72.
- Veira Dos Santos C, Collin S, Roubier N, Rey P. The Arabidopsis plastidic methionine sulfide reductase II protein: sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfide reductase A and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol* 2005;138:909–22.
- Veira Dos Santos C, Rey P. Plant thioredoxins are key actors in oxidative stress response. *Trends Plant Sci* 2006;11:328–34.

### *A*

- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D. et Shinozaki K.** (1997) Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, **9** : 1859-1868
- Acevedo A., Paleo A.D., Federico M.L.** (2001) Catalase deficiency reduces survival and pleiotropically affects agronomic performance in field-grown barley progeny. *Plant Sci*, **160**:847-855.
- Ahmed I.M., Dai H, Zheng W., Cao F., Zhang G., Sun D., Wu F.** (2013) Genotypic differences in physiological characteristics in the tolerance to drought and salinity combined stress between Tibetan wild and cultivated barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, **63**: 49–60.
- Almeras E., Stolz S., Vollenweider S., Reymond P., Mene-Saffrane L., Farmer E.E.** (2003) Reactive electrophile species activate defense gene expression in Arabidopsis. *Plant J*, **34**: 205-216.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S.** (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot*, **53**:1331-1341.
- Aluru M.R., Yu F., Fu A., Rodermeil S.**(2006) Arabidopsis variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *J Exp Bot*, **57**:1871-1881.
- Apel K. et Hirt H.** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 373-399.
- Arnau G., Monneveux P., This D., Alegre L.** (1997) Photosynthesis of six barley genotypes as affected by water stress. *Photosynthetica*, **14**:67-76.
- Asada K.** (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, **85**: 235-241.
- Asada K.** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**:601-639.
- Asada K.** (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol*, **141**: 191–396.
- Athar H.R., Khan A., Ashraf M.** (2008) Exogenously applied ascorbic acid alleviates salt-induced oxidative stress in wheat. *Env. Exp. Bot*, **63**: 224-231.
- Avsian-Kretchmer O., Gueta-Dahan Y., Lev-Yadun S., Gollop R., Ben-Hayyim G.** (2004) The salt-stress signal transduction pathway that activates the gpx1 promoter is mediated by intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, different from the pathway induced by extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *Plant Physiol*, **135**: 1685-1696.

**Azevedo R.A., Alas R.M., Smith R.J., Lea P.A.** (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. *Physiol. Plant*, **104**: 280-292.

**Azpilicueta C.E., Benavides M.P., Tomaro M.L., Gallego S.M.** (2007) Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves *Plant Physiol. Biochem*, **45**: 589-595.

## B

**Baier M., & Dietz K.J.** (1999) Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic Arabidopsis. *Plant Physiology*, **119**: 1407–1414.

**Baier M., & Dietz K.J.** (2005) Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, **56**: 1449-1462.

**Balmer Y., & Schürmann P.** (2001) Heterodimer formation between thioredoxin f and fructose 1,6- bisphosphatase from spinach chloroplasts. *FEBS Lett*, **492**: 58-61.

**Bartels D., Sunkar R.** (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24**: 23–58.

**Bartoli C.G., Gomez F, Martinez DE, Guiamet J.J** (2004) Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot*, **55**: 1663-1669.

**Baum M., von Korff M., Guo P., Lakew B., Udupa SM., Sayed H., Choumane W, Grando S., Ceccarelli S.** (2007) Molecular approaches and breeding strategies for drought tolerance in barley. In: *Varshney R, Tuberosa r, eds. Genomic assisted crop improvement: vol. 2: genomics applications in crops. The Netherlands: Springer*, 51–79.

**Baxter C.J., Redestig H., Schauer N., Repsilber D., Patil KR., Nielsen J., Selbig J., Liu J., Fernie AR., Sweetlove LJ.** (2007) The metabolic response of heterotrophic Arabidopsis cells to oxidative stress. *Plant Physiology*, **143**: 312-325.

**Beauchamp C., Fridovich I.** (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, **44**:276-87.

**Bennoun P.** (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**:4352-4356.

**Benzerzour H., Monneveux P.** (1993). Analyse des facteurs de stabilité du rendement de l'orge dans les conditions des hauts plateaux de l'Algérie, Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne, Diversité génétique et amélioration variétale, P.Monneveux,M. Ben salem, Eds, *Inra editions, France*, pp 139-158.

**Biehler K., Fock H.,** (1996) Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology*, **112**:265-272.

- Bieza K., Lois R.** (2001) An Arabidopsis mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiology* **126**:1105-1115.
- Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A., Stone J.M., Asai T., Plotnikov J., Denoux C., Hayes T., Gerrish C., Davies D.R., Ausubel F.M., Bolwell G.P.** (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, **47**:851-863.
- Birtic S., Ksas B., Genty B., Mueller M.J., Triantaphylidès C., Havaux M.** (2011) Using spontaneous photon emission to image lipid oxidation patterns in plant tissues. *Plant J*, **67**:1103-1115.
- Biteau B., Labarre J., Toledano M.B.** (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature*, **425**: 980-984.
- Blankenship R.E., Hartman H.** (1998) The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem Sci*, **23**:94-97.
- Blum A.** (2005) Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential-are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *J Agric Res*, **56**:1159-1168.
- Blum A., et Ebercon A.** (1981) Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci*, **21**:43-47.
- Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Van Dorsselear A., Branlant G.A.** (2000) Sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem*, **275**:35908-35913.
- Bowditch M.L., Donaldson R.P.**(1990) Ascorbate free-radical reduction by glyoxysomal membranes. *Plant Physiol*, **94** : 531-537.
- Brandes H.K., Larimer F.W., Geck M.K., Stringer C.D., Schürmann P. et Hartman, F.C.** (1993) Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin f. *J Biol Chem*, **268**: 18411-18414.
- Bray E. A.** (1997) Plant responses to water deficit Trends. *Plant Science*, **2**:48-54.
- Brestic M., Cornic G., Freyer M.J., Baker N.R.** (1995) Does photorespiration protect the photosynthetic apparatus in french bean leaves from photoinhibition during drought stress? *Planta*, **196**: 450-457.
- Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S., Neill S.J.** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *The Plant J*, **45**: 113-122.
- Britt A.B.** (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci.*, **4**:20-25.
- Buchanan B.B., et Wolosiuk R.A.** (1976) Photosynthetic regulatory protein found in animal and bacterial cells. *Nature*, **264**: 669-670.
- Buchert F., Forreiter C.** (2010) Singlet oxygen inhibits ATPase and proton translocation activity of the thylakoid ATP synthase CF<sub>1</sub>CF<sub>o</sub>. *FEBS Lett*, **584**: 147-152.

**Bunce J.A.** (2006). How do leaf hydraulics limit stomatal conductance at high water vapour pressure deficits? . *Plant, Cell and Environment*, **29**: 1644–1650.

**Burrows P.A., Sazanov L.A., Svab Z., Maliga P., Nixon P.J.** (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J*, **17**: 868-876.

## Г

**Cabreiro F., Picot CR., Perichon M., Castel J., Friguet B., Petropoulos I.** (2008) Over expression of mitochondrial methionine sulfoxide reductase B2 protects leukemia cells from oxidative stress-induced cell death and protein damage. *J. Biol. Chem*, **283**:16673-16681.

**Capitani G., Markovic-Housley Z., Del Val G., Morris M., Jansonius J.N., Schürmann P.** (2000) Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *J Mol Biol*, **302**: 135-154.

**Carol P., Kuntz M.** (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci*, **6**:31-36.

**Casano L.M., Zapata J.M., Martín M., Sabater B.** (2000) Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron acceptor between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J Biol Chem*, **275**: 942-948.

**Catalá A.** (2006) An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**: 1482–1495.

**Catalá A.** (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids*, **157** :1-11.

**Ceccarelli S, Grando S, Maatougui M, Michael M, Slash M, Haghparast R, Rahmanian M, Taheri A, Al-Yassin A, Benbelkacem A, Labdi M, Mimoun H, Nachit M.** (2010) Plant breeding and climate changes. *J. Agr. Sci*, **148** :1–11.

**Ceccarelli S.** (1994) Specific adaptation and breeding for marginal conditions. *Euphytica*, **77**:205-219.

**Ceccarelli S., Grando S., Baum M.** (2007) Participatory plant breeding in water-limited environments. *Experimental Agriculture*, **43**:411-435.

**Chaves M.M.** (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *J Exp Bot*, **42**:1–16.

**Chaves M.M., and Oliveira M.M.** (2002) Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany*, **55**:2365-2384.

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

**Chaves MM., Flexas J., Pinheiro C.** (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, **103**:551-560.

**Cheeseman J.M.** (2006) Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *J Exp Bot*, **57**:2435-2444.

**Chen C., Dickman M.B.** (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**:3459-3464.

**Chen Z., Gallie D.R.** (2005) Increasing tolerance to ozone by elevating folia ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance. *Plant Physiol*, **138**: 1673-1689.

**Cho K., Shibato J., Agrawal G.K., Jung Y.H., Kubo A., Jwa N.S., Tamogami S., Satoh K., Kikuchi S., Higashi T., Kimura S., Saji H., Tanaka Y., Iwahashi H., Masuo Y., Rakwal R.** (2008) Integrated transcriptomics, proteomics, and metabolomics analyses to survey ozone responses in the leaves of rice seedling. *J Proteome Res*, **7**:2980-2998.

**Coleman J.O.D., BlakeKalff M.M.A., Davies T.G.E.** (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, **2**: 144-151.

**Collin V., Eymery F., Genty B., Rey P., Havaux M., Vitamin E.** (2008) Plays a crucial role in the tolerance of *Arabidopsis thaliana* to oxidative stress induced by heavy metals. *Plant Cell Environ*, **31**:244-57.

**Collins A.R** (2001) Carotenoids and genomic stability. *Mutat Res*, **475**:21-28.

**Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J** (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, **17**:1195-1214.

**Cornic G.** (1994) Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In: Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field (N.R. Baker, J.R. Boyer, Eds.), Bios Scientific Publishers, Oxford, 297-313.

**Corpas F.J., Barroso J.B., Del Río L.A** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci*, **6**: 145-150.

**Cournac L., Josse E-M, Joët T., Rumeau D., Redding K., Kuntz M., Peltier G.** (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philos Trans R. Soc London B*, **355**:1447-1454.

## D

**Dai C., Wang M-H.** (2012) Characterization and functional analysis of methionine sulfoxide reductase A gene family in tomato. *Mol Biol Rep*, **39**:6297-6308.

**Dalton D.A., Baird L.M., Langeberg L., Taugher CY., Anyan W.R., Vance C.P., Sarath G.** (1993) Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) root nodules. *Plant Physiol*, **102**: 481-489.

- Dalton T.P., Shertzer H.G., Puga A.** (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**: 67-101.
- Davies M.J.** (2005) The oxidative environment and protein damage *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**: 93-109.
- Davies K.J.A.** (2000) Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, **50**: 279-289.
- Davison P.A., Hunter C.N., Horton P.** (2002) Over expression of beta-carotene hydroxylase enhances stress tolerance in Arabidopsis. *Nature*, **418**:203-6.
- Del Rio L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J.B.** (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp. Bot.*, **53**: 1255-1272.
- Del Rio L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A., Zilinskas B.A.** (2003a) Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence *J. Exp. Bot.*, **54**: 923-933.
- Del Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Barroso J.B.** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiol.*, **141**: 330-335.
- Del Rio L.A., Sandalio L.M., Corpas F.J., Palma J.M., Romero-Puertas M.C., Gomez M., Barroso J.B.** (2003b) Peroxisomes in oxidative stress and cell signaling. *Free Radical Research*, **37**: 3232.
- Della Penna D., Pogson B.J.** (2006) Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol.*, **57**:711-738.
- Demmig-Adams B., Adams WW.III.** (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*,**43**:599–626.
- Demmig-Adams B., Adams WW.III., Mattoo A.** (2006) Photoprotection, photoinhibition, gene regulation and environment. *Advances in photosynthesis and respiration. Dordrecht; Springer*, **21**: 380 p.
- Desikan R., A-H Mackerness S., Hancock J.T., Neill S.J.** (2001) Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*, **127**: 159–172.
- Dever L.V., Blackwell R.D., Fullwood N.J., Lacuesta M., Leegood R.C., Onek L.A., Pearson, M., Lea P.J.** (1995) The isolation and characterization of mutants of the C4photosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.*, **46**:1363-76.
- Deyholos M.K.** (2010) Making the most of drought and salinity transcriptomics. *Plant, Cell and Environment*, **33**:648-654.
- Dietz K.J.** (2011) Peroxiredoxins in Plants and Cyanobacteria. *Antioxid Redox Signal*, **15**:1129-1159.

**Dix T.A., Aikens J.** (1993) Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol.* **6**: 2-18.

**Dixon D.P., Davis B.G., Edwards E.** (2002) Functional divergence in the glutathione transferase super-family in plants: identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **277**: 30859-30869.

**Dixon D.P., Skipsey M., Edwards R.** (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, **71**:338-50.

**Dowdle J., Ishikawa T., Gatzek S., Rolinski S., Smirnoff N.** (2007) Two genes in *Arabidopsis thaliana* encoding GDP-l-galactose phosphorylase are required for ascorbate biosynthesis and seedling viability. *Plant J*, **52**:73-89.

**Dybing E., Nelson J.R., Mitchell J.R., Sesame H.A., Gillette J.R.,** (1976) Oxidation of a methyl dopa and other catechols by chytochromes R450-generated superoxide anion: possible mechanism of methyl dopa hepatitis. *Mol. Pharmacol.*, **12**: 911-920.

## £

**Elstner E.F.** (1991) Mechanism of oxygen activation in different compartments. E.J. Pell, K.L. Steffen (Eds.), *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*, *American Society of Plant Physiologists*, Roseville:13-25.

**Eltayeb A.E., Kawano N., Badawi G.H., Kaminaka H., Sanekata T., Morishima I., Shibahara T., Inanaga S., Tanaka K** (2006) Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Plant*, **127**: 57-65.

**Emerson J.P., Coulter E.D., Phillips R.S., et Kurtz D.M.Jr.** (2003) Kinetics of the superoxide reductase catalytic cycle. *J Biol Chem*, **278**: 39662-39668.

**Evans M.C.W., Nugent J.H.A., Ball R.J., Muhiuddin I., Pace R.J.** (2004) Evidence for a direct manganese-oxygen ligand in water binding to the S-2 state of the photosynthetic water oxidation complex. *Biochemistry*, **43**: 989-994.

## F

**Faltin Z., Camoin L., Ben-Hayyim G., Perl A., Beeor-Tzahar T., Strosberg A.D., Holland D., Eshdat Y.** (1998) Cysteine is the presumed catalytic residue of *Citrus sinensis* phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase over-expressed under salt stress. *Physiologia Plantarum*, **104**: 741-746.

**Fam S.S., Morrow J.D.** (2003) The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation-a review. *Curr. Med. Chem*, **10**: 1723-1740.

**FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations** (2013) Land Resources. [http://www.fao.org/economic/ess/ess-home/en/#.UcF1tY3E\\_Tp](http://www.fao.org/economic/ess/ess-home/en/#.UcF1tY3E_Tp). last accessed 19th June.

**Farmer E.E., Davoine C.** (2007) Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol*, **10**: 380- 386.

- Ferguson D.L., Burke J.J.**, (1994) Methionyl sulfoxide content and protein-methionine-S-oxide reductase activity in response to water deficits or high temperature. *Physiol Plant*, 90:253-8.
- Ferreira R.R., Fornazier R.F., Vitoria A.P., Lea P.J., Azevedo R.A** (2002) Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *J. Plant Nutr*, 25:327-342.
- Finazzi G., Barbagallo R.P., Bergo E., Barbato R., Forti G.**, (2001) Photoinhibition of *Chlamydomonas reinhardtii* in State 1 and State 2: damages to the photosynthetic apparatus under linear and cyclic electron flow. *J Biol Chem*, 276: 22251-22257.
- Fischer B.B., Krieger-Liszkay A., Hideg E., Snyrychova I., Wiesendanger M., Eggen R.I.** (2007) Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Febs Letters*, 581: 5555-5560.
- Flexas J., Bota J., Galmes J., Medrano H., Ribas-Carbo M.** (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol Plant* , 127 :343-352.
- Flexas J., Bota J., Loreto F., Cornic G., Sharkey T.D.** (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology*, 6:269-279.
- Flors C., Nonell S.** (2006) Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenolone phytoalexins. *Acc. Chem. Res*, 39: 293-300.
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies J.M., Dolan L.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422:442-446.
- Foyer C.H, Noctor G.** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signalling, acclimation and practical implications. *Antioxid Redox Signal*, 11:861-905.
- Foyer C.H., Bloom A.J., Queval G., Noctor G.** (2009) Photorespiratory Metabolism Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 455-484.
- Foyer C.H., Halliwell B** (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133: 21-25.
- Foyer C.H., Noctor G** (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17: 1866-1875.
- Foyer C.H., Noctor G** (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Sign*, 11:861-905.
- Foyer C.H., Noctor G.** (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist*, 146:359-388.
- Foyer C.H., Noctor G.** (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant*, 119: 355-364.
- Fridovich I.** (1997) Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem*, 272:18515-18517.

**Frova C.**, (2003) The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution *Physiol. Plant*, **119**: 469-479.

**Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L., McClung C.R.** (1996) Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant. Physiol*, **112**: 327-336.

**Fukai S., Cooper M.** (1995) Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Res*, **40** : 67-86.

**Fukai S., Pantuwan G., Jongdee B., Cooper M.** (1999) Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Res*, **64** :61-74.

## G

**Galmés J., Ribas-Carbó M., Medrano H., Flexas J.** (2010) Rubisco activity in Mediterranean species is regulated by the chloroplastic CO<sub>2</sub> concentration under water stress. *Journal of Experimental Botany*, **62**:653-665.

**Gama F., Bréhelin C., Gelhaye E., Meyer Y., Jacquot J.P., Rey P., Rouhier N.** (2008) Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx IIE. *Physiol Plant* **131**:599-610.

**Gao X.H., Zaffagnini M., Bedhomme M., Michelet L., Cassier-Chauvat C., Decottignies P. & Lemaire S.D.** (2010) Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii*: kinetics and specificity in deglutathionylation reactions. *FEBS Letters*, **584**: 2242–2248.

**Gapiska M., Skodowska M., Gabara B** (2008) Effect of short- and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. *Acta Physiol Plantarum*, **30**: 11-18.

**Garcia-Plazaola JI, Hernández A, Olano JM, Becerril JM** (2003) The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. *Functional Plant Biology*, **30**:319-324.

**Garg N., Manchanda G.** (2009) ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosys*, **143**:8-96.

**Ghannoum O.** (2009) C4 photosynthesis and water stress. *Annals of Botany*, **103**:635-644.

**Ghezzi P., Bonetto V.** (2003) Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics*, **3**: 1145-1153.

**Gilbert H.F** (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**: 69-172.

**Gill S.S., Tuteja N.** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, **48**: 909-930.

**Golding A.J., Finazzi G., & Johnson G.N.** (2004) Reduction of the thylakoid electron transport chain by stromal reductants - evidence for activation of cyclic electron transport upon dark adaptation or under drought. *Planta*, **220**: 356-363.

**Gonzalez-Meler M.A., Ribas-Carbo M., Giles L., Siedow J.N.** (1999) The effect of growth and measurement temperature on the activity of the alternative respiratory pathway. *Plant Physiol*, **120**:765-772.

**Gorantla M, Babu P.R., Reddy Lachagari V.B., Reddy A.M.M., Wusirika R., Bennetzen J.L., Reddy A.R.** (2007) Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. *J Exp Bot*, **58**:253-265.

**Gould KS., McKelvie J., Markham K.R.** (2002) Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell and Environment*, **25**: 1261-1269.

**Guo G, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai G, Li R, von Korff M, Varshney RK, Graner A, Valkoun J** (2009) Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *J Exp. Bot*, **60**:3531-3544.

**Guo X., Wu Y., Wang Y., Chen Y., Chu C.** (2009) OsMSRA4.1 and OsMSRB1.1, two rice plastidial methionine sulfoxide reductases, are involved in abiotic stress responses. *Planta*, **230**:227-238.

## H

**Halliwell B. & Gutteridge J.M.C.** (1999) In: Oxidative stress, in Free Radicals in Biology and Medicine 3rd ed. Halliwell B., Gutteridge J.M.C., editors. Oxford University Press; New York: pp. 246–350.

**Halliwell B.** (2006) Reactive species and antioxidants redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, **141**: 312-322.

**Halliwell B., Foyer C.H.** (1978) Properties and physiological function of a glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta*, **139**: 9-17.

**Hancock J., Desikan R., Harrison J., Bright J., Hooley R., Neill S** (2006) Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J. Exp. Bot*, **57**: 1711-1718.

**Harbinson J., & Foyer C.H** (1991) Relationships between the efficiencies of photosystems I and II and stromal redox state in CO<sub>2</sub>-free air - evidence for cyclic electron flow in vivo. *Plant Physiology*, **97**: 41-49.

**Harinasut P., Poonsopa D., Roengmongkol K., Charoensataporn R.** (2003) salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Sci. Asia*, **29**: 109-113.

**Hatz S., Lambert J.D.C., Ogilby P.R** (2007) Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability Photochem. *Photobiol. Sci*, **6**: 1106-1116.

**Häusler R.E., Geimer S., Kunz H.H., Schmitz J., Dormann P., Bell K., Hetfeld S., Guballa A. & Flugge U.I.** (2009) Chlororespiration and grana hyperstacking: how an Arabidopsis double mutant can survive despite defects in starch biosynthesis and daily carbon export from chloroplasts. *Plant Physiology*, **149**: 515-533.

- Havaux M., Dall'Osto L., Bassi R.** (2007) Zeaxanthin has Enhanced Antioxidant Capacity with Respect to All Other Xanthophylls in Arabidopsis Leaves and functions independent of binding to PSII antennae. *Plant Physiol.* **145**:1506–1520.
- Havaux M., Eymery F., Porfirova S., Rey P., Dörmann P.** (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **17**:3451-3469.
- Havaux M., Niyogi K.K.** (1999) The violaxanthin cycle protects plants from photo-oxidative damage by more than one mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**:8762–8767.
- Havaux M., Triantaphylidès C., Genty B.** (2006) Autoluminescence imaging: a non invasive tool for mapping oxidative stress. *Trends in Plant Science*, **11**:480-484.
- Hayashi M., Nishimura M.** (2003) Entering a new era of research on plant peroxisomes *Curr Opin Plant Biol*, **6** : 577-582.
- Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P** (2002) Two GPXlike proteins from Lycopersicon esculentum and Helianthus annuus are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry*, **269**: 2414-2420.
- Herrera E., Barbas C.** (2001) Vitamin E action, metabolism et perspectives. *J Physiol Biochem*, **57**: 43-56.
- Hoepfner D., Schildknecht D., Braakman I., Philippsen P., Tabak H.F.** Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell*, **122**: 85–95.
- Hofmann B., Hecht H.J., Flohé L.** (2002) Peroxiredoxins. *Biol Chem.* **383**:347-364.
- Hollander-Czytko H., Grabowski J., Sandorf I., Weckermann K., Weiler E.W** (2005) Tocopherol content and activities of tyrosine aminotransferase and cystine lyase in Arabidopsis under stress conditions. *J Plant Physiol*, **162**: 767-770.
- Holmgren A.** (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*, **264**:13963-13966.
- Holmgren A.** (1995) Thioredoxin structure and mechanism conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, **3**: 239-243.
- Holmgren A., & Bjornstedt M.** (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* **252**: 199- 208.
- Holt N.E., Fleming G.R., Niyogi K.K.** (2004) Toward an understanding of the mechanism of non photochemical quenching in green plants. *Biochemistry*, **43**: 8281-8289.
- Horling F., Lamkemeyer P., König J., Finkemeier I., Kandlbinder A., Baier M., Dietz K.J.** (2003) Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **131**:317-325.
- Hossain M.A., Asada K** (1984) Purification of dehydroascorbate reductase from spinach and its characterization as a thiol enzyme. *Plant and Cell Physiol*, **25**: 85-92.

**Hossain M.A., Nakano Y., et Asada K.** (1984) Monodehydroascorbate Reductase in Spinach Chloroplasts and Its Participation in Regeneration of Ascorbate for Scavenging Hydrogen Peroxide. *Plant Cell Physiol*, **25**: 385-395.

**Hossain Z., Mandal A.K., Kumar Datta S., Biswas A.K.** (2006) Decline in ascorbate peroxidase activity--a prerequisite factor for tepal senescence in gladiolus. *J Plant Physiol*, **163**:186–194.

**Hu J.P** (2007) Toward understanding plant peroxisome proliferation. *Plant Sig Behav*, **2**: 308-310.

**Huang C., He W., Guo J., Chang X., Su P., Zhang L.** (2005) Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient Arabidopsis mutant. *J Exp Bot*. **56**:3041-9.

## J

**Iglesias-Baena I., Barranco-Medina S., Lázaro-Payo A., López-Jaramillo FJ., Sevilla F., Lázaro J.J.** (2010) Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *J Exp Bot*, **61**:1509-21.

**Imlay J.A.** (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry*, **77**:755-776.

**Ingram J., Bartels D.** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **47**:377-403.

**Issakidis E., Lemaire M., Decottignies P., Jacquot J.P., Miginiac-Maslow M.** (1996) Direct evidence for the different roles of the N- and C-terminal regulatory disulfides of sorghum leaf NADP-malate dehydrogenase in its activation by reduced thioredoxin. *FEBS Lett*, **392**: 121-124.

## L

**Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H., Mylona P., Miedema H., Torres M.A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J.D., Davies J.M., Dolan L.** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**:442-446.

**Jacquot J.P., Lopez-Jaramillo J., Miginiac-Maslow M., Lemaire S., Cherfils J., Chueca A., Lopez-Gorge J.** (1997) Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett*, **401**: 143-147.

**Jahns P., Holzwarth A.R.** (2012) The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochim Biophys Acta*, **1817**:182-93.

**Jimenez A., Hernandez J.A., Del Rio L.A., Sevilla F.** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, **114**: 275-284.

**Jimenez A., Hernandez J.A., Pastori G., Del Rio L.A., Sevilla F.** (1998) Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol*, **118**:1327-1335.

**Job C., Rajjou L., Lovigny Y., Belghazi M., Job D.** (2005) Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination. *Plant Physiol*, **138**:790-802.

**Johnson T.L., & Olsen, L.J.** (2001) Building new models for peroxisome biogenesis. *Plant Physiol*. **127** : 731–739.

**Jones H.G.** (1992) *Plant and Microclimates* (Ed): A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University Press, London.

**Jones H.G.** (2007) Monitoring plant and soil water status: established and novel methods revisited and their relevance to studies of drought tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **58**:119-130.

**Jubany-Mari T., Munné-Bosch S., Alegre L.** (2010) Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiol Biochem*, **48**:351-8.

**Jung B.G., Lee K.O., Lee S.S., Chi Y.H., Jang H.H., Kang S.S., Lee K., Lim D., Yoon S.C., Yun D.J., Inoue Y., Cho M.J., Lee S.Y.** (2002) A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 12572-12578.

## K

**Kagawa T., Sakai T., Suetsugu N., Oikawa K., Ishiguro S., Kato T., Tabata S., Okada K., Wada M.** (2001) Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science*, **291**, 2138-2141.

**Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A.** (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, **31**:671-701.

**Kao W.Y., Forseth I.N.** (1992) Responses of gas exchange and phototropic leaf orientation in soybean to soil water availability, leaf water potential, air temperature, and photosynthetic photon flux. *Environmental and Experimental Botany*, **32**: 153-161.

**Kim H.Y., Kim J.R.** (2008) Thioredoxin as a reducing agent for mammalian methionine sulfoxide reductases B lacking resolving cysteine. *Biochem Biophys Res Commun*, **371**:490-494.

**Kim J., van Iersel M.W.** (2011) Slowly developing drought stress increases photosynthetic acclimation of *Catharanthus roseus*. *Physiologia Plantarum*, **143**: 166-177.

**King A., Gottlieb E., Brooks D.G., Murphy M.P., Dunaief J.L.** (2004) Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol*, **79**: 470-475.

**Koc A., Gasch A.P., Rutherford J.C., Kim H.Y., Gladyshev V.N.** (2004) Methionine sulfoxide reductase regulation of yeast lifespan reveals reactive oxygen species-dependent and -independent components of aging. *Proc Natl Acad. Sci. U S A*, **101**:7999-8004.

**Korte F., Kvesitadze G., Ugrekhelidze D., Gordeziani M., Khatisashvili G., Buadze O., Zaalishvili G., Coulston F.** (2000) Organic toxicants and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**: 1-26.

**Kozaki A., Takeba G.** (1996) Photorespiration protects C3 plants from photooxidation. *Nature*, **384**: 557-560.

**Krieger-Liszkay** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot*, **56**: 337–346.

**Krieger-Liszkay A., Fufezan C., Trebst A.** (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Res*, **98**:551-564.

**Kumar D., Yusuf M.A., Singh P., Sardar M., Sarin N.B.**(2013) Modulation of antioxidant machinery in  $\alpha$ -tocopherol-enriched transgenic Brassica juncea plants tolerant to abiotic stress conditions. *Protoplasma*, **250**:1079-89.

**Kumar R.A., Koc A., Cerny R.L., Gladyshev V.N.** (2002) Reaction mechanism, evolutionary analysis, and role of zinc in Drosophila methionine-R-sulfoxide reductase. *J. Biol. Chem*, **277**:37527-37535.

**Kuntz M.**(2004) Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta*,**218**:896-899.

## L

**Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

**Larson R.A.** (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, **27**:969-978.

**Laugier E., Tarrago L., Vieira Dos Santos C., Eymery F., Havaux M., Rey P.** (2010) Arabidopsis thaliana plastidial methionine sulfoxide reductases B, MSRBs, account for most leaf peptide MSR activity and are essential for growth under environmental constraints through a role in the preservation of photosystem antennae. *Plant J*, **61**:271-282.

**Laureau C., DE Paepe R., Latouche G., Moreno-Chacón M., Finazzi G., Kuntz M., Cornic G., Streb P.**(2013) Plastid terminal oxidase (PTOX) has the potential to act as a safety valve for excess excitation energy in the alpine plant species Ranunculus glacialis L. *Plant Cell Environ*,**36**:1296-1310

**Laurent T.C., Moore E.C., Reichard P.** (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from escherichia coli b. *J Biol Chem*, **239**: 3436-3444.

**Lawlor D.W., Tezara W.** (2009) Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany*, **103**:561-579.

**Lawlor DW** (2009) Musings about the effects of environment on photosynthesis. *Annals of Botany* , **103**:543-549.

**Lemaire S.D.**, (2004) The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms. *Photosynthesis Research*, **79**: 305–318.

**Lennon A.M., Prommeenate P., Nixon P.J.**( 2003) Location, expression and orientation of the

putative chlororespiratory enzymes, Ndh and IMMUTANS, in higher-plant plastids. *Planta*, **218**:254-260.

**Levine R.L., Mosoni L., Berlett B., Stadtman E.R.** (1996) Methionine residues as endogenous antioxidant in proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 15036-15040.

**Li S., Lauri A., Ziemann M., Busch A., Bhave M. & Zachgo S.** (2009) Nuclear activity of ROXY1, a glutaredoxin interacting with TGA factors, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **21**: 429–441.

**Li W.J., Feng H., Fan J.H., Zhang R.Q., Zhao N.M., Liu J.Y.** (2000) Molecular cloning and Expression of A phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*. *Biochim. Biophys Acta*, **1493**:225-230.

**Li Y., Sommerfeld M., Chen F., Hu Q.** (2008) Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: a protective mechanism against oxidative stress in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Plant Physiol.* **165**:1783-1797.

**Li Y., Sommerfeld M., Chen F., Hu Q.** (2010) Effect of photon flux densities on regulation of carotenogenesis and cell viability of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J Appl Phycol*, **22**:253-263.

**Lim J.C., Choi H.I., Park Y.S., Nam H.W., Woo H.A., Kwon K.S., Kim Y.S., Rhee, S.G., Kim K., Chae H.Z.** (2008) Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity. *J Biol Chem*, **283**: 28873-28880.

**Lin C.** (2002) Phototropin blue light receptors and light-induced movement responses in plants. *Sci STKE*. **2002**: pe5

**Liu K., Sun J., Song Y.G., Liu B., Xu Y.K., Zhang S.X., Tian Q., Liu Y.** (2004) Superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in D1/D2/cytochrome b-559 Photosystem II reaction center complex. *Photosynthesis Research*, **81**: 41-47.

**Liu X., Hua X., Guo J., Qi D., Wang L., Liu Z., Jin Z., Chen S., Liu G.** (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic tobacco plants overexpressing VTE1 for increased tocopherol production from *Arabidopsis thaliana*. *Biotec. Lett*, **30**:1275-1280.

**Lombard M., Fontecave M., Touati D., Niviere V.** (2000) Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion. Evidence for a superoxide reductase activity. *J Biol Chem*, **275** : 115-121.

**Løvdaal T., Olsen K.M., Slimestad R., Verheul M., Lillo C.** (2010) Synergetic effects of nitrogen depletion, temperature, and light on the content of phenolic compounds and gene expression in leaves of tomato. *Phytochemistry*, **71**:605-613.

**Lowther W.T., Weissbach H., Etienne F., Brot N., Matthews B.W.** (2002) The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat. Struct. Biol*, **9**:348-352.

**Loyola J., Verdugo I., González E., Casaretto J.A., Ruiz-Lara S.** (2012) Plastidic isoprenoid biosynthesis in tomato: physiological and molecular analysis in genotypes resistant and sensitive to drought stress. *Plant Biol*, **14** : 149–156.

**Ludlow M.M., Muchow R.C.** (1990) A critical evaluation of traits for improving crop yields in water limited environments. *Adv Agron*, **43**: 107-53.

**Luna C.M., Pastori G.M., Driscoll S., Groten K., Bernard S., Foyer C.H.** (2005) Drought controls on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *J Exp Bot* **56**:417-423.

## M

**Marchand C., Le Maréchal P., Meyer Y., Miginiac-Maslow M., Issakidis-Bourguet E., Decottignies P.** (2004) New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics*, **4**:2696-2706.

**Maury P., Mojayad F., Berger M., Planchon C.** (1996) Photosynthesis response to drought acclimation in two sunflower genotypes. *Physiol Plant*, **98**:57–66.

**McCord J.M.** (2001) Analysis of superoxide dismutase activity. *Current Protoc Toxicol*. Chapter 7:Unit7.3.

**McDowell J.M., Dangl J.L.** (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem Sci*, **25**:79-82.

**Medrano H., Escalona J.M., Cifre J., Bota J., Flexas J.** (2003) A ten-year study on the physiology of two Spanish grapevine cultivars under field conditions: effects of water availability from leaf photosynthesis to grape yield and quality. *Functional Plant Biology*, **30** : 607-619.

**Mehler A.H.** (1951) Studies on reactivities of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem Biophys*, **33**: 65-77.

**Mendoza-Cózatl D.G., Butko E., Springer F., Torpey J.W., Komives E.A., Kehr J., Schroeder J.I.** (2008) Identification of high levels of phytochelatin, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long-distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *The Plant Journal* **54** : 249–259.

**Meyer A.J.** (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol*, **165**:1390-1403.

**Meyer Y., Siala W., Bashandy T., Riondet C., Vignols F., Reichheld J.P** (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta*, **1783** : 589-600.

**Meyer Y., Verdoucq L., Vignols F** (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins identity and putative roles. *Trends Plant Sci*, **4** : 388-394.

**Mhamdi A., Queval G., Chaouch S., Vanderauwera S., Van Breusegem F., Noctor G.** (2010) Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot*. **61**:4197-220.

- Milla M.A.R., Maurer A, Huete A.R, Gustafson J.P.** (2003) Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *The Plant Journal*, **36**: 602-615.
- Millenaar F.F., Benschop J.J., Wagner A.M., Lambers H.** (1998) The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase. *Plant Physiol*, **118**:599-607.
- Miller G., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S., Mittler R.** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ*, **33**:453-67.
- Mittler R.** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, **7**:405-410.
- Mittler R., Kim Y., Song L., Coutu J., Coutu A., Ciftci-Yilmaz S., Lee H., Stevenson B., Zhu J.K.** (2006) Gain- and loss-of-function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress. *FEBS Letters*, **580**: 6537-6542.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F.** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, **9**:490-498.
- Miyake C., Asada K.** (1992) Thylakoid bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant Cell Physiol*. **33**: 541-553.
- Miyake C., Miyata M., Shinzaki Y., Tomizawa K.** (2005) CO<sub>2</sub> response of cyclic electron flow around PSI (CEF-PSI) in tobacco leaves - relative electron fluxes through PSI and PSII determine the magnitude of non-photochemical quenching (NPQ) of Chl fluorescence. *Plant and Cell Physiology*, **46**: 629-637.
- Møller I.M.** (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species Annu. Rev. Plant Physiol. *Plant Mol. Biol*, **52**:561-591.
- Møller I.M. and Sweetlove L.J.** (2010) ROS signaling-specificity is required. Trends in *Plant Science*, **15** : 370-374.
- Møller I.M., Jensen P.E. Hansson A.** (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, **58**: 459-481.
- Montillet J.L., Cacas J.L., Garnier L., Montané M.H., Douki T., Bessoule J.J., Polkowska-Kowalczyk L., Maciejewska U., Agnel J.P., Vial A., Triantaphylidès C.** (2004) The upstream oxylipin profile of Arabidopsis thaliana: a tool to scan for oxidative stresses. *PlantJ*, **40**:439-51.
- Morosinotto T., Breton J., Bassi R., Croce R.** (2003) The nature of a chlorophyll ligand in Lhca proteins determines the far red fluorescence emission typical of photosystem I. *Journal of Biological Chemistry*, **278**: 49223-49229.
- Mosblech A., Feussner I., Heilmann I.** (2009) Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol Biochem*, **47**: 511-517.
- Moskovitz J., Berlett B.S., Poston J.M., Stadtman E.R.** (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**:9585-9589.

**Mueller M.J.** (2004) Archetype signals in plants: The phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**:441–48.

**Mueller M.J., Berger S.** (2009) Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry*, **70**:1511-21.

**Mueller S., Hibert B., Dueckershoff K., Roitsch T., Krischke M., Mueller M.J., Berger S.** (2008) General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. *Plant Cell*, **20**: 768-785.

**Müller-Moulé P.** (2008) An expression analysis of the ascorbate biosynthesis enzyme VTC2. *Plant Mol Biol*, **68**:31-41.

**Mullineaux P.M., Rausch T.** (2005) Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthetic Res*, **86**:459-474.

**Müller P., Li XP., Niyogi K.K.** (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol*, **125**: 1558-1566.

**Munné-Bosch S.** (2005) The role of -tocopherol in plant stress tolerance. *J. Plant Physiol*, **162**:743-748.

## N

**Nakano Y., Asada K.** (1981) Hydrogen-peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach-chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **22**: 867-880.

**Navrot N., Rouhier N., Gelhaye E., Jaquot J.P.** (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiol. Plant*, **129**:185-195.

**Neumann P.M.** (2008) Coping mechanisms for crop plants in drought-prone environments. *Ann Bot*, **101**:901-907.

**Niviere V., Fontecave M.** (2004) Discovery of superoxide reductase: an historical perspective. *J Biol InorgChem*, **9** :119-123.

**Nixon P.J** (2000) Chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**:1541-1547.

**Niyogi K.K.** (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **50**:333-359.

**Niyogi K.K.** (2000) Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, **3**: 455-460.

**Niyogi K.K., Shih C., Chow W.S., Pogson B.J., DellaPenna D., Bjorkman O.** (2001) Photoprotection in a zeaxanthin-and lutein-deficient double mutant of Arabidopsis. *Photosynthetic Res*, **67**:139-145.

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

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

**Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H.** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot*, **53**:1283-1304.

**Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Queval G., Foyer C.H.** (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell and Environment*, **35**:454–484.

**Noctor G., Paepe R.D., Foyer C.H.** (2006) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci*, **12**:125-134.

**Noctor G., Queval G., Mhamdi A., Chaouch S., Foyer C.H.** (2011) *Glutathione. Arabidopsis Book*, doi: 10.1043/tab.0142.

**Noguchi K., Yoshida K.** (2008) Interaction between photosynthesis and respiration in illuminated leaves. *Mitochondrion*, **8**:87-99.

**Noguera-Mazon V., Krimm I., Walker O., Lancelin J.M.** (2006) Protein-protein interactions within peroxiredoxin systems. *Photosynth Res*, **89**:277-290.

**Nyathi Y., Baker A** (2006) Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochim Biophys Acta*, **1763**: 1478-1495.

0

**Ohlrogge, J. and Browse, J.** (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell*, **7**: 957–970.

**Olsen K.M., Hehn A., Jugde H., Sliemstad R., Larbat R., Bourgaud F., Lillo C.** (2010) Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol*. **10**:21.

**Opden Camp R.G., Przybyla D., Ochsenein C., Laloi C., Kim C., Danon A., Wagner D., Hideg E., Gobel C., Feussner I., Nater M., Apel K.** (2003) Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**:2320-2332.

**Osmond C.B., Grace S.C.** (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *J Exp Botany*, **46**:1351-1362.

**Ordog S.H., Higgins V.J., Vanlerberghe G.C.** (2002) Mitochondrial alternative oxidase is not a critical component of plant viral resistance but may play a role in the hypersensitive response. *Plant Physiol*, **129**:1858-65.

**Oukarroum A., Madidi S.E., Schansker G., Strasser R.J.** (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*, **60**: 438–446.

## P

- Palatnik J.F., Valle E.M., Federico M.L., Gómez L.D., Melchiorre M.N., Paleo A.D., Carrillo N., Acevedo A.** (2002) Status of antioxidant metabolites and enzymes in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci.* **162**: 363–371.
- Parisy V., Poinssot B., Owsianowski L., Buchala A., Glazebrook J., Mauch F.** (2006) Identification of PAD2 as a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance in Arabidopsis. *Plant J.* **49**: 159-172.
- Parry M.A.J., Andralojc P.J., Khan S., Lea P., Keys A.J.** (2002) Rubisco Activity effects of drought stress. *Annals of Botany*, **89**:833-839.
- Passioura J.B.** (1977) Grain yield, harvest index and water use of wheat. *J Aust Agric Sci*, **43**: 117-20.
- Passioura J.B.** (1996) Passioura JB (1996) Drought and drought tolerance. *Plant Growth Regulation*, **20**: 79–83.
- Pastore D., Trono D., Laus M.N., N. Fonzo Di, Flagella Z.** (2007) Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *J. Exp. Bot.* **58**:195-210.
- Peltier G., Cournac L.** (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol*, **53**:523-50.
- Peng C.L., Ou Z.Y., Liu N., Lin G.Z.** (2005) Response to high temperature in flag leaves of super high-yielding rice Pei'ai 64S/E32 and Liangyoupeijiu. *Rice Sci*, **12**:179-186.
- Pérez-López U., Robredo A., Lacuesta M., Sgherri C., Muñoz-Rueda A., Navari-Izzo F., Mena-Petite A.** (2009) The oxidative stress caused by salinity in two barley cultivars is mitigated by elevated CO<sub>2</sub>. *Physiol Plant*, **135**:29-42.
- Pfannschmidt T.** (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends Plant Sci*, **8**:33-41.
- Pfannschmidt T., Brautigam K., Wagner R., Dietzel L., Schroter Y., Steiner S. & Nykytenko A.** (2009) Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Annals of Botany*, **103** : 599-607.
- Pitzschke A., Forzani C., Hirt H.** (2006) Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, **8**: 1757-1764.
- Poole L.B., Karplus, P.A., Claiborne A.** (2004) Protein sulfenic acids in redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **44** : 325-347.
- Pracharoenwattana I., Smith S.M.** (2008) When is a peroxisome not a peroxisome? *Trends Plant Sci*, **13**:522–525.
- Puntarulo S., Sanchez R.A., Boveris A.** (1988) Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination, *Plant Physiol.* **86**:626-630.

**Pyngrope S., Bhoomika K., Dubey R.S.**(2013) Reactive oxygen species, ascorbate–glutathione pool, and enzymes of their metabolism in drought-sensitive and tolerant indica rice (*Oryza sativa L.*) seedlings subjected to progressing levels of water deficit. *Protoplasma*. **250**:585–600.

**Q**

**Quan L.J., Zhang B., Shi W.W., Li H.Y** (2008) Hydrogen peroxide in plants: a versatile molecule of the reactive oxygen species network *J. Integrat. Plant Biol*, **50**:2-18.

**Queval G, Issakidis-Bourguet E, Hoerberichts FA, Vandorpe M, Gakière B, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Van Breusegem F, Noctor G.** ( 2007) Conditional oxidative stress responses in the Arabidopsis photorespiratory mutant *cat2* demonstrate that redox state is a key modulator of day length dependent gene expression, and define photoperiod as a crucial factor in the regulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. *Plant J*, **52**:640-57.

**Queval G., Jaillard D., Zechmann B., Noctor G..** (2011) Increased intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability preferentially drives glutathione accumulation in vacuoles and chloroplasts. *Plant Cell Environ*. **34**:21-32.

**R**

**Raha S., Robinson B.H.** (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci*, **25**:502-508.

**Ramel F., Birtic S., Cuiné S., Triantaphylidès C., Ravanat J.L., Havaux M.** (2012a) Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiol*, **158**:1267-78.

**Ramel F., Birtic S., Ginies C., Soubigou-Taconnat L., Triantaphylidès C., Havaux M.** (2012b) Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **109**:5535-40.

**Ramel F., Mialoundama A.S., Havaux M.** (2013) Nonenzymic carotenoid oxidation and photooxidative stress signalling in plants. *J Exp Bot*, **64**:799-805.

**Rasmusson A.G., Soole K.L., Elthon T.E.** (2004) Alternative NADPH dehydrogenases of plant mitochondria *Annu. Rev. Plant Biol*, **55**:23-39.

**Reumann S., Ma C., Lemke S., Babujee L.** (2004) AraPerox: a database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiol*, **136**:2587-2608.

**Rey P, Bécuwe N, Barrault M-B, Rumeau D, Havaux M, Biteau B, Toledano MB** (2007) The Arabidopsis thaliana sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfinic acid reductase involved in photooxidative stress response. *Plant J*, **49**:505-514.

**Rey P., Cuiné S., Eymery F., Garin J., Court M., Jacquot J.P., Rouhier N., Broin M.** (2005) Analysis of the proteins targeted by CDSF32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *Plant J*, **41**:31-42.

**Rhoads D.M., Umbach A.L., Subbaiah C.C., Siedow J.N.** (2006) Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol*, **141**:357-366.

**Rhoads D.M., Umbach A.L., Sweet C.R., Lennon A.M., Rauch G.S., Siedow J.N.** (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J Biol Chem*, **273**:30750-30756.

**Rich P.R., Hoefnagel M.H.N., Wiskich J.T.** (1998) Possible chlororespiratory reactions of thylakoid membranes. In: Moller, IM and Gardstrom, P and Glimelius, K and Glaser, E, (eds.) *Plant Mitochondria: From Gene to Function*, (17 - 23). Backhuys Publishers: Leiden.

**Rouhier N.** (2010) Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytologist*, **186**:365–372.

**Rouhier N., Kauffmann B., Tete-Favier F., Palladino P., Gans P., Branlant G., Jacquot J.P., Boschi-Muller S.** (2007) Functional and structural aspects of poplar cytosolic and plastidial type a methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem*, **282**:3367-3378.

**Rouhier N., Lemaire S.D., Jacquot J.P.** (2008) The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol*, **59**:143-66.

**Rouhier N., Vieira Dos Santos C., Tarrago L., Rey P.** (2006) Plant methionine sulfoxide reductase A and B multigenic families. *Photosynth Res*, **89**:247-262.

**Rumeau D., Peltier G., Cournac L.** (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ*, **30**:1041-51.



**Sadanandom A., Poghosyan Z., Fairbairn D.J., Murphy D.J.** (2000) Differential regulation of plastidial and cytosolic isoforms of peptides methionine sulfoxide reductase in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **123**:1299-1309.

**Sagi M, Fluhr R.** (2006) Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiology*, **141**:336-340.

**Sairam R.K, Srivastava G.C.** (2001) Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *J Agron Crop Sci*, **186**:63-70.

**Sanchez J., Nikolau B.J., Stumpf P.K.** (1983) Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide in plants. *Plant Physiol*, **73**:619-623.

**Sandalio M., Del Rio L.A.** (1988) Intra-organellar distribution of superoxide dismutase in plant peroxisomes (glyoxysomes and leaf peroxisomes). *Plant Physiol*, **88**:1215-1218.

- Sappl P.G., Onate-Sanchez L., Singh K.B., Millar A.H.** (2004) Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid-induced expression of the plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol. Biol*, **54**:205-219.
- Sattler S.E., Cheng Z., Della Penna D.** (2004) From *Arabidopsis* to agriculture: engineering improved vitamin E content in soybean. *Trends Plant Sci*, **9**: 365–367.
- Scandalios, J. G.** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, **38**:995-1014.
- Schonfeld M.A., Johnson R.C., Carver B.F., Mornhinweg D.W.** (1988) Water relations in winter wheat as drought resistance indicator. *Crop Sci*. **28**: 526–531.
- Schürmann P** (2003) Redox signaling in the chloroplast: the ferredoxin/thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal*, **5**:69-78.
- Schürmann P., Buchanan B.B.** (2008) The ferredoxin/thioredoxin system of oxygenic photosynthesis. *Antioxid Redox Signal*, **10**:1235-74.
- Shakhatreh Y., Haddad N., Alrababah M., Grando S., Ceccarelli S.** (2010) Phenotypic diversity in wild barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum* (C. Koch) Thell.) accessions collected in Jordan. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **57**: 131–146.
- Sharma P., Dubey R.S.** (2004) Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci*, **167** : 541–550.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K.** (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot*. **58** :221-227.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., Seki M.** (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:410-417.
- Sieferman-Harms D.** (1987) The light harvesting function of carotenoids in photosynthetic membrane. *Plant Physiol*, **69**:561-568.
- Simova-Stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K., Feller U.** (2010) Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiol. Biochem*, **48**:200-206.
- Singh S., Khan N.A., Nazar R., Anjum N.A.** (2008) Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress *Am. J. Plant Physiol*, **3**:25-32.
- Smirnoff N.** (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol*, **125**:27–58.
- Smirnoff N.** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule *Curr. Opin. Plant Biol*, **3**:229-235.

**Smirnoff N.** (2005) Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions N. Smirnoff (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK:53-86.

**Smith I.K., Kendall A.C, Keys A.J, Turner J.C, Lea P.J.** (1984) Increased level of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley (*Hordeum vulgare* L). *Plant Sci Lett*, **37**:29-33.

**Smith I.K.** (1985) Stimulation of glutathione synthesis in photorespiring plants by catalaseinhibitors. *Plant Physiol*, **79**:1044-7.

**Sreenivasulu N., Miranda M., Prakash H.S., Wobus U., Weschke W.** (2004) Transcriptome changes in foxtail millet genotypes at high salinity: identification and characterization of a PHGPx gene specifically upregulated by NaCl in a salt-tolerant line J. *Plant Physiol*, **161**:467-477.

**Starkov A.A.** (2006) Protein-mediated energy-dissipating pathways in mitochondria. *Chem Biol Interact*, **163**:133-144.

**Streb P., Josse E-M, Gallouët E., Baptist F., Kuntz M. and Cornic G.** (2005) Evidence for alternative electron sinks to photosynthetic carbon assimilation in the high mountain plant species *Ranunculus glacialis*. *Plant Cell. Environ.* **28** : 1123-1135.

**Subbarao G.V., Johansen C., Slinkard A.E., Nageswara Rao R.C., Saxena Np., Chauhan Y.S.** (1995) Strategies for improving drought resistance in grain legume. *Crit Rev Plant Sci*, **14**: 469-523.

**Szarka A., Horemans N., Kovacs Z., Grof P., Mayer M., Banhegyi G.** (2007) Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiol. Plant*, **129**:225-232.

## J

**Takahashi M., Shiraishi T., Asada K.** (1988) COOH-terminal residues of D1 and the 44 kDa CPa-2 at spinach photosystem II core complex. *FEBS Lett*, **240**: 6-8.

**Tanaka K., Machida T., Sugimoto T.** (1990) Ozone tolerance and glutathione-reductase in tobacco cultivars. *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**: 1061-1062.

**Tanaka K., Saji H., Kondo N.** (1988) Immunological properties of spinach glutathionereductase and inductive biosynthesis of the enzyme with ozone. *Plant and Cell Physiology*, **29**: 637-642.

**Tanaka K., Suda Y., Kondo N., Sugahara K.** (1985) O<sub>3</sub> tolerance and the ascorbate-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposing system in chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, **26**: 1425-1431.

**Tardieu F.** (2005) Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *C. R. Geoscience*, **337**:57-67.

**Tarrago L., Laugier E., Zaffagnini M., Marchand C., Le Maréchal P., Lemaire S.D., Rey P.** (2010) Plant thioredoxin CDSP32 regenerates 1-Cys methionine sulfoxide reductase B activity through the direct reduction of sulfenic acid. *J Biol Chem*, **285**:4964-14972.

**Tarrago L., Laugier E., and Rey P.** (2009) Protein-repairing methionine sulfoxide reductases in photosynthetic organisms: gene organization, reduction mechanisms, and physiological roles. *Mol Plant*, **2**:202-217.

- Tausz T., Šircelj H., Grill D** (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.*, **55**:1955-1962.
- Tewari R.K., Kumar P., Sharma P.N.** (2006) Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. *Planta*, **223**:1145-1153.
- Thatcher L.F., Carrie C., Andersson C.R., Sivasithamparam K., Whelan J., Singh K.B.** (2007) Differential gene expression and subcellular targeting of Arabidopsis glutathione-S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *The Journal of Biological Chemistry*, **282**: 28915-28928.
- Titorenko, V.I. and Mullen, R.T.** (2006) Peroxisome biogenesis: the peroxisomal endomembrane system and the role of the ER. *J. Cell Biol.* **174**: 11–17.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76** : 4350-4354.
- Trebst A., Depka B., Holländer-Czytko H.** (2002) A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*, **516**:156-160.
- Triantaphylidès C., Havaux M.** (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci*, **14**: 219-228.
- Triantaphylides C., Krischke M., Hoerberichts F.A., Ksas B., Gresser G., Havaux M., Van Breusegem F., Mueller M.J.** (2008) Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photo-oxidative damage to plants. *Plant Physiol*, **148**:960-968.
- Turner N.C.** (1997) Further progress in crop water relations. *Adv Agron*, **58** : 293-338.
- Turner N.C., Wright G.C., Siddique K.H.M.** (2001) Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Adv Agron*, **71** : 193-231.
- Turner NC** (1986) Adaptation to water deficit: a changing perspective. *Aust J Plant Physiol*, **13** : 175-90.
- Turrens JF.** (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep*, **17**: 3–8.
- Tuteja N., Ahmad P., Panda B.B., Tuteja R.** (2009) Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat. Res*, **681**:134-149.

## U

Ushimaru T., Nakagawa T., Fujioka Y., Daicho K., Naito M., Yamauchi Y., Nonaka H., Amako K., Yamawaki K., Murata N. (2006) Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J. Plant Physiol*, **163**:1179-1184.

## V

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer *Chem. Biol. Interac*, **160**:1-40.

Vieira Dos Santos C., Cuiné S., Rouhier N., Rey P. (2005) The Arabidopsis plastidic methionine sulfoxide reductases B proteins: sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol*, **138**:909-22.

Vieira Dos Santos C., Laugier E., Tarrago L., Massot V., Issakidis-Bourguet E., Rouhier N., Rey P. (2007) Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases B. *FEBS Lett*, **581**:4371-4376.

Vieira Dos Santos C., Rey P. (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends Plant Sci*, **11**:329-334.

Vierstra R.D., John T.R., Proff K.L. (1982) Kaempferol 3-O-galactoside 7-O-rhamnoside is the major green fluorescing compound in the epidermis of *Vicia faba*. *Plant Physiol*, **69**:522-532.

Vranova E., Atichartpongkul S., Villaruel R., Montagu M.V., Inze D., Camp W.V. (2002) Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **99**:870-875.

## W

Wang C.Q., Li R.C. (2008) Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol-induced water stress. *Acta Physiol Plant*, **30**:841-847.

Wang C.Q., Song H. (2009) Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. *Plant Cell Rep*, **28**:1341-1349.

Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**:1-14.

Wang Z., Xiao Y., Chen W., Tang K., Zhang L. (2010) Increased vitamin C content accompanied by an enhanced recycling pathway confers oxidative stress tolerance in Arabidopsis. *Integr Plant Biol*, **52**:400-409.

Wingler A., Lea P.J., Quick W.P., Leegood R.C. (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc London B*, **355**:1517-1529.

**Wingler A., Quick W.P., Bungard R.A., Bailey K.J., Lea P.J., Leegood R.C.** (1999) The role of photorespiration during drought stress: an analysis utilizing barley mutants with reduced activities of photorespiratory enzymes. *Plant Cell and Environment*, **22**:361-373.

**Winkel-Shirley B.** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol*, **5**:218-223.

**Wise R.R., Naylor A.W.** (1987) Chilling-enhanced photooxidation. Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants. *Plant Physiol*, **83**:278-282.

**Wiseman H., Halliwell B.** (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J*, **313**:17-29.

**Wood Z.A., Schroder E., Robin Harris J., Poole L.B.** (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci*, **28**: 32-40.

**Wynn R., Cocco M.J., Richards F.M.** (1995) Mixed disulfide intermediates during the reduction of disulfides by *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, **34**: 11807-11813.

## X

**Xiang C., Werner B.L., Christensen E.M., Oliver D.J.** (2001) The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels *Plant Physiol*, **126**:564-574.

## Y

**Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.** (2005) Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science*, **10**: 88-94.

**Yamazaki D., Motohashi K., Kasama T., Hara Y., Hisabori T.** (2004) Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **45**:18-27.

**Yan M., Rayapuram N., Subramani S.** (2005) The control of peroxisome number and size during division and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**: 376–383.

**Yan Y., Stolz S., Chétalat A., Reymond P., Pagni M., Dubugnon L., and Farmer E.E** (2007) A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell*, **19**: 2470-2483.

**Yang K.S., Kang S.W., Woo H.A., Hwang S.C., Chae H.Z., Kim K., Rhee S.G.** (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid. *J Biol Chem*, **277**:38029-38036.

**Yang Y., Han C., Liu Q., Lin B. Wang Wang J** (2008) Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperataseedlings*. *Acta Physiol. Plant*, **30**:433-440.

**Z**

**Zaffagnini M ., Michelet L ., Marchand C., Sparla F., Decottignies P., Le Maréchal P., Miginiac-Maslow M., Noctor G., Trost P., Lemaire S.D.** (2007) The thioredoxin-independent isoform of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. *FEBS Journal*, **274**: 212–226.

**Zagorchev L., Seal C.E., Kranner I., Odjakova M.** (2012) Redox state of low-molecular-weight thiols and disulphides during somatic embryogenesis of salt-treated suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *Free Radic. Res.* **46**:656–664.

**Zelitch I., Schultes N.P., Peterson R.B., Brown P., Brutnell T.P.** (2008) High glycolate oxidase activity is required for survival of maize in normal air. *Plant Physiol*, **149**: 195-204.

**Zelko I.N., Mariani T.J., Folz R.J.** (2002) Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**: 337-349.

**Zeven A.C.** (1998) Landraces: a review of definitions and classifications. *Euphytica*, 104, pp. 127–139.

**Zhang S.P., Weng J., Pan J.X., Tu T.C., Yao S., Xu C.H.** (2003) Study on the photo-generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynthesis Research*, **75**: 41-48.

**Zhang X.H. and Weissbach H.** (2008) Origin and evolution of the protein-repairing enzymes methionine sulphoxide reductases. *Biological Rev*, **83**: 249-257.

**Zlatev Z.S., Lidon F.C., Ramalho J.C., Yordanov I.T.** (2006) Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biol Plant*, **50**:389-394.