Modulation du métabolisme azoté sous hypoxie racinaire, chez Medicago truncatula

Houssein Diab

▶ **To cite this version:**

Houssein Diab. Modulation du métabolisme azoté sous hypoxie racinaire, chez Medicago truncatula. Biologie végétale. Université d'Angers, 2013. Français. NNT : . tel-00926762

HAL Id: tel-00926762

https://theses.hal.science/tel-00926762

Submitted on 10 Jan 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE D'ANGERS **Année : 2013**

N° d'ordre : 1315

Modulation du métabolisme azoté sous hypoxie racinaire, chez *Medicago truncatula*

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétales

ECOLE DOCTORALE : VEGETALE-ENVIRONNEMENT NUTRITION-AGRO-ALIMENTAIRE-MER

Présentée et soutenue publiquement

Angers le 28/ Juin /2013

par : Houssein Diab

devant le Jury

Dr. Jean-Bernard CLIQUET	Rapporteur	MCU-HDR Université de Caen Basse Normandie	
Dr. Bertrand HIREL	Rapporteur	DR CNRS	INRA de Versailles
Pr. Alain VIAN	Examinateur	Professeur	Université d'Angers
Dr. Jérémy LOTHIER	Invité	MCU	Université d'Angers

Directeur de Thèse : Professeur Anis Limami, Université d'Angers

Université d'Angers, UMR 1345 IRHS, SFR 4207 QUASAV, 2 Bd Lavoisier, 49045 Angers – France

ED VENAM

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Monsieur Anis Limami qui m'a accepté dans son équipe et a dirigé ce travail de recherche. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir confié un sujet aussi passionnant. Son enthousiasme, son optimisme et sa bonne humeur m'ont soutenu pendant les périodes de doute et ont permis à ce travail d'aboutir ainsi la confiance que j'ai reçue de sa part et qui m'a permis de progresser et d'être très bien formé à la profession de chercheur.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel de l'UMR Physiologie Moléculaire des Semences (anciennement), représenté par Olivier Leprince et Anis Limami pour m'avoir accueilli pendant ma thèse.

J'adresse également mes remerciements aux membres de mon comité de thèse, Monsieur Guillaume Tcherkez, Professeur à l'université de Paris-Sud 11 et son équipe, et Monsieur Jérémy Lothier, professeur à l'université d'Angers, pour leur aide qu'ils m'ont rapporté durant ma thèse. Je remercie également, Monsieur David Macherel, de l'équipe Mitostress, Monsieur Joost Van Dongen et son équipe (Energy Metabolism Research Group, Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology) pour leur collaboration.

Un très grand merci à Alain Vian qui a accepté d'être le président du jury et je remercie également les autres membres de ce jury, d'avoir accepté d'en faire partie. Pour avoir accepté de juger ce travail, je remercie Jean-Bernard Cliquet et Bertrand Hirel.

Je remercie vivement tous les membres de l'équipe P.A.V.E et tous les membres de l'A.R.E.S ; Merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé dans ce travail. En particulier, je remercie Laure Viau, pour sa coopération et sa personnalité vivifiante, et Claudie Ricoult, pour sa disponibilité et ses nombreux conseils. Je souhaite remercier mes amis, chercheurs ou non, qui m'ont épaulé, à la paillasse et/ou en dehors des laboratoires, pour faciliter ce travail. Ces remerciements s'adressent plus particulièrement à zeinab Fahs, Abdelilah Benamar, Benoit Ly Vu, Caroline Cukier, Isabelle Verdu, Bruno Hamon et bien évidement, à Marie-Christine, Elisabeth, Antonie et Tibaut.

Enfin, je dédie ce travail à mes parents et ma famille qui m'ont donné la possibilité d'arriver à ce niveau d'études. Je le dédie à Zeinab, qui m'a toujours encouragé et a partagé avec moi les périodes de doute et de joie.

SOMMAIRE

Sommaire 3

Remerciements 2

Liste des figures 8

Liste des tableaux 14

Liste des principales abréviations 15

Chapitre I : Introduction générale et Etude bibliographique 17

1. Plante et environnement 21

1.1. Germination et développement des plantes 22

1.2. Importance des légumineuses cultivées 24

2. *Medicago Truncatula* plante modèle pour l'étude des interactions plante-stress abiotique 25

2.1. Historique 25

2.2. *« Medicago truncatula »* plante modèle 26

2.2.1. Caractéristiques 26

2.2.2. Application dans la recherche 27

3. Métabolisme de l'azote 28

3.1. Source et cycle de l'azote 28

3.2. Assimilation de l'azote chez les plantes 30

3.2.1. Absorption de l'azote minéral : nitrate et ammonium 30

3.2.2. Régulation de l'absorption et devenir de l'azote dans la plante 31

3.3. Synthèse et transport des acides aminés 33

3.4. Coordination entre métabolisme azoté, photosynthèse et respiration 34

4. Hypoxie racinaire induite par l'inondation et développement de la plante 35

4.1. Effets de l'hypoxie racinaire sur le phénotype de la plante 36

4.2. Effet de l'hypoxie racinaire sur le métabolisme azoté 36

5. Contexte scientifique et objectif de la thèse 40

Chapitre II : Matériels et Méthodes 41

1. Matériel biologique 42

1.1. *Medicago truncatula* 42

1.2. Germination et culture des plantes 42

1.3. Application du stress hypoxique 44
1.4. Préparation de la solution nutritive 45
1.5. Mesure de la concentration d'oxygène dans les différents endroits biologiques 46
1.6. Mesure de la quantité d'oxygène consommée et émise par des fragments foliaires des plantes 47
1.7. Stockage des échantillons 47
2. Aspect physiologique 48
2.1. Prélèvements des parties aérienne et racinaire 48
2.2. Mesure des masses sèches et fraiches 48
2.3. Comparaison des images 48
3. Analyse des acides ribonucléiques 48
3.1. Extraction des ARN totaux au « Trizol » 48
3.2. Dosage des ARN 48
3.3. Reverse Transcription (RT) 49
3.4. q-RT-PCR 49
4. Etude des métabolites 50
4.1. Métabolome 50
4.2. Extraction d'acides aminés et dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC) 51
4.3. Dosage des chlorophylles 52
4.4. Dosage du nitrate 52
5. Etude des sucres solubles 53
5.1. Extraction des sucres solubles 53
5.2. Dosages des sucres par chromatographie liquide haute pression (HPLC) 53
6. Etude de l'activité enzymatique de la « nitrate réductase » 53
7. Dosage de l'azote total et analyse isotopique $^{15}N/^{14}N$ 54
7.1. Dosage de l'azote total 54
7.2. Marquage ^{15}N et analyse isotopique $^{15}N/^{14}N$ 55
8. Système de « Split-root » 56

Chapitre III : Effets de l'hypoxie racinaire sur la croissance et le métabolisme azoté chez les plantes de « Medicago truncatula », à court et long terme **58**

1. Introduction **59**

2. Résultats **62**

2.1. Expérience, stress hypoxique racinaire à court terme **62**

2.1.1. Dosage du nitrate 63

2.1.2. Dosage d'ammonium 63

2.1.3. Mesure de « l'activité nitrate réductase » (ANR) 63

2.1.4. Dosage des acides aminés par HPLC 63

2.1.5. Etudes de l'expression des gènes 64

2.1.6. Dosage des sucres 64

Article publié: IMPACT OF WATERLOGING-INDUCED HYPOXIA ON NITROGEN METABOLISM IN THE LEGUME *MEDICAGO TRUNCATULA* **65**

2.2. Expérience, stress hypoxique racinaire à long terme **82**

2.2.1. Effets de l'hypoxie racinaire sur la croissance des plantes 83

2.2.2. Evaluation de la respiration et la photosynthèse chez la plante sous hypoxie racinaire 84

2.2.3. Teneur en nitrate 85

2.2.4. Teneur en azote total et mesure de l'absorption de NO_3^- par marquage ^{15}N 85

2.2.5. Etudes de l'expression des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie racinaire 86

2.2.5.1. Expression des gènes dans les racines 86

2.2.5.2. Expression des gènes dans les feuilles 87

2.2.6. Analyse métabolomique pour l'étude de l'effet du stress hypoxique racinaire sur le métabolisme azoté chez les plantes de *« Medicago truncatula »* 88

3. Discussion **89**

3.1. Effet de l'hypoxie racinaire à court terme **90**

3.2. Effet de l'hypoxie racinaire à long terme **91**

Chapitre IV : Effet de l'hypoxie racinaire sur le développement de la partie aérienne : communication racines – feuilles **111**

1. **Introduction** **112**
2. **Résultats** **116**
   - **2.1. Etude de la croissance des plantes et leur réponse à l'hypoxie racinaire dans un système appelée « Split root » : étude de la communication et la transmission du signal entre la partie aérienne et racinaire de la plante** **117**
     - **2.1.1.** Effet sur la biomasse de la partie aérienne 117
     - **2.1.2.** Effet sur la biomasse de la partie racinaire 117
   - **2.2. Réponse des métabolites à l'hypoxie racinaire :** **118**
     - **2.2.1. Dans les racines** **118**
       - A- Variations des métabolites 118
         - a) Métabolites affectées directement par l'hypoxie racinaire 118
         - b) Métabolites affectées directement et indirectement par l'hypoxie racinaire 118
         - c) Métabolites non affectées par l'hypoxie racinaire 119
       - B- Analyses statistiques 119
         - a) ACP : Analyse en Composantes Principales 120
         - b) Analyse de variance à deux facteurs 120
         - c) Classification hiérarchique (HCL) 120
     - **2.2.2. Dans les feuilles** **122**
       - A- Variations des métabolites 122
         - a) Métabolites affectées directement par l'hypoxie racinaire 122
         - b) Métabolites affectées directement et indirectement par l'hypoxie racinaire 122
         - c) Métabolites non affectées par l'hypoxie racinaire 123
       - B- Analyses statistiques 123
         - a) ACP : Analyse en Composantes Principales 124
         - b) Analyse de variance à deux facteurs 124
         - c) Classification hiérarchique (HCL) 124
   - **2.3. Etudes de l'expression des gènes** **125**
3. **Discussion** **126**

Chapitre V : Conclusion **169**

Article soumis: The Versatile Role of Alanine Aminotransferase (AlaAT) in Cellular Acclimation to Hypoxia Stress and Post-Stress Recovery in Plants **171**

Références bibliographiques **180**

Liste des figures

Chapitre I

Figure I.1 : importations et exportations des semences en France de 2000 à 2011

Figure I.2 : importations et exportations des semences en France de 2000 à 2011

Figure I.3 : Interaction de la plante avec son environnement et les différents mécanismes qui interviennent comme, la photosynthèse, la respiration, la transpiration et la nutrition minérale

Figure I.4 : Principaux événements liés à la germination

Figure I.5 : Le cycle de l'azote (d'après **Morot-Gaudry, 1998)**

Figure I.6 : Voie d'assimilation de l'azote (d'aprèsCoruzzi, 2003)

Chapitre II

Figure II.1: Croisements établis avec les lignées de *M. truncatula* dans les laboratoires à Tunis (ME. Aouani), Toulouse (T. Huguet), Montpellier (JM. Prosperi) et Rennnes (ML. Pilet-Nayel)

Figure II.2 : Plantes, de *Medicago truncatula,* témoins plantées dans des pots de vermiculite et arrosées par la solution nutritive, âgées de 3 semaines

Figure II.3 : plantes âgées de 3 semaines, en stress hypoxie avec la solution nutritive

Figure II.4 : mesure de la concentration d'oxygène entre les racines des plantes témoins

Figure II.5 : mesure de la concentration d'oxygène

Figure II.6 : Mesure de la quantité d'oxygène consommée et émise par les fragments foliaires

Figure II.7 : Schéma d'une chromatographie liquide haute performance

Figure II.8 : principe de « Split root »

Chapitre III

Figure III.1 : Teneur du nitrate dans la partie aérienne et dans les racines en fonction du temps de traitement

Figure III.2 : Teneur en ammonium (NH_4^+) en fonction du temps de traitement

Figure III.3 : Mesure de l'activité nitrate réductase (ANR actuel) en fonction du temps de traitement

Figure III.4 : Evolution de la teneur d'alanine et du GABA en fonction du temps de traitement

Figure III.5 : Teneur en glutamate et aspartate en fonction du temps de traitement

Figure III.6 : Graphes d'expression des gènes **mAlaAT et GABA-T** dans les racines et dans les feuilles en fonction du temps de traitement

Figure III.7 : Graphes d'évolution de la teneur des sucres (glucose et fructose) dans les racines et la partie aérienne des deux groupes de plantes, sous stress hypoxique racinaire et témoins en fonction du temps de traitement

Figure III.8 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche et sèche de la partie aérienne et racinaire chez les plantes en « hypoxie » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement, avec la concentration 12mM de NO_3^-

Figure III.9 : Plantes de "*Medicago Truncatula*" témoins et en hypoxie à 2 et à 4 semaines d'application du stress hypoxique racinaire avec la solution nutritive de 12mM de nitrate

Figure III.10 : état des plantes, témoins et en hypoxie racinaire après 7 semaines d'application du stress

Figure III.11 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche et sèche de la partie aérienne chez les plantes en « hypoxie » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) avec 2 mM de NO_3^- et l'eau déminéralisée

Figure III.12 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche et sèche des racines chez les plantes en « hypoxie » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement avec 2 mM de NO_3^- et l'eau déminéralisé

Figure III.13 : Plantes de "*Medicago Truncatula*" témoins et en hypoxie à 2 et à 4 semaines d'application du stress hypoxique racinaire avec la solution nutritive à 2mM de nitrate et l'eau déminéralisé

Figure III.14 : Schéma récapitulative de l'effet de l'hypoxie racinaire sur la croissance de la biomasse aérienne

Figure III.15 : Mesure de la quantité d'oxygène émise durant la photosynthèse, en lumière des fragments foliaires

Figure III.16 : Mesure de la quantité d'oxygène consommée durant la respiration, en obscurité des fragments foliaires

Figure III.17 : Graphes d'évolution de la concentration du nitrate dans les racines et dans la partie aérienne des plantes en fonction du temps (semaines) de traitement

Figure III.18 : Graphes d'évolution de la teneur en azote dans les racines et dans la partie aérienne des plantes en fonction du temps (semaines) de traitement

Figure III.19 : Graphes d'évolution de la quantité d'azote en fonction du temps (semaines) de traitement

Figure III.20 : Graphes d'évolution du RSA dans les racines et dans la partie aérienne des plantes en fonction du temps (semaines) de traitement

Figure III.21 : Graphes d'évolution de la vitesse d'incorporation d'azote par plante en fonction du temps (semaines) de traitement

Figure III.22: Graphes d'évolution de l'expression de gènes (en nombre de copies) du métabolisme azoté et carboné dans les racines et les feuilles en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure III.23 : graphes des ratios (valeurs en hypoxie racinaire / valeurs en normoxie) de quelques acides aminés accumulés par réponse à l'hypoxie racinaire dans les racines des plantes en fonction du temps de traitement

Figure III.24 : graphes des ratios (valeurs en hypoxie racinaire / valeurs en normoxie) de quelques acides aminés accumulés par réponse à l'hypoxie racinaire dans la partie aérienne des plantes en fonction du temps de traitement

Chapitre IV

Figure IV.1 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche et sèche de la partie aérienne chez les plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.2 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche et sèche de la partie racinaire chez les plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.3 : Graphes d'évolution de la thréonine et de l'acide décanoïque dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.4 : Graphes d'évolution du digalactosylglycérole, fucose 1, galactose 1, galactosylglycérole, glucose 1 et 2 et du ribose dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.5 : Graphes d'évolution de l'alanine (alfa et beta) et du gaba dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.6 : Graphes d'évolution des différents acides aminés accumulés dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» comparés aux « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.7 : Graphes d'évolution de racinaire l'acide succinique, l'acide fumarique, l'acide kétoglutarique, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide pyruvique, l'acide lactique et le phosphorique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.8 : Graphes d'évolution d'ornithine, spermidine et putrescine, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.9 : Graphes d'évolution de l'acide butanoïque, l'acide hydroxyglutarique, l'acide benzoïque, l'acide glycérique, l'acide glycolique, l'acide laurique, l'acide malonique, l'acide malonique tris, l'acide nicotinique, l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide P-OH benzoïque, l'acide stéarique, l'acide trans-aconitique, l'acide tétradécanoïque, l'acide thréonique, l'acide thréonique-lactone et l'acide shikimique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.10 : Graphes d'évolution de l'acide vanillique et l'acide salicylique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.11 : Graphes d'évolution du fructose 1, fructose 2, fructose 6P, B-sitostérol, galactinole, mannitol, myo-inositol, glucose 6P1, glucose 6P2, glycérol, glycérol 2P, glycérol 3P, mannose 1, tréhalose, thréitole et thréitole d2, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.12 : Graphes d'évolution du mélibiose, raffinose, rhamnose, ribose, xylose 1 et 2 et du maltose 1, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.13 : Graphe d'évolution d'éthanolamine dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.14 : Graphes d'évolution de l'acide aminoadipique, l'acide butirique, l'acide ascorbique, l'acide ascorbique d1, l'acide citramalique, l'acide galactonique, l'acide galacturonique, l'acide gluconique, l'acide linolénique, l'acide octanoïque, l'acide coumarique et l'acide ribonique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle ou 10% » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.15 : Graphes d'évolution du maltose et du sucrose dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle ou 10% » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.16 : Projection des échantillons des racines des deux groupes, en hypoxie totale et en hypoxie partielle, sur les axes de l'ACP et leur répartition en groupes présentant des similarités et montrant les corrélations entre eux, comparés à ceux du groupe témoin

Figure IV.17 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans les racines et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps » (à gauche) et le facteur « condition » (à droite) avec le numéro associé pour chaque échantillon

Figure IV.18 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans les racines et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps x condition » avec le numéro associé pour chaque échantillon

Figure IV.19 : Graphe d'évolution de la lysine, l'aspartate et l'homosérine dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.20 : Graphe d'évolution de l'acide fumarique, lactique, pyruvique, ribonique, ascorbique d1, héxanoique, citramalique, décanoique et shikimique, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.21 : Graphe d'évolution du galactose 1, arabinose, maltose 1 et ribose dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle ou 10% » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.22 : Graphes d'évolution de l'A-alanine, la glutamine d1 (un dérivé de la glutamine), la glycine, l'isoleucine, la leucine, la lévoglucosane, la lysine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, le B-alanine, la glutamine, l'asparagine et l'aspartate, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle »g et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.23 : Graphes d'évolution de l'acide citrique, malique, pyruvique, ketoglutarique, phosphorique dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.24 : Graphes d'évolution de l'ornithine et de la putrescine dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.25 : Graphes d'évolution de l'acide butirique, ascorbique, benzoïque, galactonique, galacturonique, glucarique, glycolique, laurique, nicotinique, tétradécanoique, T-ferrulique, thréonique, glutamique, linoléique, malonique, malonique tris et pyroglutamique, la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.26 : Graphes d'évolution du fructose 1 et 2, digalactosylglycérole, fucose 2, galactinole, galactosylglycérole, glucose 1 et 2, glycérol, maltose 2, lactose1 et 2, mélibiose 1, myo-inositol, rhamnose1 et 2, sucrose, thréitol, tréhalose et glycérol 2P et 3P, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.27 : Graphes d'évolution des différents acides aminés non affectés par le stress hypoxique racinaire (l'arginine, cystéine, éthanolamine et méthionine) dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.28 : Graphes d'évolution de la spermidine, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.29 : Graphes d'évolution de l'acide aminoadipique, octanoique, palmitique, P-hydroxybenzoique et salicylique, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.30 : Graphes d'évolution des sucres non affectés par le stress hypoxique racinaire (fructose 6P, glucose 6P2, rhamnose 2, sorbitol, tagatose et B-sitostérol), dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.31 : Projection des échantillons des parties aériennes des deux groupes, en hypoxie totale et en hypoxie partielle, sur les axes de l'ACP et leur répartition en groupes présentant des similarités et montrant les corrélations entre eux, comparés à ceux du groupe témoin

Figure IV.32 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans la partie aérienne et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps » (à gauche) et le facteur « condition » (à droite) avec le numéro associé pour chaque échantillon

Figure IV.33 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans la partie aérienne et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps x condition » (à gauche) et le facteur « condition » (à droite) avec le numéro associé pour chaque échantillon

Figure IV.34 : Graphes d'évolution de l'expression des gènes « mAlaAT » (à gauche) et « GABA-T » (à droite) dans les racines et la partie aérienne des plantes sous stress hypoxique racinaire totale et partielle (split-root) en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.35 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme primaire, azoté et carboné dans les racines des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.36 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme carboné dans les racines des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.37 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme azoté et carboné dans la partie aérienne des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement

Figure IV.38 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme carboné dans la partie aérienne des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement

Liste des tableaux

Chapitre II

Tableau II.1 : Composition de la solution nutritive utilisée pour arroser les plantes et pour appliquée le stress hypoxique (Milieu MS de Murashige et Skoog 1962)

Tableau II.2 : Composition du tampon d'extraction de protéines pour dosage de l'activité NR

Tableau II.3 : Composition des milieux de réaction pour dosage de l'activité NR

Chapitre IV

Tableau IV.1 : Tableaux des échantillons (a : racines et b : feuilles) avec le numéro, le nom et la condition expérimentale correspondante

Tableau IV.2 : Tableau d'analyses de la variance à deux facteurs présentant les différentes conditions expérimentales étudiées en fonction du temps (semaines) dans les racines

Tableau IV.3 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «temps» dans les racines

Tableau IV.4 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «condition» dans les racines

Tableau IV.5 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur « temps x condition » dans les racines

Tableau IV.6 : Tableau d'analyses de la variance à deux facteurs présentant les différentes conditions expérimentales étudiées en fonction du temps (semaines) dans la partie aérienne

Tableau IV.7 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «temps» dans la partie aérienne

Tableau IV.8 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «condition» dans la partie aérienne

Tableau IV.9 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «temps x condition» dans la partie aérienne

Liste des principales abréviations

% : Pourcent
°C : Degrés Celsius
µg : Microgramme
µL : Microlitre
µM : Micromolaire
$^{15}NO_3^-$: ion nitrate marqué
ABA : Acide abscissique
ACC : 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid
ACP : Analyse en Composantes Principales
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ala : Alanine
AlaA-T : Alanine amino transférase
ANOVA : Analyse de Variances
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonuléique messager
ATP : Adénosine tri-phosphate
DNase : Désoxyribonucléase
dNTP : Désoxyribonucléotide 5'-triphosphate
DO : Densité optique
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
GA : Acide gibberellique
GABA : Acide gamma-aminobutyrique
GABA-T : acide gamma-amino butyrique transaminase
GDH : glutamate dehydrogenase
GOGAT : Glutamine Oxoglutarate AminoTransférase
GS : Glutamine synthétase
h : Heure
H2SO4 : Acide sulfurique concentré
HCl : Acide chlorhydrique
HPLC : Chromatographie liquide haute performance
ICDH : Isocitrate déshydrogénase cytosolique
IDH : Isocitrate déshydrogénase mitochondrial
INRA : Institut national de la Recherche Agronomique

L : Litre
MF : Matière fraîche
mg : Miligramme
min : Minute(s)
mL : Mililitre
mm : Milimètre
mM : Milimolaire
mol : Mole
MS : Murashige et Skoog (milieu de)
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NaOH : Hydroxyde de sodium
nm : Nanomètre
nM : Nanomolaire
NR : nitrate réductase
PCR : Polymerase Chain Reaction
PEPC : Phosphoenolpyruvate carboxylase
pH : Logarithme décimal négatif de la concentration de H+
PSI : Photosystème I
PSII : Photosystème II
q-RT-PCR : quantitative real-time PCR
ROS : espèces réactives de l´oxygène
sec : Seconde
TRIS-HCl : 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol-HCl
U : Unité enzymatique

Chapitre I :

Introduction générale

Le monde végétal reste mal connu, malgré sa richesse et sa diversité. Pourtant, les plantes, premiers maillons dans le cycle du carbone ou dans les chaînes alimentaires, sont indispensables à la vie animale sur la planète.

En France, la production des semences est considérée comme la meilleure au niveau européen et occupe la troisième place au niveau mondial avec un chiffre d'affaire qui s'élevait à 2 725 millions d'euros en 2010/2011, elle est stable depuis presque douze ans et en constante progression (figure I.1). Son exportation s'effectue dans la majorité des cas à destination des pays Européens (76%) et principalement vers l'Allemagne.

Figure I.1 : importations et exportations des semences en France de 2000 à 2011.
Les chiffres sont donnés en millions d'euros. Source : www.gnis.fr

La répartition du chiffre d'affaires par groupe d'espèces se fait de la façon suivante : maïs et sorgho 33%, potagères et florales 21%, céréales et protéagineux 13%, lin, chanvre et oléagineux 12%, fourragères 8%, betteraves et chicorées 7% et pomme de terre 6% (figure I.2).

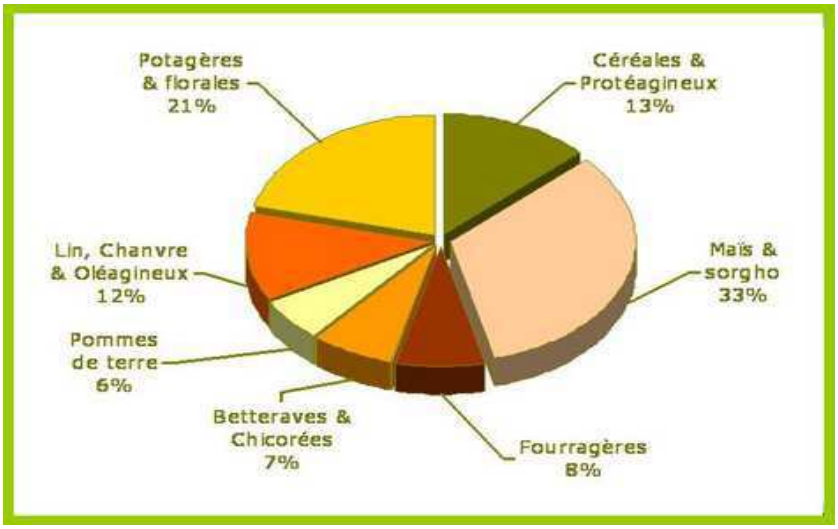


Figure I.2 : importations et exportations des semences en France de 2000 à 2011.
Les chiffres sont donnés en millions d'euros. Source : www.gnis.fr

La région « Pays-de-la-Loire » réserve beaucoup de compétences et d'acteurs pour la filière plante : centres de recherche et de formation bien spécialisés, entreprises privées et vastes espaces de culture sur champs.

L'Institut de Recherche en Horticulture et Semences « **IRHS** », situé à Angers, regroupe l'INRA de Nantes-Angers, l'Université d'Angers et Agrocampus Ouest pour acquérir une meilleure compréhension de la physiologie des semences en vue d'en améliorer la qualité et pour mieux comprendre la relation « plante - conditions de germination » ; celles-ci se focalise sur l'étude des conditions de culture des plantes et leurs réponse vis-à-vis des différents stress possibles. Les plantes étudiées comme modèles sont *Arabidopsis thaliana*, le pois (*Pisum sativum*), *Medicago truncatula*, la pomme, le raisin et la carotte.

Dans nos travaux de recherche présentés ici, nous nous sommes focalisés sur un stress abiotique : le stress hypoxique racinaire. Ce stress est provoqué par l'inondation qui maintient les racines dans un milieu qui s'appauvrit très vite en oxygène et devient hypoxique. Dans notre étude, ce stress a été réalisé par l'immersion du système racinaire et nous avons réalisé des études physiologiques et une «étude métabolomique avec un intérêt particulier pour le métabolisme azoté.

Etude bibliographique

1. Plante et environnement

Pour se développer, les plantes absorbent dans le milieu qui les entoure, sol et atmosphère, l'eau et les éléments nécessaires à la croissance et la production de biomasse. L'eau prélevée dans le sol, outre ses rôles multiples dans la physiologie des plantes, fournit l'hydrogène et l'oxygène par le mécanisme de l'assimilation chlorophyllienne. L'azote est, pour la plupart des plantes, prélevé dans le sol sous forme minérale (nitrique ou ammoniacale) et, pour les légumineuses, directement prélevé dans l'air du sol par les bactéries des nodosités racinaires. Les éléments minéraux (P, K, Ca, Mg, la plus grande partie du S et les oligo-éléments) proviennent du sol (figure ci-dessous) où les racines les absorbent à partir de solutions très diluées (figure I.3).

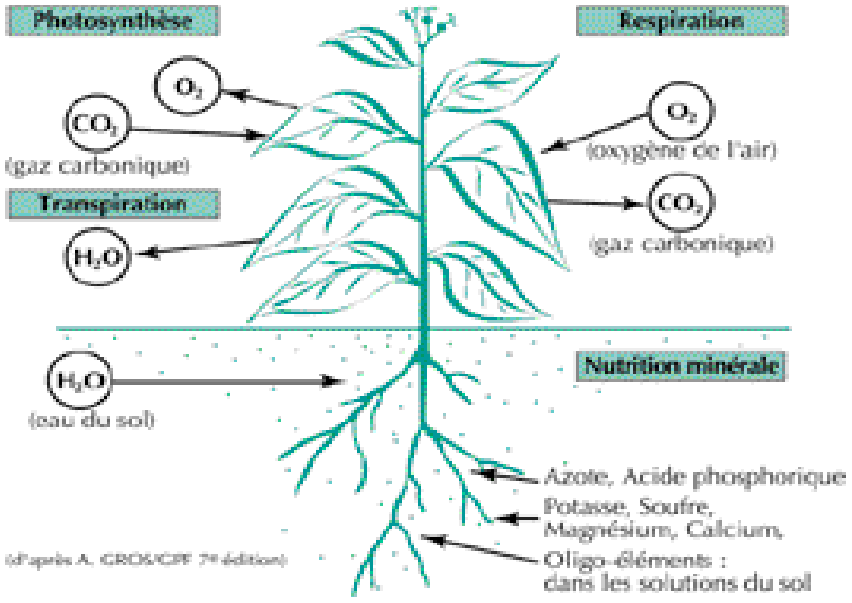


Figure I.3 : Interaction de la plante avec son environnement et les différents mécanismes qui interviennent comme, la photosynthèse, la respiration, la transpiration et la nutrition minérale.

La croissance et la survie des plantes terrestres sont affectées par les facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité, la lumière, l'obscurité et beaucoup d'autres facteurs qui pourraient être néfastes ou bénéfiques pour l'avenir de la plante.

Les plantes ne sont pas toujours en situation idéale pour leur développement car, parfois, elles affrontent des conditions adverses qui entrainent des stress abiotiques ; ceux-ci se définissant comme un stress hydrique et un stress salin ainsi que d'autres stress comme l'hypoxie racinaire et le stress thermique. Les plantes développent des réponses physiologiques pour s'adapter (résister ou tolérer) à ces stress abiotiques.

1.1. Germination et développement des plantes

La germination de la plante est divisée en plusieurs grandes étapes (figure I.4) : la phase d'imbibition (I), la phase de germination au sens strict (II) et la phase de croissance post-germinative (III) (Bewley, 1997) ou installation de la plantule. L'installation de la plantule est l'étape clé du cycle du développement surtout que son échec constitue un risque très important au niveau agricultural pour la production des plantes des espèces légumineuses et horticoles. Elle est caractérisée par l'entrée rapide et passive d'eau qui est suivie d'une augmentation de la consommation d'oxygène pour aboutir à l'activation des enzymes mitochondriales.

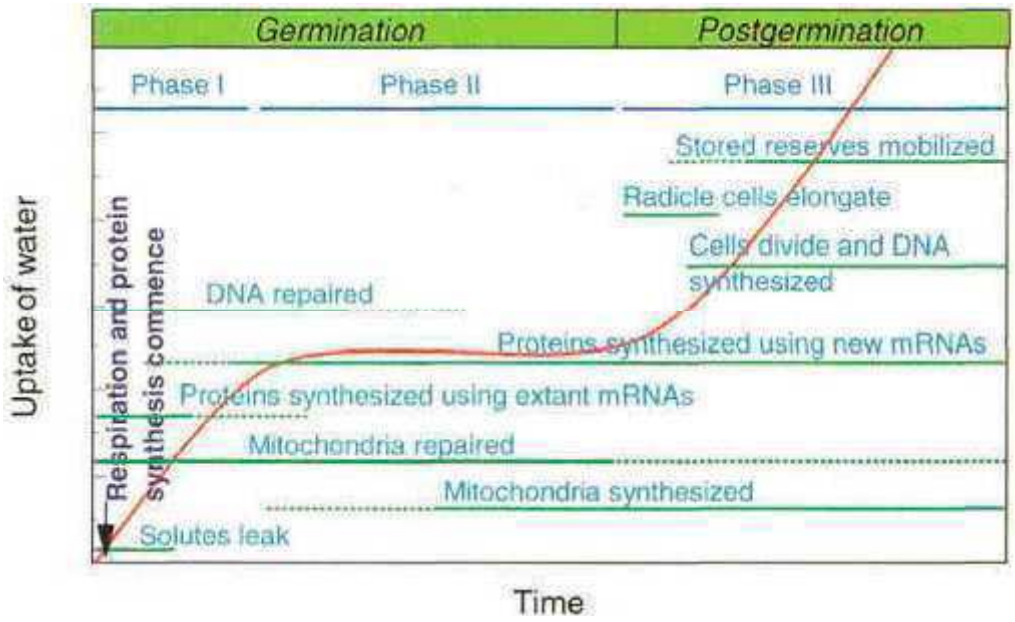


Figure I.4 : Principaux événements liés à la germination. L'imbibition des graines suit une courbe triphasique. La phase I correspond à une prise d'eau rapide. La phase II est une phase de plateau qui se termine par la sortie de la radicule. La phase III est caractérisée par la reprise de l'imbibition. Seules les phases I et II correspondent à la germination au sens strict, alors que la phase III est une phase de croissance, postgerminative. Les traits indiquent la plage de temps pendant laquelle se déroule l'événement cité. D'après Bewley 1997.

Dès que la semence est déposée dans la terre, son imbibition commence, à condition que la teneur en eau du sol qui l'entoure soit suffisante. La mobilisation des réserves est ensuite déclenchée suite à des modifications hormonales, qui induisent des réactivations enzymatiques (Le Deunff et al., 2004 ; Lawrence et al., 1990).

Après ce stade, une deuxième étape du développement de la semence, marquée par la diminution de l'entrée d'eau et l'allongement des différents organes de la plantule, commence ; c'est **la croissance hétérotrophe de la plantule sous terre** (définit la phase plantule, n'accédant toujours pas à la lumière). En présence permanente, des deux conditions nécessaires : l'eau et l'oxygène ; les processus respiratoires et mitotiques ainsi que la synthèse

d'hydrolases (telles que les α-amylases, les nucléases ou les protéinases) nécessaires à la dégradation des réserves, à la division et l'élongation cellulaire, sont activés. Ceci permet, la sortie de la radicule des téguments (Negbi el al., 1968) qui, une fois réalisée, aboutit au début d'absorption d'éléments minéraux, la colonisation rapide de la racine des premiers centimètres du sol (Cooper, 1977 ; Durrant et Mash, 1989 ; Dure et al., 1981). Ensuite, l'hypocotyle continue à s'allonger pour que la plantule soit hors de la terre (début de la levée de la plante) et à partir duquel elle commence sa photosynthèse et la jeune plante devient autotrophe et continue à croître et développer de nouvelles feuilles et racines. En plus des facteurs influençant sur la germination de la semence, un autre facteur s'ajoute pour contrôler sa croissance hétérotrophe ; c'est le risque de rencontrer des obstacles mécaniques : mottes, horizon compact, croûte à la surface (Tamet et al., 1995 ; Durr et al., 1992 ; Arndt, 1965 ; Awadhwal et Thierstein, 1985). Puis, **la phase de croissance post-germinative,** commence avec de nouveau une entrée d'eau et une augmentation importante de la respiration. **La germination, l'allongement hétérotrophe des semences**, mais aussi l'installation de la plantule, varient entre les différentes espèces cultivées en fonction de la taille, de la quantité de réserves ou du génome de la graine (Awadhwal et Thierstein 1985 ; Durrant et al., 1988, Benjamin, 1990 ; Boiffin et al., 1992 ; Tamet et al., 1996 ; Klos et Brummer, 2000 ; Valenciano et al., 2004).

Les conditions du milieu : température, lumière, humidité autour de la graine, pluviométrie, état structural du sol et la teneur en oxygène de l'environnement proche de la semence ainsi que d'autres éléments (Côme, 1975), représentent des facteurs essentiels et très délicats pour un meilleur contrôle et une amélioration du développement de la plante. La température a un effet direct sur le métabolisme et sur le taux d'oxygène dissout ; les relations entre vitesse de germination ou d'allongement des organes et la température utilisée ont été abondamment étudiées dans la littérature pour de très nombreuses espèces (Bierhuizen et Wagenwort, 1974 ; Covell et al., 1986 ; Fyfield et Gregory, 1989 ; Marshall et Squire, 1996 ; Squire, 1999). La lumière inhibe la germination des espèces photosensibles négatives et stimule les photosensibles positives. Les effets du potentiel hydrique sur la germination ont été peu étudiés et les travaux concernant cet aspect au stade plantule sont rares (Bouaziz et Bruckler, 1989 a, b et c).

Le résultat au champ est très variable selon les conditions du milieu qui interagissent avec les caractéristiques de l'espèce végétale considérée ; en d'autre terme, pour un meilleur développement de la semence, une évaluation et une quantification des caractéristiques de

l'espèce mais aussi celles du milieu ont été réalisées dans plusieurs études récentes en biologie végétale.

1.2. Importance des légumineuses cultivées

Les légumineuses (*Fabaceae*) sont définies par leur structure florale spécifique, la cosse de leur fruit et surtout par l'aptitude (88% des espèces examinées) à former des symbioses fixatrices d'azote avec les bactéries de la famille des *Rhizobiaceae* (de Faria et al., 1989). La fixation de l'azote atmosphérique, en symbiose avec des microorganismes du sol, est une spécificité très marquée de la famille des légumineuses, qui est composée essentiellement de 3 sous familles : Papilionoideae, Caesalpinioideae et Mimosoideae (Doyle et Luckow, 2003) avec environ 20.000 espèces (Gepts et al., 2005). Economiquement, la sous famille des Papilionoideae est la plus importante en termes d'espèces cultivées : le soja (*Glycine max*), le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le pois (*Pisum sativum*), la luzerne (*Medicago sativa*), l'arachide (*Arachis hypogaea*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), et la fève (*Vicia faba*). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés Galegoides et Phaseoloides, à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Broughton et al., 2003).

La culture des légumineuses est réalisée principalement pour assurer une consommation humaine (haricot, pois, fève …) suffisante car elles sont considérées comme source de protéines mais aussi pour assurer l'alimentation animale (soja, luzerne,…) ; elles sont au deuxième rang après les graminées pour la satisfaction des besoins alimentaires de l'homme (Graham et Vance, 2003). D'autre part, elles sont aussi une source très importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène). En agriculture, dans un système de rotation de culture, les légumineuses permettent de fertiliser les sols en azote, limitant les apports d'engrais.

Selon leurs aspects, les légumineuses se divisent en deux catégories : les légumineuses à graines et les légumineuses fourragères. Les légumineuses à graines constituent toujours une part importante de l'alimentation du monde, particulièrement dans les pays en développement. Citons le Haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le Pois Chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et la Fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le Soja (*Glycine max*) en Asie ainsi que l'Arachide (*Arachis hypogea*) et le Pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier. Les graines de légumineuses sont plus riches en protéines et moins riches en glucides que celles de céréales (Bewley et Black, 1994) : on distingue les espèces à graines riches en protéines et en huile, sans amidon, classées comme oléagineuses (soja, arachide) et

les espèces à graines riches en protéines, classées comme protéagineuses (pois, féverole) ou légumes secs (haricot, lentille et pois chiche). La seconde catégorie dite « légumineuses fourragères » est exploitée pour sa partie aérienne riche en protéines et est essentiellement destinée à l'alimentation animale. Beaucoup d'espèces sont inféodées à la prairie permanente. Adaptées aux situations de concurrence pour des niveaux en azote minéral dans le sol ou ayant développé des mécanismes d'adaptation à la concurrence pour la lumière au niveau de leurs parties aériennes, pérennes pour beaucoup d'entre elles, elles tendent à disparaître de ces peuplements dès lors que la fertilisation azotée est plus forte (Duc et al., 2010).

En plus de ces qualités alimentaires, les légumineuses jouent un rôle capital dans la préservation de l'environnement ; dans la lutte contre la désertification et dans la restauration des milieux dégradés. Le but est essentiellement environnemental mais la contribution à la ressource fourragère est cependant toujours essentielle à la subsistance des agro-pasteurs. Il a été proposé d'utiliser les légumineuses annuelles indigènes (Gintzburger, 1984) et en particulier les médics *(Medicago* annuelles) pour régénérer les parcours dégradés des zones semi-arides et arides.

Enfin, outre ces bénéfices qu'elles entraînent pour l'alimentation et l'environnement, les légumineuses peuvent être utiles dans diverses industries alimentaires (lait et dérivés, pain, tourteau) et chimiques (plastique biodégradable, huile, bio-diesel, colorants, gomme, textile, papier…) (Graham et Vance, 2003). Plusieurs légumineuses ont été utilisées dans l'industrie pharmaceutique (Duke, 1992 ; Kindscher, 1992). Les isoflavones du soja et d'autres légumineuses ont été pressenties pour diminuer les risques de cancer et les effets du cholestérol (Kennedy, 1995 ; Molteni et al., 1995).

2. *Medicago Truncatula,* plante modèle pour l'étude des interactions plante-stress abiotique

La luzerne tronquée (*Medicago truncatula*) est une espèce végétale herbacée des régions méditerranéennes. Elle appartient à la famille botanique des Fabacées, plus couramment nommées Légumineuses ou Papilionacées (Doyle and Luckow, 2003).

2.1. Historique

Quelques soient, fourragères ou à graines, les légumineuses ont joué un rôle historique important dans la naissance de l'agriculture. Plus précisément, La luzerne cultivée appartient à un complexe d'espèces avec plusieurs niveaux de ploïdie. L'espèce *Medicago sativa ssp sativa*, originaire du croissant fertile, à tiges dressées, à fleurs bleues et à gousses spiralées, est

introduite en Europe et en France à l'occasion des conquêtes arabes par le Sud (Prosperi et al., 2000). La sous espèce *Medicago sativa ssp falcata*, à port prostré, à fleurs jaunes et à gousses en faucille est spontané dans une grande partie de la France. C'est le croisement entre ces deux types qui va donner naissance aux types Flamands et Provence que nous connaissons encore aujourd'hui, populations où l'on peut retrouver trace de cette origine par la présence de plantes à fleur bigarrée. Les travaux sur les légumineuses fourragères bénéficient d'avancées importantes en biologie moléculaire (Julier et al., 2003),

Bien qu'importantes sur les plans économique, écologique et industriel, les légumineuses cultivées présentent des caractéristiques biologiques qui retardent leur amélioration génétique. En général, elles ont un grand génome et sont souvent polyploïdes mais leur transformation par *Agrobacterium* est délicate voire impossible. De ce fait, l'idée innovante d'identifier une espèce légumineuse modèle qui serait plus facile à manipuler et à étudier, vue sa synthénie avec les légumineuses cultivées dans le but d'accélérer les recherches fondamentales et l'amélioration génétique concernant les traits agronomiques d'intérêt.

2.2. *Medicago truncatula* plante modèle

2.2.1. Caractéristiques

Dans le genre *Medicago*, l'espèce *truncatula* regroupe de nombreux génotypes différents. Les plus utilisés en laboratoire sont A17, issu du *cultivar Jemalong*, et R-108, issu de l'écotype 108-1. Le *cultivar Jemalong* a été utilisé dans les études de germination présentées ici. En effet, malgré la forte homogénéité génétique inhérente à tous les génotypes, celui-ci présente une cinétique de germination beaucoup plus reproductible d'un individu à l'autre. De plus, les taux de germination sont élevés : de l'ordre de 95% après une simple levée de dormance au froid. Une plante de *M. truncatula* peut produire entre 500 et 1000 graines et elle est capable d'effectuer à la fois une symbiose avec *Sinorhizobium meliloti* et avec des endomycorhizes contrairement à *A. thaliana*. Plusieurs agents pathogènes (champignons, oomycètes, bactéries et virus), qui attaquent les légumineuses cultivées (Tivoli et al., 2006 ; Rose, 2008), ont *Medicago truncatula* comme plante hôte.

Elle est diploïde (2n=16), autogame et annuelle. Elle possède un génome de faible taille, 550 Mpb soit environ 4 fois celui d'*A. thaliana* (Blondon et al., 1994). Elle présente une forte variabilité biologique pour le port, la périodicité des plantes, le nombre des graines par gousses, l'efficacité de nodulation et de fixation de l'azote. La réponse aux parasites (Cook et al., 2000) a mis en évidence des réactions contrastées dans différents génotypes permettant donc d'envisager plus facilement des approches génétiques pour identifier les régions du

génome impliquées dans le caractère étudié. Il existe une forte synthénie (conservation de l'ordre d'alignement des marqueurs ou des séquences le long des chromosomes) entre le génome de *M. truncatula* et de plusieurs autres légumineuses, notamment de *M. sativa* et du pois (Zhu et al., 2005 ; Aubert et al., 2006). Des outils génétiques (cartes génétiques et RILs) ont été générés par plusieurs laboratoires (Thoquet et al., 2002 ; Choi et al., 2004 ; Julier et al., 2007 ; kamphuis et al., 2008) ; *M. truncatula* est facilement transformée par *Agrobacterium rhizogenes* et *A. tumefascience* (Boisson-Dernier et al., 2001). Par ailleurs, de nombreux outils et ressources génétiques et génomiques, tels que le séquençage en cours de son génome, des cartes génétiques, des banques de BACs et d'ESTs, des puces de microarray, des mutants... sont maintenant disponibles (Sato et al., 2007 ; Ané et al., 2008) et ont permis d'aborder l'analyse de nombreux processus biologiques et physiologiques relatifs tant au développement de la plante (Julier et al., 2007 ; Pierre et al., 2008) qu'à l'analyse des interactions biotiques ou abiotiques (pour revue : Rose, 2008).

Ces constats ont amené la communauté scientifique internationale qui travaille sur les Légumineuses à proposer *Medicago truncatula* comme plante modèle, non seulement pour l'étude des effets des stress abiotiques et des symbioses, mais aussi pour l'analyse des interactions Légumineuses-parasites (Cook, 1999 ; Young et al., 2003).

2.2.2. Application dans la recherche

Les recherches en physiologie végétale et en génétique, sur la luzerne, ont fortement progressé en vue de comprendre les déterminants de l'architecture et de la phénologie des plantes, qui contribuent à l'élaboration du rendement et de la qualité. Des travaux sont également menés en vue de comprendre les mécanismes et les bases génétiques de la résistance aux maladies. L'analyse de la valeur alimentaire est également une thématique importante. On notera les travaux conduits sur l'utilisation de la luzerne en alimentation animale (Andurand et al., 2010), ainsi que l'étude du rôle des tannins condensés sur la valorisation des protéines alimentaires par les ruminants et sur les émissions de méthane. Les travaux de biologie moléculaire (Baranger et al., 2010) conduits en France chez le pois et appuyés par les homologies avec l'espèce modèle *Medicago truncatula* (Zhu et al., 2005) (développements de cartes génétiques, mutants de tilling, séquençage), ont permis de construire des cartes génétiques denses (Loridon et al., 2005 ; Aubert et al., 2006) et d'identifier des zones du génome du pois et des gènes impliqués dans le déterminisme de caractères d'intérêt agronomique (résistances aux maladies et au froid, architecture, relations symbiotiques, composition de la graine) ; des cartes génétiques denses et des ressources

moléculaires sont disponibles pour la luzerne au niveau national (Julier et al., 2003). Ces travaux peuvent s'appuyer sur la ressource considérable que constitue la légumineuse modèle *Medicago truncatula* ; donc elle a été proposée comme légumineuse modèle (Barker et al., 1990 ; Cook, 1999) en raison de ses nombreux atouts aux niveaux de la biologie, de la génétique et des différents outils génomiques qu'elle offre (Huguet et Prosperi, 1996 ; Young et al., 2005).

De plus, *M. truncatula* présente une grande synthénie avec beaucoup de légumineuses cultivées tels que le pois et la luzerne pérenne (Zhu et al., 2005), permettant ainsi le transfert des acquis sur cette plante modèle vers ces légumineuses. Ces avantages sont mis à profit pour des études de génomique fonctionnelle et structurale en vue de l'identification des gènes agronomiques intéressants, ainsi que l'étude des interactions légumineuses-agents pathogènes et symbiotes (Cook, 1999 ; Cook et al., 2000).

3. Métabolisme de l'azote

Le métabolisme de l'azote n'est pas seulement, un des processus fondamentaux de la physiologie de la plante, mais aussi l'une des parties importantes du cycle de la chimie mondiale. L'assimilation de l'azote des plantes prend directement part à la synthèse et la conversion des acides aminés à travers la réduction des nitrates. Au cours de leur cycle de vie, les plantes doivent être capables de s'adapter à de grandes variations dans l'approvisionnement en azote du sol (N). Les changements dans la disponibilité de N, et dans les concentrations relatives de NO_3^- et du NH_4^+, sont connus pour avoir de profonds sur la régulation des systèmes d'absorption d'azote dans la racine, et le métabolisme de l'azote et du carbone dans les plantes.

La réalisation de cette intégration des réponses au niveau de la plante entière implique des mécanismes de signalisation qui peuvent communiquer des informations sur la disponibilité de l'azote dans les racines et des informations sur le statut C / N dans la plante (Walch-Liu et al., 2005).

3.1. Source et cycle de l'azote

Il existe 3 sources d'azote : l'azote atmosphérique (N2), l'azote minéral (nitrates NO_3^- et NH_3/NH_4^+) et l'azote organique (acide aminé et protéine). Le nitrate constitue la source d'azote majoritaire dans les sols (Marschner, 1995). C'est un ion chargé négativement, et ainsi, il n'est pas retenu par le complexe argilo-humique du sol, qui porte aussi une puissante charge négative. Très soluble, le nitrate apporté en excédent dans le sol, est entraîné par

lessivage et contribue à la pollution des nappes phréatiques. Les nitrates subissent un lessivage important et les nitrates sont la forme préférentielle des plantes (figure I.5). Ils sont réduits en nitrites puis en ammonium. L'ammonium se trouve également dans le sol.

Les protéines sont dégradées pour reformer de l'azote minéral à partir de l'azote organique. La formation d'humus permet l'ammonisation : retour au NH3. Enfin les bactéries nitrificatrices permettent la nitrification des sols. Ce sont des bactéries chimio synthétiques. La réaction est exergonique et l'énergie récupérée permet de fixer le CO_2.

Le nitrate (NO_3^-), l'ammonium (NH_4^+) et l'urée ($CO(NH)_2)_2$ sont les formes d'engrais azotés les plus utilisées. Dans le sol, nitrate et ammonium sont les deux principales formes d'azote inorganique disponibles pour la plante (Raven et al., 1992). Dans les sols bien aérés, la nitrification est rapide : il en résulte une faible concentration en ammonium. Dans les sols détrempés ou acides, l'ammonium s'accumule (Crawford et Forde, 2002). Les plantes non fixatrices de l'azote atmosphérique absorbent et assimilent ces deux formes d'azote anionique (NO_3^-) et cationique (NH_4^+).

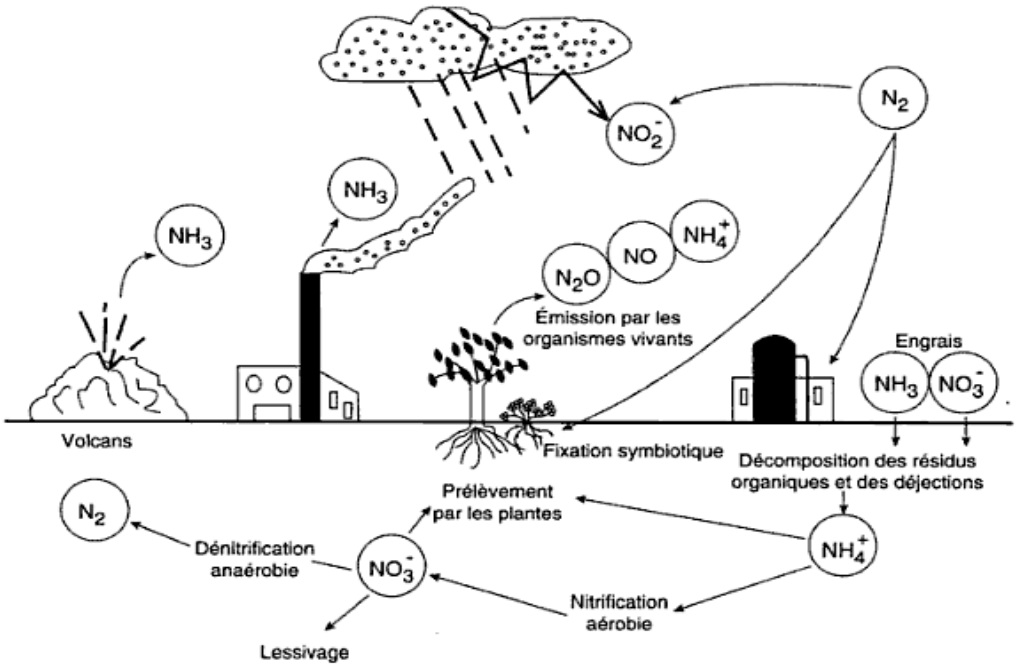


Figure I.5 : Le cycle de l'azote (d'après Morot-Gaudry, 1998)

La fixation biologique de l'azote est effectuée par des microorganismes, soit autonomes soit en symbiose avec des plantes supérieures. En dehors des légumineuses, seul un petit nombre d'espèces (quelques centaines au plus) possèdent des nodules fixateurs d'azote. Il

s'agit exceptionnellement d'une association avec les Rhizobiums (on ne connaît qu'un seul exemple: *Parasponia*) mais le plus souvent la symbiose est réalisée avec des actinomycètes (bactéries filamenteuses) du genre *Frankia* (Benson et Silvester, 1993).

Une approche de biologie intégrative a été menée chez *Medicago truncatula* pour élucider, d'une part, la régulation coordonnée de NO_3^-, NH_4^+ et l'acquisition du N_2 par les légumineuses pour satisfaire la demande d'azote par la plante, et d'autre part, la modélisation des propriétés émergentes observées à l'ensemble de la plante. En situation d'un niveau élevé d'azote minéral, les trois voies d'acquisition d'N sont identiquement réprimées.

Cela pour que la plante puisse assurer ces besoins en azote pour son développement et sa croissance et pour qu'elle puisse assurer des réserves nutritives utilisables en temps de contraintes biotiques et abiotiques.

3.2. Assimilation de l'azote chez les plantes

L'azote, incorporé dans les molécules biologiques des plantes, est sous deux formes : gazeuse (78% de l'air) ou minérale ; avec deux processus possibles : la fixation biologique, par des microorganismes fixateurs et la fixation de l'azote minéral. Il est ensuite converti en ammoniac qui sera transformé en groupement amine ou amide.

3.2.1. Absorption de l'azote minéral : nitrate et ammonium

Les concentrations en nitrate et ammonium dans les sols varient selon le degré de minéralisation et de nitrification (quelques micromolaires à plusieurs millimolaires) (Marschner, 1995). Des systèmes très spécifiques de transport de nitrate ou d'ammonium ont été développé chez les plantes : un système de transport à haute affinité ou HATS pour High Affinity Transport System, et un système de transport à basse affinité ou LATS pour Low Affinity Transport System (Crawford et Forde, 2002).

L'assimilation de l'azote du sol implique tout d'abord le franchissement de la membrane plasmique des cellules racinaires. Dans le cas du nitrate, le potentiel négatif de la membrane ainsi que le gradient de concentration ne permettent pas, en général, l'entrée passive du nitrate dans le cytoplasme, et un système de transport actif couplé à une H^+/ATPase est donc nécessaire (Glass et Siddiqi, 1995). Les transporteurs de nitrate sont codés par deux familles de gènes: les gènes *NRT1* impliqués dans le transport à faible affinité et les gènes *NRT2* responsables du transport à haute affinité (Forde, 2000). Toutefois, le gène At*NRT1.1*, initialement identifié comme un transporteur de nitrate à basse affinité (Tsay et al., 1993), est également impliqué dans le transport à haute affinité (Liu et al., 1999 ; Liu et Tsay, 2003).

Dans le cas d'ammonium, son transport actif est assuré par un uniport d'ammonium voltage dépendant, piloté par la famille de transporteurs AtAMT (Ludewig et al., 2002). La complémentation fonctionnelle d'un mutant de levure, déficient pour le transport de l'ammonium, a permis d'identifier le premier gène *AMT1* : *AtAMT1.1* (Ninnemann et al., 1994). Depuis, l'analyse du séquençage complet du génome d'Arabidopsis a révélé cinq autres séquences homologues (*AtAMT1.1* à *AtAMT1.5)* (Gazzarrini et al., 1999 ; Sohlenkamp et al., 2000).

3.2.2. Régulation de l'absorption et devenir de l'azote dans la plante

Les protéines, responsables de chacun des deux systèmes de transport du nitrate (HATS et LATS), appartiennent à une famille multigénique de transporteurs (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000 ; von Wirén et al., 2000 ; Orsel et al., 2002), et sont finement régulées en fonction de la source d'azote disponible et du statut nutritionnel de la plante.

L'ammonium interagit également avec les systèmes d'absorption du nitrate : à faible concentration, l'ammonium a un effet inducteur rapide (Bloom et Sukrapanna, 1990). Par contre, à concentration plus élevée, l'ammonium inhibe rapidement et réversiblement l'absorption du nitrate (Lee et Drew, 1989). Plus généralement, une régulation négative de type *feedback* serait imposée par les produits de l'assimilation de l'ammonium comme les acides aminés (Muller et al., 1995).

Le cycle jour/nuit constitue un autre niveau de régulation qui permet de coordonner l'absorption du nitrate avec la photosynthèse et le métabolisme carboné. L'absorption nette du nitrate augmente continuellement au cours de l'éclairement et décroît à l'obscurité (Lejay et al., 1999). Les glucides, produits de la photosynthèse, seraient les acteurs de cette régulation de l'absorption du nitrate (Delhon et al., 1996). L'addition de saccharose dans le milieu de culture au cours de la période nocturne induit notamment les gènes *AtNRT1.1* et *AtNRT2.1* (Lejay et al., 1999, 2003).

L'absorption d'ammonium serait principalement régulée par le statut azoté régnant localement autour de la racine, à la différence de la régulation par le statut azoté de la plante entière dans le cas de l'absorption du nitrate (Gansel et al., 2001). La glutamine exercerait aussi un rétro-contrôle négatif sur la transcription du gène *AtAMT1.1* (Rawat et al., 1999). L'absorption d'ammonium par les racines varie aussi en fonction du rythme diurnal. Après une augmentation continuelle durant la période lumineuse, l'absorption de l'ammonium diminue à l'obscurité (Ourry et al., 1996 ; Gazzarrini et al., 1999).

Le nitrate métaboliquement actif, disponible dans le cytosol, doit nécessairement être réduit en ammonium pour être assimilé. La réduction du nitrate est assurée par l'action successive de deux enzymes, la nitrate (NR) et la nitrite (NiR) réductase. Dans le cytosol, la NR catalyse la réduction du nitrate en nitrite. Toxique, le nitrite est immédiatement transféré dans les plastes où il est pris en charge par la NiR et réduit en ammonium (Figure I.6). L'ammonium, toxique pour la plante, doit être immédiatement assimilé. Les trois enzymes glutamine synthétase (GS), glutamate synthase (GOGAT), et glutamate déshydrogénase (GDH) sont les principaux acteurs des processus d'assimilation de l'ammonium issu de l'absorption racinaire ou 'assimilation primaire' et de sa réassimilation dans la plante (Figure I.6).

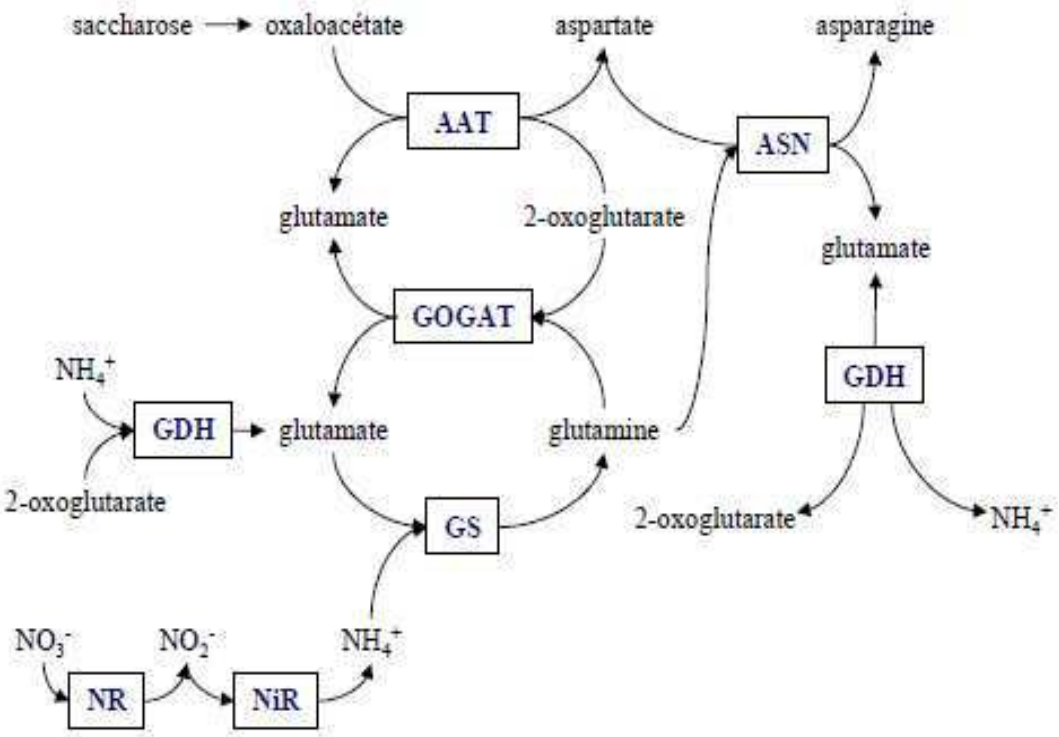


Figure I.6 : Voie d'assimilation de l'azote (d'aprèsCoruzzi, 2003).
GS : glutamate synthétase ; **GOGAT :** glutamate synthase ; **AAT :** aspartate aminotransférase ; **ASN :** asparagine synthétase ; **GDH :** glutamate déshydrogénase ; **NiR :** nitrite réductase ; **NR :** nitrate réductase.

3.3. Synthèse et transport des acides aminés

L'action combinée de la GS ATP-dépendante et de la GOGAT au cours du cycle GS/GOGAT aboutit à l'incorporation de l'ammonium dans les acides aminés.

En fait, l'ion ammonium est incorporé au glutamate par la GS pour former la glutamine ; d'autre part, la GDH catalyse la conversion du glutamate en ammonium et α-cétoglutarate ainsi que la réaction inverse, c'est-à-dire l'amination de l'α-cétoglutarate (Figure I.6) (Aubert et al., 2001). Ensuite, un transfert d'un groupement amide de la glutamine sera effectué à l'α-cétoglutarate par la GOGAT. Deux molécules de glutamate sont ainsi formées, l'une étant recyclée pour la formation de glutamine, l'autre utilisée pour la synthèse des acides aminés (Hirel et Lea, 2001 ; Miflin et Habash, 2002 ; Figure I.6). Les premières sources d'azote réduit dans la cellule sont la glutamine et le glutamate, qui peuvent alors être utilisés pour former aspartate et asparagine via les deux enzymes aspartate aminotransférase (AAT) et asparagine synthétase (ASN), ainsi que les autres acides aminés et molécules azotées.

Glutamine, glutamate, aspartate et asparagine, assurent alors la translocation de l'azote des organes source vers les organes puits (Peoples et Gifford, 1993).

- Deux isoformes de **glutamine synthétase (GS)** existent, aux rôles et localisations différents : La GS1, cytoplasmique, interviendrait surtout pour l'assimilation de l'azote dans les racines (pour revue, voir Coruzzi, 2003) ; La GS2, localisée dans le chloroplaste, joue un rôle prépondérant dans l'assimilation de l'ammonium issu de la réduction du nitrate dans les chloroplastes et/ou dans la réassimilation de l'ammonium photorespiratoire.
- Deux types de **glutamate synthase (GOGAT)** existent, localisées dans le chloroplaste : la ferrédoxine (Fd-GOGAT), qui a un rôle prépondérant dans l'assimilation primaire de l'ammonium et la NADH-GOGAT qui serait plus spécifiquement impliquée dans les processus de réassimilation de l'ammonium photorespiratoire (pour revue, voir Coruzzi, 2003).
- **La glutamate déshydrogénase (GDH) :** Deux formes majeures de GDH ont été identifiées : une forme à NADH dépendante dans les mitochondries et une forme à NADPH dépendante dans les chloroplastes (Melo-Oliveira et al., 1996). Le rôle majeur de la GDH serait la désamination du glutamate pour fournir l'énergie et les squelettes carbonés (Miflin et Habash, 2002 ; Masclaux-Daubresse et al., 2006).
- **L'aspartate aminotransférase (AAT)**, enzyme phosphate-dépendant, catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé du glutamate vers l'oxaloacétate pour former

l'aspartate et l'α-cétoglutarate (Schultz et Coruzzi, 1995 ; Wilkie et al., 1995). Il existe en plusieurs formes : mitochondrial (AAT1), cytosoliques et chloroplastique (AAT3). AAT2 et AAT3 sont les formes majoritaires (Coruzzi, 2003). AAT2 assure la synthèse des pools d'aspartate à la lumière, qui est utilisé pour la synthèse de l'asparagine à l'obscurité. AAT2 jouerait aussi un rôle important dans le transport de l'azote jusqu'à la silique (Miesak et Coruzzi, 2002).

- **L'asparagine synthétase (ASN)** catalyse le transfert ATP-dépendant d'un groupe aminé de la glutamine vers une molécule d'aspartate pour former glutamate et asparagine (Lam et al., 1998 ; Sieciechowicz et al., 1988 ; Wong et al., 2004).

Par transamination, l'azote est ensuite transféré à d'autres substrats carbonés (acides α-cétoniques) pour former de nouveaux acides aminés (aspartate, alanine, glycine …), eux-mêmes précurseurs de tous les autres acides aminés. Les acides aminés synthétisés peuvent aussitôt contribuer à la biosynthèse des protéines, ou être transitoirement stockés dans les vacuoles, ou transportés vers d'autres tissus.

3.4. Coordination entre métabolisme azoté, photosynthèse et respiration

La coordination entre métabolisme azoté, photosynthèse et respiration est très complexe (Bloom et al., 1989) ; en absence de lumière, le saccharose et l'amidon sont oxydés pour fournir l'énergie et les squelettes carbonés, mais en présence de lumière, si la photosynthèse demeure le fournisseur principal d'ATP, NADPH et d'α-cétoglutarate, il n'est pas exclu que la glycolyse et le cycle de Krebs puissent fournir aux chloroplastes un supplément énergétique et de molécules organiques pour assurer l'assimilation de l'azote (Weger et Turpin, 1989).

Le métabolisme azoté est très dépendant du métabolisme carboné ; il se déroule dans plusieurs compartiments cellulaires :

- **Dans le cytosol**, le nitrate est réduit en nitrite et l'ammonium peut être intégré au glutamate pour donner la glutamine. Il est aussi le lieu de la glycolyse, du cycle d'oxydation des pentoses, du cycle anaplérotique de fixation du carbone et de la voie de synthèse du saccharose et de l'α –cétoglutarate.
- **Dans les chloroplastes,** la réduction du nitrite en ammonium, la synthèse de glutamine, la synthèse de glutamate à partir de glutamine et d'α-cétoglutarate, la synthèse et la dégradation de l'amidon.

- **Dans les mitochondries,** l'α-cétoglutarate, le malate et la sérine sont synthétisés (Woo et al., 1987).
- **Enfin, dans les peroxysomes,** la synthèse de la glycine photorespiratoire et les réactions de transamination liées à ce métabolisme.

La corrélation des métabolismes azoté et carboné est assurée non seulement par les échanges énergétiques entre compartiments cellulaires mais aussi également par la modification de l'état d'activation de certaines enzymes du métabolisme azoté ; citons l'exemple de l'état de phosphorylation/déphosphorylation de la nitrate réductase, fortement lié à la fixation photosynthétique du CO_2. Pour cela, une plante privée de CO_2 est très vite inhibée dans ses capacités à assimiler l'azote aussi bien dans les feuilles que dans les racines.

L'apport de NO_3^-, NO_2^- et NH_4^+ augmente l'activité respiratoire et comme la respiration est connue pour fournir l'énergie (pouvoir réducteur NADH et ATP) et les squelettes carbonés (α-cétoglutarate) nécessaires à l'assimilation de l'azote, en conséquence, l'assimilation de l'azote est diminuée fortement en anoxie.

4. Hypoxie racinaire induite par l'inondation et développement de la plante

Les plantes sont soumises à un grand nombre de facteurs environnementaux et biologiques. Ces conditions, parfois défavorables, pourraient affecter la croissance normale et le développement des plantes, en termes de qualité des aliments et du rendement (Voesenek et al., 2006). Un de ces facteurs principaux est l'hypoxie racinaire induite par l'inondation ; ce stress a des effets néfastes sur l'environnement et grave sur la germination, l'établissement des semis et le développement des plantes (Subbaiah et Sachs, 2003). Les inondations représentent un phénomène très répandu, qui réduit considérablement la croissance et la survie des plantes terrestres et donc, un impact énorme sur la croissance et la survie des plantes ainsi que sur l'agriculture et les écosystèmes naturelles. Les inondations influencent la présence et la répartition des espèces végétales (Blom et Voesenek, 1996). la diffusion du gaz dans l'eau par rapport à l'air, est un phénomène essentiel pour le bon fonctionnement des systèmes de régulation et de synthèse des plantes terrestres ; en d'autre terme, l'hypoxie limite la disponibilité en oxygène pour les plantes en réduisant les échanges gazeux entre les tissus de la plante et l'atmosphère (Setsuko et al., 2007 ; Ponnamperuma, 1989) ; dès que le sol est inondé et tous les pores sont remplis, les échanges gazeux, entre le sol et l'atmosphère, sont fortement limitées.

4.1. Effets de l'hypoxie racinaire sur le phénotype de la plante

Des expériences effectuées chez plusieurs modèles d'étude végétale ont été réalisées, pour tester les effets de l'hypoxie racinaire (1-2% d'oxygène au lieu de 20% en normoxie) induite par l'inondation, sur la physiologie des plantes et sur la composition biochimique de leurs fruits.

Les plantes ont développé plusieurs réponses pour atténuer les conséquences du déficit en oxygène lors de l'inondation des sols. La combinaison de ces réponses adaptatives représente la solution pour échapper le stress hypoxique ; Parmi ces adaptations, différents changements anatomiques et morphologiques sont identifiés tels que l'allongement de la tige (Voesenek et al., 1990 ; Bailey et Voesenek, 2008), la présence des films de gaz autour des racines et des feuilles des plantes inondées, une forte absorption de nitrate dans le milieu, une réduction de l'activité photosynthétique et de la teneur en chlorophylle et une accélération de la maturation des fruits, mais n'affecte pas la taille finale des fruits. D'autres études ont montré que l'hypoxie racinaire induite par l'inondation entraîne la réduction significative de l'allongement de la tige, masse des pousses, la masse racinaire et le nombre de feuilles, la longueur des pétioles qui contribue à une meilleure performance et la fermeture des stomates avec des altérations métaboliques, responsables de la réduction de l'incorporation du CO_2 (Liao et Lin, 2001 ; Huber et al., 2009). Enfin, l'hypoxie racinaire peut ralentir la germination des graines et provoque leurs mort (Ismail et al., 2009 ; Christianson et al., 2010).

4.2. Effet de l'hypoxie racinaire sur le métabolisme azoté

Lorsque la fonction des racines est perturbée par les inondations du sol, le transfert d'oxygène aux racines est ralentit, limitant ainsi leur respiration aérobie (Drew, 1997 ; Saglio et al., 1988). Dans les tissus hypoxiques, l'activité métabolique diminue en parallèle avec la diminution de la disponibilité d'oxygène et la fermentation est induite (Geigenberger et al., 2000). Le stress hypoxique peut également conduire à une formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène, qui induisent l'oxydation des phospholipides et des protéines (Szal et al., 2004) et qui limite le transport de l'eau et des minéraux aux feuilles et par suite diminue l'activité photosynthétique (Pezeshki, 2001).

Parmi les marqueurs de l'hypoxie racinaire, induite par l'inondation, chez les plantes, on peut citer les plus importants : l'acide γ-aminobutyrique ou GABA et l'alanine qui est un acide aminé essentiel (Biais et al., 2010).

Chez les plantes, plusieurs rôles ont été attribués au métabolisme du GABA tels que l'osmorégulation (Shelp et al., 1999) et le contrôle de l'homéostasie du glutamate (Masclaux-

Daubresse et al., 2006). En outre, il a été démontré que le GABA participe aussi à la régulation du pH (Carroll et al., 1994 ; Crawford, 1995) et le déroulement du cycle de Krebs (Studart-Guimarães et al., 2007). Trois principales enzymes interviennent dans le métabolisme du GABA, qui se déroule dans deux compartiments cellulaires (figure I.6) : cytosolique et mitochondriale ; GABA est principalement synthétisée à partir de L-glutamate grâce à l'activité glutamate décarboxylase cytosolique (GAD). Il est ensuite transporté dans la mitochondrie pour être transformée par le GABA transaminase (GABA-T) qui convertit le GABA en succinate semi-aldéhyde (SSA). Par la suite, le succinate semi-aldéhyde est oxydé par le succinate semi-aldéhyde déshydrogénase mitochondrial (SSADH) pour produire du succinate (Busch et Fromm, 1999). Alternativement, le succinate semi-aldéhyde peut également être réduit dans le cytosol via l'activité de γ-hydroxybutyrate déshydrogénase (GHBDH) qui produit le γ-hydroxybutyrate (GHB) (Breitkreuz et al., 2003).

Un résultat très marqué est relié à l'accumulation de l'acide γ -aminobutyrique (GABA) qui aboutit à une augmentation des taux d'alanine dans les plantes en hypoxie racinaire (Miyashita et Good, 2008).

Pour étudier la fonction du métabolisme du GABA sous hypoxie et sa contribution à l'accumulation de l'alanine, des études sont réalisées sur les gènes qui codent pour les deux enzymes clés du shunt GABA, glutamate décarboxylase (GAD) et GABA transaminase (GABA-T). Parmi les cinq gènes homologues GAD trouvés (GAD1-5) chez *Arabidopsis Thaliana*, l'expression GAD1 a été principalement trouvée dans les racines, tandis que l'expression GAD2 était présente dans tous les organes (Palanivelu et al., 2003 ; Reddy et al., 2002). L'expression des gènes des autres GAD, était généralement faible. En réponse à l'hypoxie, l'induction de la transcription a été observée pour GAD4 seulement. Pour GABA-T1, son expression a été détectée dans tous les organes, mais il n'y avait pas de changement significatif de la transcription dans des conditions hypoxiques.

L'inhibition partielle de l'accumulation d'alanine en hypoxie induite par l'inondation, dans les racines de ces mutants, suggère que le shunt GABA est, en partie, responsable de l'accumulation d'alanine en vertu de l'hypoxie (Miyashita et al., 2007).

La synthèse de l'alanine et du GABA est fortement inhibée par MSX (méthionine sulfoximine) et AZA (azasérine), les inhibiteurs de la glutamine synthétase et glutamate synthase qui jouent un rôle important dans l'accumulation d'acide aminé en condition de stress (Reggiani et al., 2000).

D'autre part, la production d'alanine apparait bien comme une voie importante dans la réponse à l'hypoxie racinaire : L'alanine est le seul acide aminé dont la biosynthèse n'est pas

inhibée par une carence en azote. Les changements métaboliques qui ont été induits suivant l'inondation peut être mieux expliqués par l'activation du métabolisme de l'alanine en combinaison avec la voie de l'acide citrique. L'importance du métabolisme de l'alanine apparait très claire vue sa capacité à réguler le niveau de pyruvate (Rocha et al., 2010a). En fait, l'alanine se forme à l'aide d'une enzyme : l'alanine aminotransférase (AlaAT) qui catalyse le transfert réversible d'un groupe amine à partir du glutamate et du pyruvate pour former 2-cétoglutarate ou oxoglutarate et l'alanine. Cette enzyme joue un rôle clé dans le métabolisme des plantes en reliant le métabolisme primaire du carbone avec la synthèse d'acides aminés ; AlaAT a une distribution très large dans la plante : son activité a été trouvé dans les feuilles, les racines et les organes floraux chez *Arabidopsis thaliana* (Igarashi et al., 2003), dans les fruits (Rech et Crouzet 1974) et dans les tissus internes d'endosperme des graines en développement de *Oryza sativa* (Kikuchi et al., 1999).

Medicago truncatula contient quatre gènes codant pour l'AlaAT (Ricoult et al., 2006) : AlaAT cytosolique (c-AlaAT ou AlaAT1) et mitochondriale (m-AlaAT ou AlaAT2), et l'alanine-glyoxylate (AGT1 et 2), avec une activité glyoxylate aminotransférase (Igarashi et al., 2003 ; Liepman et Olsen, 2003), catalyseurs, respectivement, des réactions réversibles d'alanine / oxoglutarate <==> glutamate / pyruvate et de l'alanine / glyoxylate <==> glycine / pyruvate, ont été exprimés dans les racines, les tiges et les feuilles ; l'analyse du fractionnement subcellulaire a montré que la l'activité GGAT est principalement située dans les peroxysomes. Sous stress hypoxique, m-AlaAT catalyse la synthèse d'alanine alors que la synthèse de glutamate à partir d'alanine amino est inhibée. La régulation de m-AlaAT s'effectue à la fois au niveau transcriptionnel et post-traductionnel pour augmenter son expression et orienter son activité, du produit de sa transcription vers la synthèse d'alanine sous hypoxie. Ainsi, l'activité fermentative de l'alanine aminotransférase (AlaAT) aboutit à bien régler le pH cytoplasmique sous hypoxie (Ricoult et al., 2005 ; Menegus et al., 1989) ; la synthèse d'alanine induit au moins deux avantages pour la tolérance de l'hypoxie : la conservation des squelettes carbonés qui seraient consommées par la glycolyse (Good et Muench, 1992, 1993), et la diminution de la disponibilité du pyruvate pour la synthèse du lactate qui permet d'éviter l'effet acide du lactate et la diminution du tau d'acétaldéhyde.

L'induction hypoxique de l'AlaAT1 a été démontré précédemment (Klok et al., 2002 ; Walch-Liu et al., 2005 ; Loreti et al., 2005) : le stress hypoxique induit rapidement la surexpression (régulation positive) d'AlaAT1 dès l'apparition du stress. D'autre stress, peuvent aussi régler l'expression d'AlaAT, comme la lumière et le stress azoté (Muench et al., 1998).

Dans des conditions hypoxiques, l'alanine est rapidement accumulé et devient l'un des plus abondants acides aminés dans les racines des plantes (Fan et al., 1997 ; Good et Muench, 1993 ; Reggiani et al., 1989 ; Streeter et Thompson, 1972). Cependant, le mécanisme d'accumulation d'alanine par réponse à l'hypoxie racinaire induite par l'inondation, n'est pas été bien élucidé. Il parait que l'AlaAT est l'enzyme hypoxique clé, responsable de la production d'alanine par réponse à ce stress (Good et Crosby, 1989 ; Muench et Good, 1994).
Chez les plantes d'Arabidopsis AlaAT1 mutantes (alaat1-1), une réduction très importante de l'activité AlaAT était détectée, ce qui suggère qu'AlaAT1 est l'isoenzyme AlaAT majeur chez Arabidopsis qui semble être crucial pour la conversion rapide de l'alanine en pyruvate (Miyashita et al., 2007).
Sous stress hypoxique, l'inactivation de la phosphorylation oxydative et l'accumulation du pyruvate aboutit à une production plus faible d'ATP (Sato et al., 2002) ; pour compenser les produits fermentatifs, comme l'acétaldéhyde, l'éthanol, et le lactate, accumulés, permettant la régénération du NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide), les enzymes de fermentation, à savoir, le pyruvate décarboxylase (PDC) de l'alcool déshydrogénase (ADH) et le lactate déshydrogénase (LDH)] sont induites ainsi pour augmenter la glycolyse. Pour tolérer ce stress hypoxique, la régénération du NAD^+ est très importante car, sans le NAD^+ la glycolyse s'arrête (Ismond et al., 2003 ; Kûrsteiner et al., 2003).
Pour aller plus loin dans l'implication de l'alanine, dans la réponse de la plante à l'hypoxie racinaire induite par l'inondation, la modulation du métabolisme de l'azote primaire, est étudiée chez les jeunes plantes de Medicago truncatula qui sont caractérisés par la régulation positive de l'alanine aminotransférase mitochondriale (mAlaAT) et du glutamate déshydrogénase 1 (GDH1) :
Le marquage à l'azote 15 de l'amonium (NH_4) a montré, pour la première fois, que la réaction d'adaptation de la plante à l'hypoxie consiste en une modification des flux d'azote par les voies de synthèse d'alanines et du glutamate. Sous hypoxie racinaire, le ^{15}N-alanine, nouvellement synthétisé, a augmenté et s'est accumulé comme le principal acide aminé, tandis que la synthèse d'asparagine est inhibée et le ^{15}N-glutamate est synthétisé à un taux similaire à celui du témoin. D'autre part, les voies de la fermentation sont catalysées par la pyruvate décarboxylase (PDC) et de l'alcool déshydrogénase (ADH), pour la production d'éthanol, et le lactate déshydrogénase (LDH) pour la production de lactate (Sato et al., 2002). Des taux plus élevés de la glycolyse et de la fermentation de l'éthanol sont détectés pour induire l'épuisement rapide des réserves de sucre et du carbone. L'expression de GDH1 a été stimulée par l'hypoxie induite par l'inondation, tandis que l'enzyme pourrait être impliqué au cours du

stress post-hypoxique contribuant à la régénération de 2-oxoglutarate par la voie du GDH (Limami et al., 2008).

5. Contexte scientifique et objectif de la thèse

Les effets négatifs de la submersion ou hypoxie racinaire sur la croissance des plantes sont principalement causés par l'inhibition des échanges gazeux entre la plante et son environnement (Armstrong et al., 1979).

Les travaux dans le laboratoire de Physiologie Moléculaire des Semences (PMS) se focalisent sur l'étude du métabolisme azoté chez le modèle *Medicago truncatula*. Une des thématiques de l'équipe est la recherche des réponses de la plantes vis-à-vis des stress abiotiques ; parmi ces stress, le stress hypoxique ou l'hypoxie racinaire induite par inondation (Bailey-Serres et Voesenek, 2008 ; Geigenberger et al., 2000).

Cette thèse est organisée en deux grandes parties : une partie d'étude phénotypique et une autre partie d'étude métabolomique :

L'objectif de la première partie est le suivant : « Evaluation (détermination) de l'effet de l'hypoxie racinaire sur la croissance des parties aériennes et racinaires chez *Medicago Truncatula :* Masse aérienne et masse racinaire (Masse fraiche et Masse sèche) » sous l'hypothèse suivante : «Sous hypoxie racinaire, on a une diminution de la biomasse (croissance) des plantes ».

Dans ce but, plusieurs méthodes de germination ont été mises en place et avait été conçues ; des plantes, soumises sous stress hypoxique, sont comparées à des plantes témoins et nous sommes focalisés sur l'étude des effets de l'hypoxie sur la croissance des plantes jeunes (âgées de 3 semaines).

L'objectif de la deuxième partie de la thèse est de montrer comment la plante va répondre à l'hypoxie racinaire induite par l'inondation en modifiant son métabolisme (Ricard et al., 1994 ; Streeter et Thompson, 1972).

Nous avons procédé à une analyse métabolomique des parties aériennes et racinaires des plantes sous stress hypoxique comparées toujours à des plantes contrôles, dans le but de comprendre l'effet de l'hypoxie racinaire sur le métabolisme azoté et carboné des plantes.

Chapitre II :

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique

1.1 *Medicago truncatula*

En raison de ces caractéristiques génétiques et de sa grande biodiversité naturelle, *Medicago truncatula* a été choisie comme modèle pour l'étude des Légumineuses, au sein de la famille des Papillionacés (Jonak et al., 1996, Cook, 1999). La lignée A17 (figure II.1), utilisée dans le monde de la recherche, est utilisée au cours de ce travail ; dans nos travaux, *Medicago truncatula* (A17) a été utilisée en différents stades de son développement.

1.2 Germination et culture des plantes

Les gousses du genre *Medicago truncatula*, caractéristiques propres des Légumineuses, renferment en moyenne 7 à 8 graines dont la dormance doit être levée avant la mise en germination. Dans un premier temps, les graines sont scarifiées par traitement chimique à l'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) pendant 5 à 6 minutes puis ensuite elles sont rincées 5 fois à l'eau distillée stérile. Une stérilisation supplémentaire des graines, selon leur état sanitaire, peut être réalisée en les incubant dans l'eau de Javel (à 2,5%), suivie de 4 nouveaux lavages dans l'eau stérile. Au dernier lavage, les graines sont gardées dans l'eau pendant 1heure pour l'imbibition et pour accélérer la réhydratation des graines. Pour toutes les manipulations, les graines imbibées sont transférées dans des boîtes de Pétri en verre de 90 mm de diamètre sur un papier filtre Whatmann (réf. 3236 Whatman) imbibé avec 3.5 ml de solution nutritive (voire composition en tableau II.1). Cinquante graines environ ont été disposées par boîte. Les boîtes sont ensuite placées dans un incubateur à 22°C à l'obscurité pendant 2 jours jusqu'à l'émergence de la radicule.

Les plantules sont ensuite cultivées dans des pots (Ø: 6.5 cm et 10 cm de hauteur), remplis par de la vermiculite et ensuite bien arrosés par la solution nutritive et cela jusqu'à ce que la solution sort du fond de chaque pot (c'est-à-dire que la vermiculite doit être très bien imbibée par la solution nutritive), dans une chambre de culture. La température est de 22°C, la photopériode est de 16h lumière /8h obscurité et l'hygrométrie est de 60-80%. Les plantes sont ensuite arrosées trois fois par semaine (figure II.2).

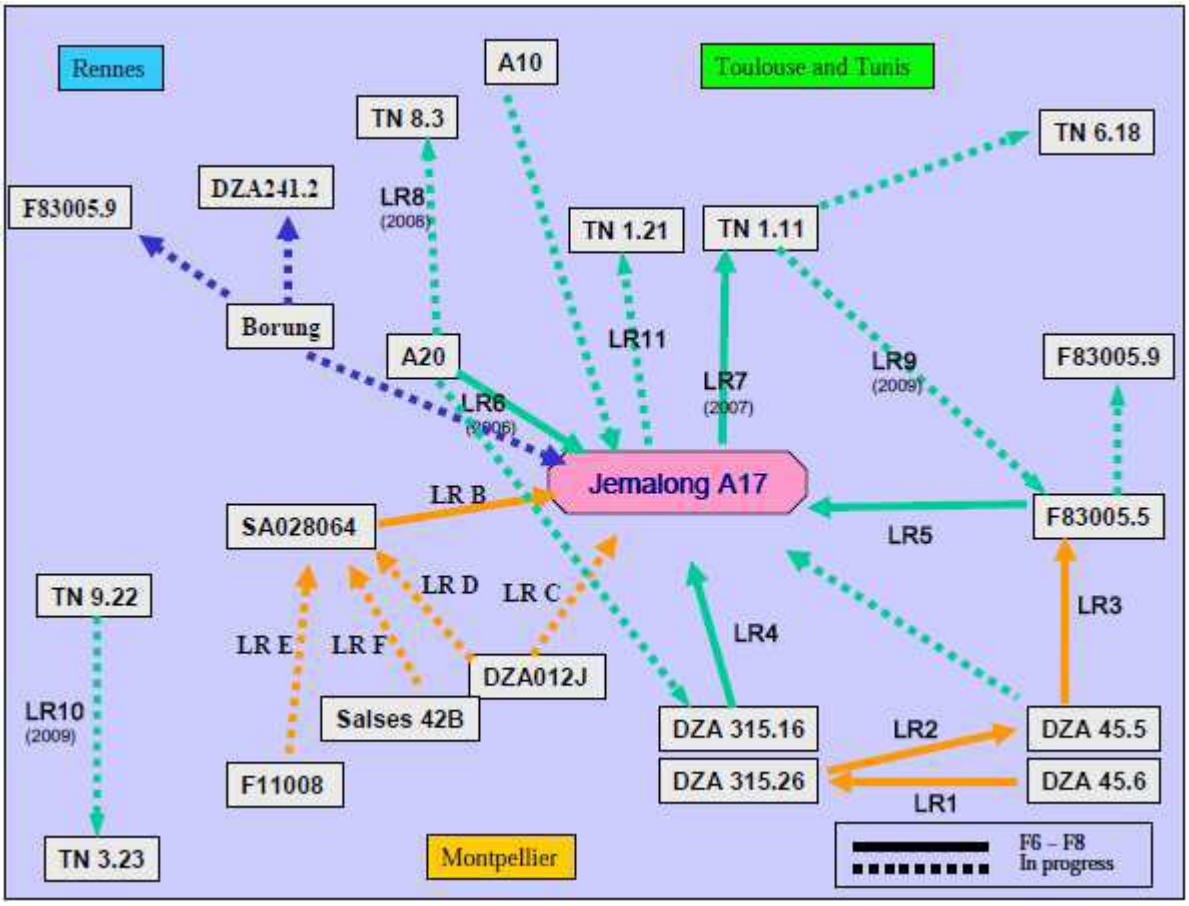


Figure II.1: Croisements établis avec les lignées de *M. truncatula* dans les laboratoires à Tunis (ME. Aouani), Toulouse (T. Huguet), Montpellier (JM. Prosperi) et Rennnes (ML. Pilet-Nayel).

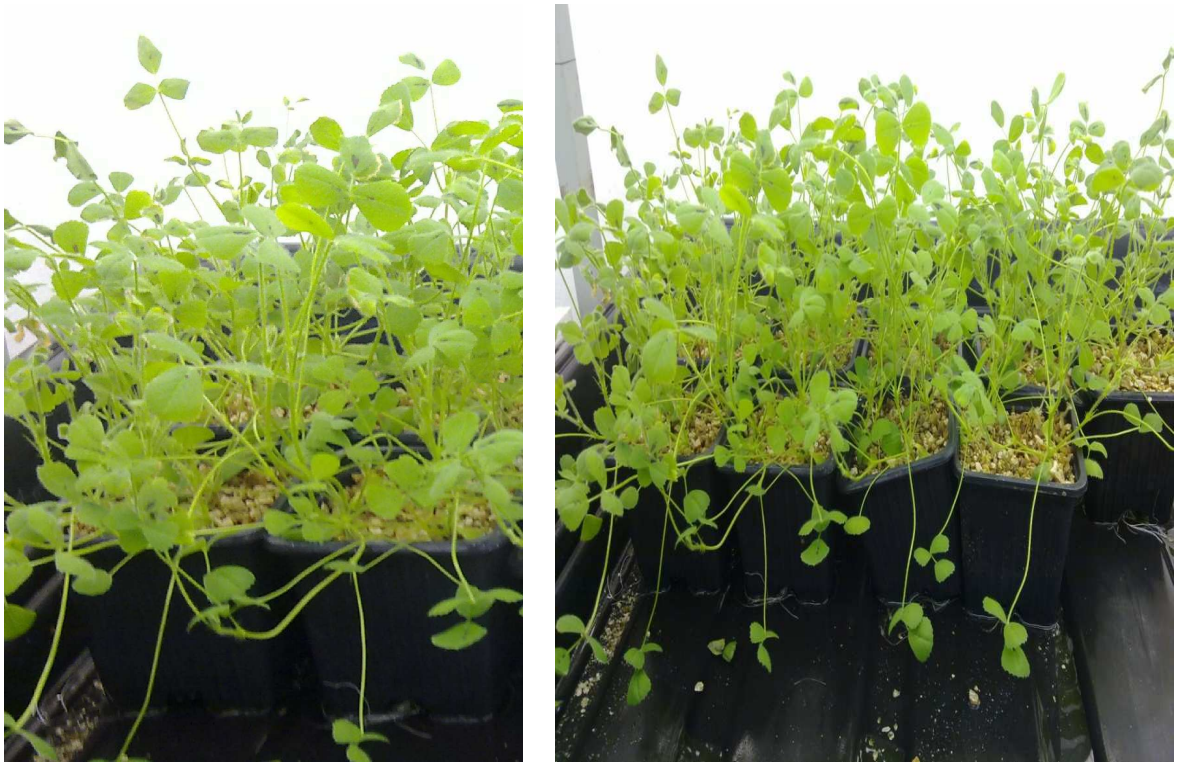


Figure II.2 : Plantes, de *Medicago truncatula*, témoins plantées dans des pots de vermiculite et arrosées par la solution nutritive, âgées de 3 semaines.

1.3 Application du stress hypoxique

La composition de la solution nutritive utilisée est basée sur les recommandations de Murashige et Skoog, 1962, pour la germination des plantes dans des conditions normales, et d'autres conditions de culture des systèmes hydroponiques. Les plantes ont été répartis au hasard dans des chambres de culture à la température de 22 ± 0,2 ° C et une humidité relative de 70% ± 2%. Le cycle circadien est composé de 16 heures de lumière et 8 de nuit. Au bout de trois semaines de développement, les plantes sont placées dans un plateau et sont mises en stress hypoxique (figure II.3) par immersion de leur partie racinaire (toute la partie racinaire jusqu'à l'hypocotyle) ; cette immersion est faite à l'aide d'une solution nutritive à 2% d'oxygène (on a fait buller d'hélium pendant 5 à 7 minutes) ; ces plantes représentent le groupe du stress hypoxique racinaire. Les plantes témoins sont arrosées par la solution nutritive, à une fois tous les deux jours et sont en même conditions de température, d'humidité, d'hygrométrie et de photopériode que les plantes sous stress hypoxique racinaire.
La concentration d'oxygène dans la solution nutritive et dans d'autres endroits biologiques a été mesurée (voire partie I.5) à l'aide senseur d'oxygène électrochimique (GMH 3630, Greisinger, Regenstauf, Allemagne).

Figure II.3 : plantes âgées de 3 semaines, en stress hypoxie avec la solution nutritive.

1.4 Préparation de la solution nutritive

Les plantes ont été irriguées par une solution nutritive, milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) ; cette solution (préparée dans l'eau) contient tous les éléments minéraux nécessaires pour le bon développement et la croissance des plantes.

Elle est composée des éléments minéraux figurants dans le tableau II.1.

		Solution nutritive			
Composition du Milieu MS de Murashige et Skoog 1962					
MACROELEMENTS X10					
	composants	Poids Moléculai	Molarité	Concentration	Concentré
					10 fois
		g/mol	Mm	g/litre	10 x / 1 litre
	KN03	*101,1*	*12*	*1,213g*	*12,13g*
	CaCL2 2H20	147	3	0,44	4,4g
	MgSO4 7H20	246,5	1,5	0,37	3,7g
	KH2PO4	136,1	1,25	0,17	1,7g
	KCl	74,55	10	0,75	7,5g
MICROELEMENTS X1000					
	composants	Poids Moléculai	Molarité	Concentration	Concentré
					1000 fois
		g/mol	µM	mg/litre	1000 x / 200 ml
	MnSO4H20	*169*	*100*	*16,9*	*3,38g*
	ZnSO4 7H20	*287,5*	*30*	*8,6*	*1,72g*
	CuSO4 5H20	249,7	0,1	0,025	0,005g
	Na2 Mo4 2H20	241,9	1	0,25	0,05g
	H3Bo3	61,8	100	6,2	1,24g
	KI (produit toxic	166	5	0,83	0,166g
	CoCL2 6h20	237,9	0,1	0,025	0,005g
FER-EDTA					
	composants	Poids Moléculai	Molarité	Concentration	Concentré
					100 x
		g/mol	Mm	mg/litre	100x/250ml
	FeS04 7H20	278	0,1	27,8	0,695g
	Na2 EDTA 2H20	372,5	0,1	37,3	0,932g
	PH ajusté à 5,8				
	Pour 2 litres de solutions à préparées				
	200 ml de macroéléments				
	20 ml fer				
	2 ml de microéléments				

Tableau II.1 : Composition de la solution nutritive utilisée pour arroser les plantes et pour appliquée le stress hypoxique (Milieu MS de Murashige et Skoog 1962).

1.5 Mesure de la concentration d'oxygène dans les différents endroits biologiques

Pour étudier les mécanismes de la réponse des plantes de « *Medicago truncatula* » au stress hypoxique racinaire, les plantes ont été cultivées sous conditions de normoxie et sous stress hypoxique racinaire.

Les mesures de la teneur en pourcentage d'oxygène dans les pots contenants les plantes en hypoxie ont montré que ces plantes sont bien dans des conditions d'hypoxie avec un pourcentage de 1,5 à 2% d'oxygène entre les racines (figure II.4, 5), cela signifie dans des pots contenants ces plantes et cette concentration persiste pendant toute la durée d'application du stress hypoxique racinaire.

Dans la solution hypoxique, en d'autre terme, à l'extérieur des pots contenant les plantes, le pourcentage d'oxygène augmente à 15% (proche de celle de l'air). Cependant, la mesure du pourcentage d'oxygène dans des pots contenant les plants témoins (figure II.4), a montré des valeurs très proches de celles l'air : 20 à 21% d'oxygène.

Figure II.4 : Mesure de la concentration d'oxygène entre les racines des plantes témoins

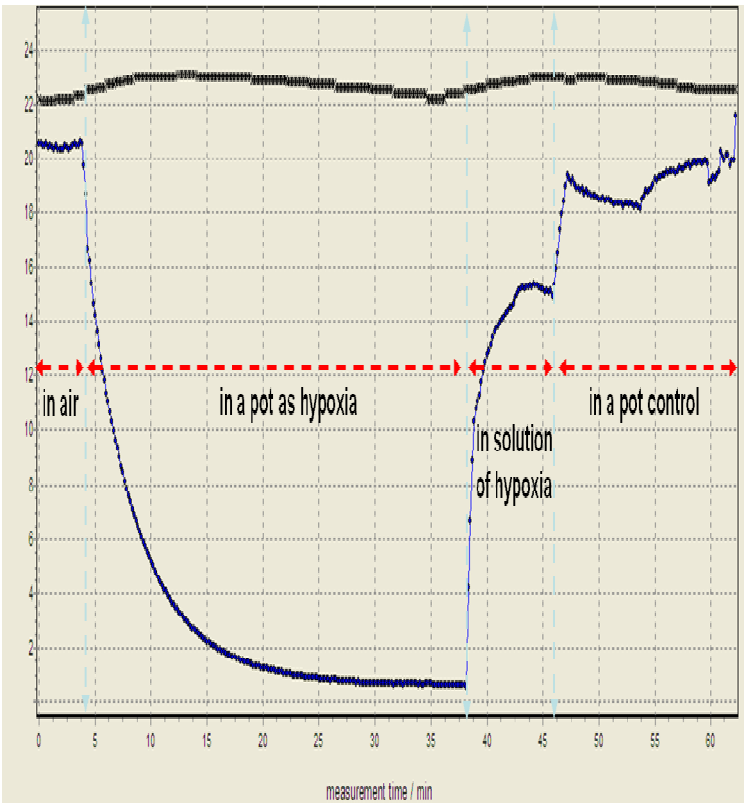


Figure II.5 : Mesure de la concentration d'oxygène, en allant de gauche à droite: dans l'air, chez les plantes en hypoxie, dans la solution hypoxique et chez les plantes témoins

1.6 Mesure de la quantité d'oxygène consommée et émise par des fragments foliaires des plantes

Des fragments foliaires, de chacun des deux groupes des plantes, sont placés dans 1 ml de tampon (4 mM phosphate et 10 mM sucrose) et le tout est ensuite transféré dans le tube de l'électrode (figure II.6). Les quantités d'oxygène, consommée et émise, sont mesurées à l'obscurité et à la lumière respectivement. A chaque mesure, trois répétitions ont été effectuées.

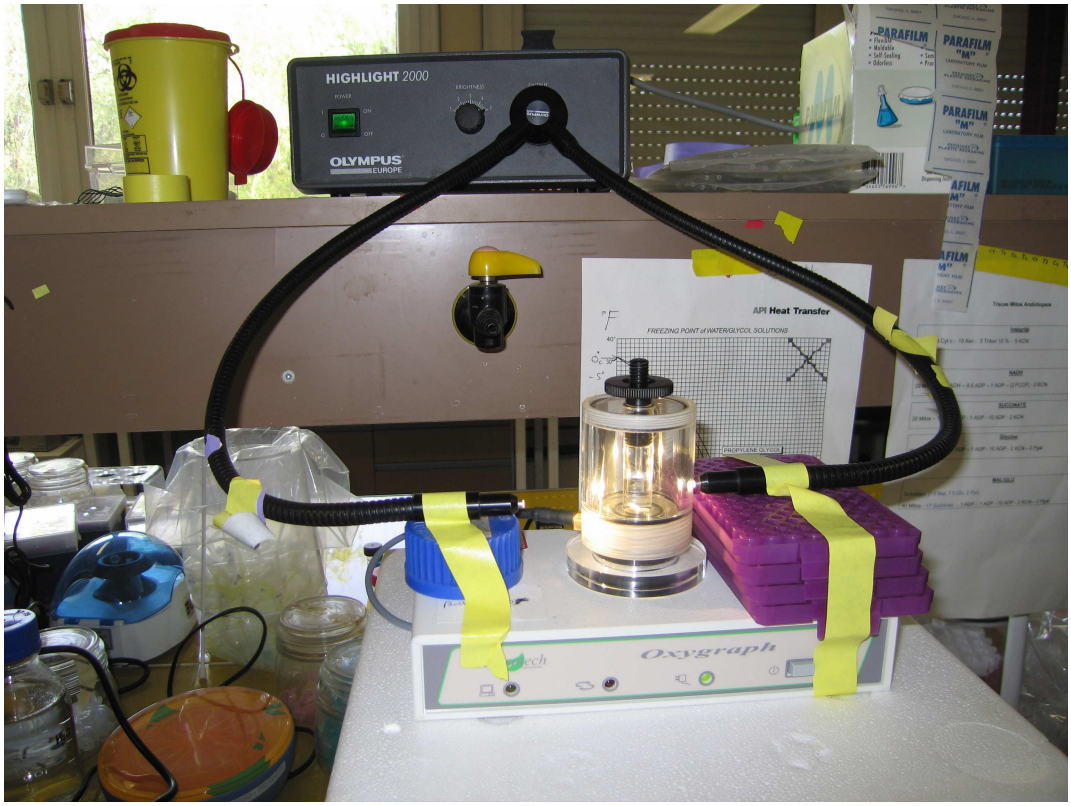


Figure II.6 : Mesure de la quantité d'oxygène consommée et émise par les fragments foliaires.

1.7 Stockage des échantillons

Dans chaque pot, quatre plantes sont cultivées ; pour chaque prélèvement, deux pots sont réservés et les échantillons, prélevées des parties aérienne et racinaire en matière fraiche, sont mis tout de suite dans l'azote liquide puis sont stockées à – 80°C pour les conserver jusqu' à leur utilisation. Une autre partie des échantillons est conservé à température ambiante, après leur lyophilisation.

2. Aspect physiologique

L'étude de l'aspect physiologique des plantes dans les différentes conditions est basée sur la comparaison de la physiologie des plantes à l'aide des mesures de la masse fraiche et de la masse sèche des parties aériennes et racinaires ; ceci est suivi des comparaisons par des photos des plantes dans les différents stades de développement.

2.1 Prélèvements des parties aériennes et racinaires

Dans chaque prélèvement, les échantillons (des parties aériennes et racinaires) destinées à mesurer les masses aériennes et racinaires des plantes, sont déposé dans des papiers d'aluminium puis les poids frais sont notés, ensuite les échantillons sont mis dans l'étuve à 95°C pendant 48 heures. Une fois que les échantillons sont secs, les poids sont pris de nouveau.

2.2 Mesure des masses sèches et fraiches

Pour mesurer la masse fraiche des échantillons, un mélange de toutes les plantes (deux pots sont réservés pour chaque temps avec quatre plantes par pots) est effectué puis la masse totale de ces plantes est notée directement par lecture sur la balance électronique.

2.3 Comparaison des images

En parallèle des prélèvements des échantillons biologiques, des photos pour chaque stade de développement des plantes sont pris à l'aide d'un appareil photo, en comparant toujours les différentes conditions considérées dans nos expériences.

3. Analyse des acides ribonucléiques

3.1 Extraction des ARN totaux au « Trizol »

Pour l'isolement d'ARN total, les échantillons congelés (parties aériennes et racinaires) à -80°C, ont été broyés dans l'azote liquide avec un mortier et un pilon. La poudre homogène est ensuite traitée par le « TRI Reagent » (Ambion, Austin, TX, USA) selon le protocole recommandé par le fabriquant.

3.2 Dosage des ARN

La concentration d´ARN a été déterminée avec le Spectrophotomètre (NanoDrop, Thermo Scientific), en mesurant l'absorbance à 260 nm pour calculer le volume de 2µg d'ARN. A cette longueur d'onde, une unité d'absorbance correspond à une concentration de 40 µg/ml

d’ARN. Il est également possible de déterminer la pureté des échantillons en mesurant le rapport d’absorbance 260 nm / 280 nm, qui doit être supérieur à 2 pour l’ARN.

3.3 Reverse Transcription (RT)

L’obtention d’ADNc s’effectue à partir des ARN totaux grâce à une transcriptase inverse (RT) ; 2 µg d'ARN total sont mélangés avec 200 U de RT-MMLV (Promega, Madison, WI, USA), 0,7 µl du « random primer » (Invitrogen, conc. 3 µg/ml, Breda, Pays-Bas) et en présence de 40 U d'inhibiteur des ribonucléases recombinants « RNasin » (Promega). Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant 1 h à 37 °C dans un volume total de 50 µl.

3.4 qRT-PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) amplifie une séquence d’ADN cible à l’aide d’un couple d’amorces, correspondant à une séquence d’oligonucléotides et d’une enzyme la Taq ADN polymérase. Cette amplification se déroule en trois phases : la dénaturation (les brins d’ADN se séparent), l’hybridation (le couple d’amorces s’accroche à l’ADN cible) et l’élongation (synthèse du brin complémentaire d’ADN). La qt-RT-PCR est réalisée sur l’appareil ABI PRISM 7000 (SDS) Sequence detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L’appareil est composé d’un thermocycleur couplé à un microspectrofluorimètre et d’un ordinateur qui permet l’acquisition des données. Chaque réaction est réalisée avec 5µl d'une dilution à 1/2 (v / v) de l'ADNc en utilisant un SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), selon les recommandations du fournisseur avec 200 nM de chaque amorce dans une réaction totale de 25 µl. Le SYBR Green est un fluorophore capable de se lier à l’ADN double brin. Il est fluorescent lorsqu’il est lié à l’ADN alors qu’il ne fluoresce pas sous forme libre. Les séquences de gènes ont été obtenues à partir de la carte génétique de *Medicago.Truncatula* (http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi; voir aussi Limami et al., 2008.). La réaction PCR est incubée pendant 2 min à 50°C et 10 min à 95°C suivie de 40 cycles de 15 s à 95°C et 1 min à 60 °C. La spécificité de la procédure d'amplification par PCR a été vérifiée avec un protocole de spectre de dissociation (65°C à 95°C) après le dernier cycle du PCR. Chaque incubation est réalisée avec trois répétitions biologiques en utilisant une réaction PCR en dupliqué pour déterminer les valeurs de Ct (Cycle threshold), correspondant au nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil de fluorescence ; le Ct est inversement proportionnel à la quantité d’ADNc matrice. La détection des produits d’amplification est réalisée par mesure de fluorescence grâce au SYBR Green. Les résultats obtenus correspondent à la fluorescence mesurée au cours des cycles de

PCR. La quantité d'ARNm est calculée en nombre de copie (41,15-Ct)/3,41). Les résultats présentés pour chaque échantillon représentent la moyenne de trois répétitions biologiques réalisées, comprenant chacune deux réactions de qRT-PCR indépendantes (répétitions techniques).

4. Etude des métabolites

4.1 Métabolome

La chromatographie en phase gazeuse (time-of-flight mass spectrometry, GC / TOFMS) a été effectuée sur une spectrométrie de masse « LECO Pegasus III » (LECO, Garges-lès Gonesse, France) avec un système « Agilent 6890N GC » et un échantillonneur automatique liquide « Agilent 7683 » (Agilent Technologies, Massy, France). La colonne a été un « RTX-5 w/integra-Guard » (30m ± 0.25mm i.d.þ10m, colonne de garde intégrée; Restek, Evry, France).

Les échantillons, de racines et des parties aériennes (20 mg de poudre de matière lyophilisée), ont été broyés dans un mortier dans l'azote liquide, puis dans 2 ml de méthanol à 80%, dans lequel le ribitol (100 mmol) a été ajouté comme étalon interne.

Les extraits ont été transférés des tubes Eppendorf de 2 ml et centrifugé à 10 000 g et 48 ° C pendant 15 min. Les surnageants ont été transférés dans des tubes frais et centrifugés à nouveau. Plusieurs aliquotes de chaque extrait (0,1 ml, 0,2 ml et 0,4 ml) étaient mis à sécher, sous vide et stockés à - 80 ° C jusqu'à l'analyse.

- **Dérivatisation des échantillons et analyse**

La méthoxyamine a été dissous dans la pyridine à 20mg/ml et 50 ml de ce mélange a été utilisé pour dissoudre l'échantillon sec (0,2 ml d'aliquote). Après une agitation vigoureuse, les échantillons ont été incubés pendant 90 min à 30,8°C avec agitation. Puis 80 ml de N-méthyle-N-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide (MSTFA) a été ajouté et le mélange a été agité au vortex et incuber pendant 30 min à 37,8°C avec agitation.

Le mélange de dérivatisation a ensuite été incubé pendant 2 h à température ambiante. Les analyses ont été effectuées en injectant 1 ml à une température de l'injecteur de 230,8°C. La séparation chromatographique a été effectuée avec de l'hélium comme gaz porteur à un débit de 1mL/min à un débit constant et en utilisant une marge de température allant de 80 à 330,8°C entre 2 et 18 minutes, suivi par 6 min à 330°8C. Le temps total d'exécution par injection était de 30min.

4.2 Extraction d'acides aminés et dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC)

- **Extraction d'acides aminés :**

Les acides aminés totaux sont extraits des échantillons (parties aériennes et racinaires) dans 1ml d'éthanol 96% (v / v), puis une agitation pendant 1 h à 4°C. Après centrifugation (9800g, 4°C, 15min), la fraction d'éthanol est récupérée et le même processus est ensuite répété avec de l'eau déminéralisée. Puis les fractions d'éthanol et de l'eau sont combinées. Après évaporation de l'extrait sous vide, les résidus organiques ont été dissous dans de l'eau déminéralisée et le même volume de chloroforme y est ajouté. Après centrifugation (12000g, 4°C, 15min), la phase aqueuse, contenant les acides aminés, est récupérée et est ensuite mise à sécher sous vide. Les acides aminés sont ensuite redissous dans l'eau déminéralisée.

- **Dosage par chromatographie liquide haute pression (HPLC)**

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants d'un mélange même très complexe. Le mélange à séparer est injecté dans la colonne (phase stationnaire), dilué dans la phase mobile et entraîné à travers la colonne. Dans des conditions de chromatographie donnée, le "temps de rétention" (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne), caractérise qualitativement une substance. Un détecteur, placé à la sortie de la colonne, permet d'identifier le temps de rétention de chaque composé, mais aussi leur concentration. La détection se présente sous forme d'un chromatogramme; l'abscisse indique le temps de rétention donc la nature du soluté alors que l'amplitude, l'aire et la ligne de base des pics permettent de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. L'HPLC (fig. II.7) est une chromatographie où les deux phases (mobile et stationnaire) sont liquides. Le principe est basé sur l'affinité des composés à analyser pour l'une ou l'autre des phases (éluants).

Les échantillons sont filtrés par une seringue en nylon avec filtre (0,45 lm), puis sont analysés par HPLC (Waters Corporation, Massachusetts, États-Unis). Les acides aminés ont été déterminés par la méthode « Waters AccQTag » qui utilise le réactif « AccQFluor « pour dériver les acides aminés. Le 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC), un composé très réactif, forme des dérivés stables avec les acides aminés primaires et secondaires, y compris la proline. Les dérivés sont séparés par phase inverse (colonne C18) HPLC et quantifiés par la détection de la fluorescence. Chaque échantillon a été analysé pour plus d'une heure. Les concentrations, de tous les acides aminés déterminés par HPLC, ont été

additionnées pour déterminer la quantité totale des acides aminés. Les mesures ont été répétées deux fois pour chaque répétition biologique.

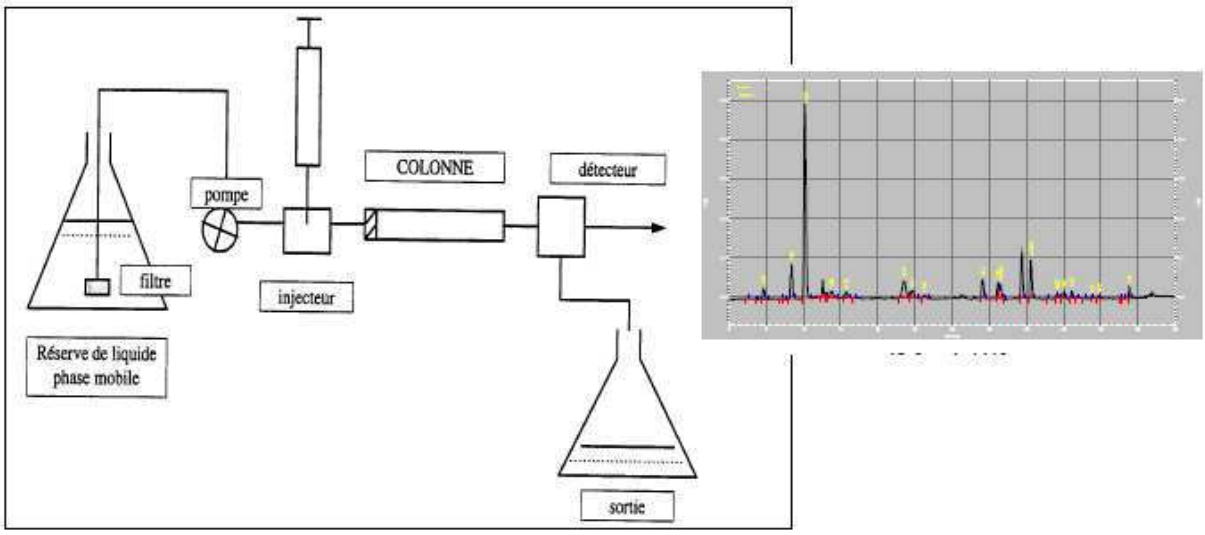


Figure II.7 : Schéma d'une chromatographie liquide haute performance. L'échantillon est introduit au niveau de l'injecteur (manuellement ou automatiquement par l'appareil), puis les composés sont séparés lors de leurs passages dans la colonne.

4.3 Dosage des chlorophylles

Les chlorophylles sont extraites à partir des matières fraiches dans du dimethylformamide. Le mélange est laissé à incuber au minimum 1 heure à 4°C, à l'abri de la lumière, et sous agitation régulière. Après 10 min de centrifugation à 15000g, 4°C, le surnageant est prélevé. L'absorbance est mesurée à 664 nm, contre du dimethylformamide. La teneur en chlorophylle totale est calculée d'après la formule : $(1000 \times DO_{664})/36 = q_{chloro}$ (en mg/mL).

4.4 Dosage du nitrate

La teneur en nitrate est dosée selon la méthode de Cataldo (1975) dont le principe repose sur la formation d'un complexe absorbant à 410 nm, en milieu alcalin, et dû à la nitratation de l'acide salycilique à PH acide. Pour cela, 10µL d'extrait hydroalcoolique sont mélangés à 40 µL d'acide sulfosalycilique à 5%. Après 20 min d'incubation à température ambiante, 950 µL de soude 2 N sont ajoutés.

Pour les témoins, l'acide sulfosalycilique est remplacé par l'acide sulfurique. Après retour à température ambiante, la différence d'absorption entre l'essai et le témoin est comparée à l'absorbance d'une gamme étalon.

5. Etude des sucres solubles

5.1 Extraction des sucres solubles

Les échantillons (parties aérienne et racinaire) sont lyophilisés puis broyés à l'aide d'un broyeur à billes ou dans un mortier + pilon. 15 à 20 mg (poids sec) sont ensuite pesés avec la balance de précision (4 chiffres après la virgule), puis 1ml de MeOH 80% et 40µl de mélizitose (standard interne) 4g/L y sont ajoutés ; après vortexage (les échantillons sont toujours conservés dans la glace), le mélange est incubé 15 minutes à 76°C dans un bain marie.

Le méthanol est évaporé sous vide dans un Speedvac AES1010 (Savant Instruments, Hyderabad, Inde). Les culots sont repris dans 1ml d'eau milliQ, vortexés et ensuite centrifuger 5 min à 14.000 rpm à 4°C. Les surnageants sont prélevés et conservés à -20°C jusqu'à analyse.

5.2 Dosages des sucres par chromatographie liquide haute pression (HPLC)

Après une dilution appropriée dans un volume final de 200 µl, les sucres ont été analysés par chromatographie de haute performance en phase liquide (HPLC) sur une colonne Carbopac PA-1 (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA) décrite par Rosnoblet et al., (2007).

Rq. : 200µl est le volume nécessaire pour une lecture sur DIONEX

6. Etude de l'activité enzymatique de la « nitrate réductase »

La nitrate réductase réduit le nitrate en nitrite qui développe une coloration rose par la réaction avec le N naphtyl-1-éthylène diamine chlorhydrate (NMED) en milieu acide. La matière fraiche est broyée dans l'azote liquide puis les protéines sont extraites. Un tampon MOSP-KOH 50 mM et PH 7,6 (Tableau II.2) est utilisé pour solubiliser la poudre obtenue. L'activité NR est alors dosée en présence d'EDTA (activité maximale potentielle in vitro) et en présence de Mg^{2+} (représente l'état de phosphorylation apparente ou l'état d'activation de l'enzyme). Pour chaque échantillon, 50 µL d'extrait sont incubés à 30°C en présence de 90µL de milieu réactionnel MOPS-KOH 50 mM PH 7,6 (EDTA et $MgCl_2$; tableau II.3). Après 20

min, la réaction est arrêtée en ajoutant 90 µL de sulfanilamide (à 10 g/L dans du HCl 3 N). Une coloration s'est développée par l'addition de 90µL de NNED (à 0,2 g/L dans l'eau).
Un blanc pour chaque échantillon est effectué par le mélange, dans l'ordre des constituants suivants : milieu réactionnel EDTA + sulfanilamide + extrait enzymatique + NNED.

Tableau II.2 : Composition du tampon d'extraction de protéines pour dosage de l'activité NR

	Concentrations finales dans la solution
NaF	5mM
Na_2MoO_4	1µM
FAD	10µM
Leupeptine	1µM
2-mercaptoéthanol	2mM
EDTA de Na	5mM
PVP	30mg/échantillon

Tableau II.3 : Composition des milieux de réaction pour dosage de l'activité NR

	Concentrations finales dans la solution
NaF	5mM
KNO_3	10mM
NADH	150µM
$MgCl_2$, $6H_2O$	10mM (uniquement pour R-Mg2+)
EDTA	5mM (uniquement pour NR-EDTA)

7. Dosage de l'azote total et analyse isotopique $^{15}N/^{14}N$

7.1 Dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total est effectué sur les échantillons prélevés durant les 5 semaines du traitement au stress hypoxique racinaire, sur la partie aérienne et racinaire des plantes témoins et sous stress hypoxique racinaire ; en fait, Après avoir séparer les parties aériennes et les racines ainsi que rassembler et homogénéisé les échantillons de chaque temps et pour chaque condition (trois répétitions biologiques pour chaque temps), les échantillons sont ensuite séchés à l'étuve à 60°C pendant 48 heures puis réduits en poudre fine grâce à un broyeur à bille. La teneur en azote total est déterminée par spectrométrie de masse (méthode expliquée ci-dessous).

7.2 Marquage ^{15}N et analyse isotopique $^{15}N/^{14}N$

Les plantes sont mises à germer (comme dans toutes les autres expériences) durant 3 semaines, puis elles sont divisées en deux groupes, un groupe témoin et un autre qui subit le stress hypoxique racinaire ; ensuite, les racines, des deux groupes, sont rincées deux fois avec une solution de $CaCl_2$ (1 mM) à 20°C puis, les plantes témoins sont arrosées avec une solution nutritive contenant 12 mM de nitrate marqué ($K^{15}NO_3$, excès isotopique = 99 %) alors que les plantes du groupe en hypoxie racinaire, sont remises, tout de suite après le rinçage au $CaCl_2$, en hypoxie racinaire avec une solution nutritive, de la même composition que celle utilisée au départ, mais qui contient 12 mM de nitrate marqué.

Après 24 heures d'exposition à la solution nutritive contenant 12 mM de nitrate marqué, les racines sont de nouveau rincées deux fois en les plongeant successivement dans deux bacs de $CaCl_2$ (1 mM) maintenus à 4°C afin de bloquer le métabolisme racinaire. Les parties aériennes et les racines sont ensuite séparées, pesées (MF), séchées à l'étuve à 60°C pendant 48 heures, pesées à nouveau (MS) puis réduites en poudre fine grâce à un broyeur à bille.

Le système utilisé pour les analyses isotopiques comprend un spectromètre de masse ("twenty-twenty", Europa Scientific) permettant de mesurer le rapport **$^{15}N/^{14}N$**, couplé à un appareil assurant la production de N2 à partir d'échantillons solides ou liquides (Roboprep CN).

Les échantillons, sous forme de poudre sèche très finement broyée, sont pesés dans des nacelles en aluminium de 4 mm de diamètre et de 6 mm de hauteur de façon à injecter 80 à 100 µg d'azote dans le spectromètre de masse. La masse précise de l'échantillon est alors notée à ± 1 µg. Les échantillons ainsi conditionnés sont disposés dans un injecteur en tête de la colonne de combustion (injecteur Robopreb CN). Leur injection dans la colonne d'oxydation est réalisée dans un flux d'hélium en légère surpression, afin d'éviter toute contamination par le gaz carbonique et l'azote moléculaire de l'air. La combustion des échantillons a lieu en tête de colonne d'oxydation (Cr_2O_3 et oxyde de cuivre à une température de 1000°C). Une élévation de température (1600°C) assurée par un apport d'oxygène conduit à une combustion totale des échantillons. A la sortie de la colonne d'oxydation, l'échantillon se trouve alors sous forme de N_2, CO_2, H_2O et d'oxydes d'azote. La réduction de ces derniers en N_2 est alors assurée par un passage sur une colonne de cuivre métallique à 600°C (colonne de réduction). Le piégeage de l'eau et du CO_2 est réalisé par passages successifs sur deux colonnes contenant respectivement du perchlorate de magnésium et du "carbosorb"(PDZ Europa). L'azote gazeux est injecté dans le spectromètre de masse où il est d'abord ionisé. Les ions moléculaires positifs alors formés sont accélérés dans une chambre électrique, puis

déviés dans un champ magnétique. Leur angle de déviation est directement affecté par le rapport de leur masse (m) à leur charge (z). Toutes les molécules de N_2 ionisées étant de même charge, leur angle de déviation est directement affecté par leur masse. Ainsi, la déviation de l'azote moléculaire de masse 28 sera plus importante que celle de l'azote de masse 29, elle-même plus importante que celle de l'azote de masse 30. Les ions sont ensuite collectés sur trois détecteurs. Les signaux qui en résultent sont ensuite amplifiés puis transmis à un système informatique. La quantification de l'azote est réalisée en faisant la somme des signaux obtenus à partir des masses 28 ($^{14}N/^{14}N$), 29 ($^{15}N/^{14}N$) et 30 ($^{15}N/^{15}N$). L'abondance isotopique en ^{15}N est alors calculée par l'intermédiaire du rapport des signaux 29/28 pour de faibles excès isotopiques et 30/29 pour des excès isotopiques élevés.

8. Système de « Split-root » :

Le principe de ce système consiste à : après leur développement durant trois semaines en normoxie en les arrosant par de la solution nutritive (12mM NO_3), les plantes sont divisées en plusieurs groupes :

- Un groupe qui subira le transfert dans des nouveaux pots (juste pour avoir le même stress que les autres groupes).
- Un groupe qui sera aussi transféré et ensuite mis en hypoxie racinaire.
- Un groupe des plantes qui sera transféré dans des nouveaux pots où les racines de chaque plante seront divisées en deux parties (dans le même pot), une partie qui restera toujours en normoxie et l'autre partie des racines (qui représente ~ 10% des racines de la plante) sera mise en hypoxie dans un tube contenant de la solution nutritive et installé dans le pot contenant l'autre partie des racines qui est en normoxie (figure II.8).

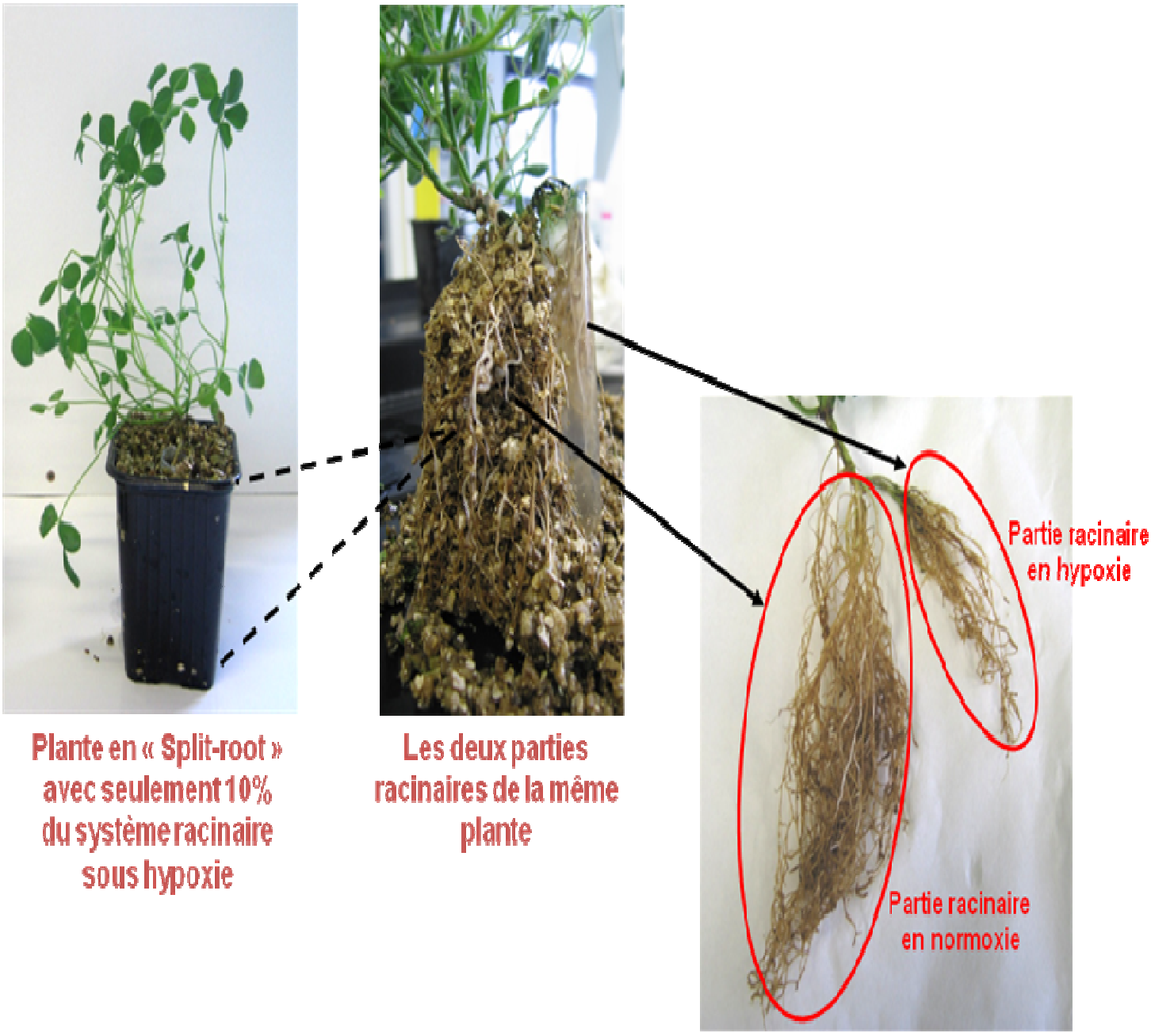


Figure II.8 : Principe de « Split root » : les racines de la même plante sont divisées en deux parties, une partie qui est en hypoxie et une autre partie qui reste toujours en normoxie.

Chapitre III :

Effets de l'hypoxie racinaire sur la croissance et le métabolisme azoté chez les plantes de « Medicago truncatula », à court et long terme

III-1 Introduction

Les plantes sont soumises à un grand nombre de facteurs environnementaux et biologiques ; ces conditions, parfois négatives, peuvent affecter le développement des plantes (Voesenek et al., 2006) ; parmi ces facteurs, on a les inondations, qui varient considérablement dans le calendrier saisonnier par la durée, la profondeur et la fréquence (Voesenek et al., 1990). En fait, les inondations influencent la présence et la répartition des espèces végétales et provoquent souvent la privation transitoire d'oxygène dans la rhizosphère et ses limites, ce qui affecte la performance des plantes. Les racines nécessitent l'apport d'oxygène suffisant pour atteindre leur fonction complète, ce qui pourrait se transformer à un stress hypoxique racinaire limitant la disponibilité d'oxygène pour les plantes (Setsuko et al., 2004) ; une fois que le sol est inondé et tous les pores aériens sont remplis, les échanges gazeux entre le sol et l'atmosphère, sont extrêmement limitées (Ponnamperuma, 1989).

Un nombre limité d'études ont étudié le phénomène d'inondation et le stress hypoxique racinaire (Pedreschi et al., 2009 ; Kawano et al., 2008 ; Qi et al., 2004) malgré l'impact potentiellement négatif sur la production agricole et les rendements. La réponse cellulaire à une diminution en oxygène est détectée par le changement du métabolisme anaérobie du pyruvate chez les espèces tolérantes et intolérantes ainsi que les réponses métaboliques au stress hypoxique ont été généralement décrits comme «active» ou «passive» en termes de consommation d'hydrates de carbone (Gibbs et al., 2000) ; lorsque ces plantes sont complètement immergées, la fermentation est stimulée, leur respiration aérobie est limitée (Mommer et al., 2005 ; Drew, 1997) et leur catabolisme des hydrates de carbone est réduit (Xu et al., 2000).

Les plantes ont développé plusieurs réponses pour atténuer les conséquences du manque d'oxygène durant le stress hypoxique racinaire ; l’ensemble de ces réponses adaptatives est la solution pour échapper à ce stress (Bailey et Voesenek, 2008). Parmi ces adaptations, différents changements anatomiques et morphologiques telles que l’augmentation de la biomasse par allongement des tiges (Voesenek et al., 1990), la formation des aérenchymes, l'allongement des pétioles, le développement des racines adventives, l'altération de la porosité racinaire et la présence des films de gaz autour des racines et des feuilles inondées, celles-ci devraient aider à fournir de l'oxygène grâce à la photosynthèse (Mommer et Visser, 2005).

Les études ultérieures ont montré que sous stress hypoxique racinaire, les réponses moléculaires et physiologiques des plantes, ont révélé ces adaptations au stress pour assurer la survie maximale pour de longues périodes (Kreuzwieser et al., 2008) chez des plantes qui ne résistent pas à l'hypoxie comme le concombre (Kang et al., 2008), le coton (Christianson et al., 2010), la tomate (Vidoz et al., 2010), le maïs (Zea mays), Arabidopsis thaliana et la

pomme de terre (Solanum tuberosum) contre d'autres plantes telles que le peuplier (Rood et al., 2009) et le riz (Lee et al., 2009) qui ont la capacité de vivre en hypoxie pendant de longues périodes et même de se développer.

Une autre classe de réponses hypoxiques comprend des voies productrices d'énergie (Geigenberger, 2003) et les phénomènes métaboliques qui sont considérablement modifiées (van Dongen et al., 2009) ; dans les tissus hypoxiques, l'activité métabolique diminue parallèlement à la diminution de la fréquence respiratoire et la concentration en oxygène est faible, la fermentation est induite (Geigenberger et al., 2000). L'hypoxie peut également conduire à la formation accrue d'espèces réactives de l'oxygène, qui causent l'oxydation des phospholipides et des protéines (Szal et al., 2004) et limite le transport de l'eau et des minéraux vers les feuilles et par conséquent la réduction de l'activité photosynthétique (Pezeshki et al., 2001) et de son potentiel qui sera toujours limité comme la disponibilité du CO_2 est atténuée aussi (Silvertown et Law, 1987 ; Drew, 1997 ; Andrews et al., 1994 ; Mommer et Visser, 2005 ; Mommer et al., 2005) et par suite, aboutit souvent à la mort des racines puis de la plante entière en quelques heures ou quelques jours (en fonction de l'espèce considérée).

Dans ce chapitre, nous étudions **l'effet du stress hypoxique racinaire sur le métabolisme azoté de la plante à court puis à long terme. Dans cette étude, on s'est focalisé sur l'éude de la teneur en nitrate et d'amonium puis l'évolution des différents métabolites et l'expression de gènes impliqués dans cette réponse ainsi qu'une étude de marquage à l'azote (^{15}N) est ensuite réalisée.**

III-2-1 Résultats : expérience, stress hypoxique racinaire à court terme

III-2-1-1 Dosage du nitrate :

Le dosage du nitrate est effectué sur la partie aérienne et la partie racinaire de chacun des deux groupes étudiés des plantes pour les temps suivants : 0, 8, 24, 36, 48 et 72 heures d'hypoxie racinaire (figure III.1).

Dans les racines, des différences significatives ont apparu dès 8 heures du stress hypoxique racinaire entre le groupe des plantes témoins et le groupe des plantes en « hypoxie racinaire » où la concentration du nitrate est moins important et cela jusqu'à 72 heures.

Dans la partie aérienne, la concentration du nitrate tend à diminuer à partir de 24 heures chez le groupe des plantes sous stress hypoxique racinaire comparé au groupe témoins et la différence devient significative en 48 et 72 heures.

III-2-1-2 Dosage d'ammonium :

L'ammonium a été dosé chez ces deux groupes de plantes (figure III.2) ; dans les racines, l'ammonium s'accumule à partir de 24 heures d'hypoxie et continue à augmenter pour atteindre un maximum après 72 heures de stress, alors que dans la partie aérienne, il n'y a pas de différences entre les deux groupes de plantes considérés pendant toute la durée d'application du stress.

III-2-1-3 Mesure de « l'activité nitrate réductase » (ANR) :

La mesure de l'activité nitrate réductase (ANR) a montré des effets significatifs dans les racines, chez le groupe en hypoxie racinaire comparé au groupe témoins ; elle augmente par réponse à l'hypoxie racinaire pour atteindre un maximum au bout de 48 heures. Dans la partie aérienne, la mesure de l'ANR ne présente pas des différences significatives entre ces deux groupes (figure III.3).

III-2-1-4 Dosage des acides aminés par HPLC :

Parmi les acides aminés essentiels, l'alanine et le GABA sont les marqueurs de l'hypoxie racinaire ; nos résultats, présentés dans la figure III.4, montrent que dans les racines, l'alanine s'accumule après 24 heures d'hypoxie et continue jusqu'à la fin de l'expérience, par contre, dans la partie aérienne, l'alanine tend à être plus élevé chez le groupe en hypoxie racinaire comparé au groupe témoins.

Concernant le GABA, une augmentation significative de sa concentration a été détectée dans les racines en fonction du temps sous hypoxie racinaire, comparé à la condition témoins (à

partir de 24 heures d'hypoxie), ainsi que dans la partie aérienne où cette différence y est moins importante avec un maximum atteint à 72 heures de stress.
D'autres acides aminés ont été indirectement influencés par le stress hypoxique racinaire comme le glutamate et l'aspartate (figure III.5) : les différences entre les deux groupes de plantes étudiés commencent à être significatives à partir de 72 heures de stress.

III-2-1-5 Etudes de l'expression des gènes :

L'expression des gènes marqueurs du stress hypoxique racinaire, l'alanine amino transférase mitochondriale (mAlaAT) et le GABA transaminase (GABA-T), a été étudiée chez les deux groupes, témoins et en hypoxie racinaire, dans les racines et dans la partie aérienne, en fonction du temps. Les graphes présentés dans la figure III.6, montrent l'augmentation de l'expression de ces deux gènes, dans les deux parties de la plante, sous stress hypoxique racinaire comparé aux plantes témoins ; pour le gène mAlaAT, cette augmentation significative atteint son maximum après 24 heures d'hypoxie racinaire (7 fois plus d'expression en hypoxie racinaire que chez les témoins) puis elle diminue en restant significative jusqu'à la fin de l'expérience. Concernant le gène GABA-T, l'augmentation de son expression est plus marquée dans les racines (5 fois plus d'expression en hypoxie racinaire que chez les témoins) que dans la partie aérienne, avec un maximum après 24 heures de stress.

III-2-1-6 Dosage des sucres :

Le dosage des sucres montre que sous stress hypoxique racinaire, le glucose et le fructose s'accumulent dans les parties aérienne et racinaire des plantes (figure III.7), comparées aux plantes témoins : 3 à 4 fois plus de glucose et 5 à 6 fois plus de fructose, avec des différences significatives.

Cette partie de la thèse a été publiée sous forme d'un article dans le journal « International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research » (voire page suivante).

IMPACT OF WATERLOGING-INDUCED HYPOXIA ON NITROGEN METABOLISM IN THE LEGUME *MEDICAGO TRUNCATULA*

Houssein Diab[1,2,*] and Caroline Cukier[1,2]

[1]University of Angers, UMR 1345 IRHS, SFR 4207 QUASAV, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers – France

[2]INRA, UMR 1345 IRHS, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers - France

*Corresponding AUTHOR: Houssein Diab, email: houssein.diab@etud.univ-angers.fr

Abstract

Flooding and waterlogging due to the induced oxygen limitation in the root zone is harmful for plant development. This study examines short term modulation of nitrogen metabolism in *Medicafo truncatula* submitted to waterlogging. The objective was to evaluate whether and how nitrogen metabolism contributes to the mitigation of damaging effects of hypoxia. The processes that were affected early after the onset of stress were nitrate reduction and amino acids synthesis. NADH-dependent nitrate reductase activity increased dramatically in the root. It is suggested that nitrate reductase contributes to cellular acclimation to hypoxia by regenerating NAD^+ from NADH. The regeneration of NAD^+ is a crucial issue in hypoxic cells because it is necessary for supporting increasing rates of glycolysis. Amino acids metabolism shifted from the ATP consuming pathway leading to asparagines, the most accumulated amino acid in *Medicago truncatula*, to pathways leading to alanine and GABA accumulation. Synthesis of alanine is not dependent on ATP and allows for storage of carbon used in glycolysis (pyruvate) in a form readily utilizable at the return to normoxic condition. GABA synthesis through the GABA shunt starts by decarboxylation of glutamate by glutamate decarboxylase (GDC) a proton consuming enzyme that helps maintaining cytosolic pH homeostasis.

Key words: Alanine, GABA, Nitrogen Metabolism, Hypoxia, Waterloging, *Medicago truncatula*

Introduction

Plants are subject to numerous environmental events that impact growth and survival either in cultivated areas or natural ecosystems. In the context of climatic change, heavy rains associated to transient flooding and waterlogging are predicted to become more frequent jeopardizing plants development and survival essentially because crops were not selected to tolerate hypoxia / anoxia stress. Consequently an increasing interest is paid by the scientific community to the adaptation of plants to low oxygen limitation at both cellular and whole plant levels.

Sensitivity or tolerance of plants to flooding and waterlogging is dependent on inducible metabolic mechanisms that allow counteracting deleterious symptoms of hypoxia at the cellular level. Under hypoxia glycolytic enzymes are more active as a consequence of the need for increased glycolysis to compensate for the lower ATP yield due to the inactivation of oxidative phosphorylation (Sato et al., 2002). The regeneration of NAD^+ is a crucial issue for the adaptation to hypoxia because in the absence of NAD^+ glycolysis ceases (Ismond et al., 2003; **Kürsteiner** et al., 2003). For this aim under hypoxia it was observed that de novo synthesis of fermentative enzymes pyruvate decarboxylase (PDC), alcohol dehydrogenase (ADH) and lactate dehydrogenase (LDH) is boosted up (Sachs et al., 1996). As a result fermentative products derived from pyruvate *i. e.* acetaldehyde, ethanol and lactate accumulate thus allowing for the regeneration of NAD^+ from NADH. The importance of ethanol fermentation in tolerance of low oxygen stress is supported by numerous studies on several species; it has been shown that null mutants affected in the expression of alcohol dehydrogenase thus deprived of ethanol fermentation exhibited reduced tolerance to oxygen deficiency compared to wild types (Harberd and Edwards, 1982; Jacobs et al., 1998; Matsumura et al., 1995). This strategy however contains its own limit, the regeneration of NAD^+ via ethanol fermentation induces the production of acetaldehyde by PDC a highly reactive molecule that induces damages by forming acetaldehyde-protein adducts and ethanol production by ADH induces a faster depletion of sugar stores and thus carbon starvation stress and ultimately cellular death (Ismond et al., 2003). The regeneration of NAD^+ via LDH worsens cytoplasm acidification due to lactic acid synthesis (Davies, 1987; Davies and Patil, 1974).

Nitrogen metabolism and its involvement in the adaptive response of plants to hypoxia received fewer attentions than carbon metabolism. Nitrate fertilization was shown to improve tolerance of plants to root hypoxia suggesting an ameliorating effect of nitrate on deleterious

effects of hypoxia (Allègre et al., 2004; Horchani et al., 2010; Morard et al., 2004). Although exposure of plants to hypoxia or anoxia increased gene expression and de novo synthesis of alanine aminotransferase (*AlaAT*) in various animal and plant species (Sachs et al., 1996) the fermentative pathway of AlaAT received less attention than PDC-LDH / ADH. Elevated levels of alanine are currently observed in waterlogged roots and expression of AlaAT encoding gene increased under hypoxia in roots of barley (*Hordeum vulgare*), corn (*Zea mays*), *Panicum miliaceum* and *Lotus japonicus* (Good and Muench 1992 and 1993; Muench and Good 1994; Ricoult et al. 2005 and 2006; Limami et al., 2008; Rocha et al., 2010).
In the present article modulation of primary nitrogen metabolism by short term waterlogging-induced hypoxia was studied in the model legume *Medicago truncatula*.

Material and Methods

Plant material and stress application

Medicago truncatula (line A17) were grown in pots on neutral substrate and watered each other day with a half Murashige and Skoog nutrient solution. Plants were randomly distributed in a culture chamber at temperature 22 ± 0.2° C and relative humidity of 70% ± 2. Circadian cycle consisted of 16 hours light and 8 hours darkness. Three weeks after germination young plants were constituted into 2 batches; one batch of control plants and one batch of treated plants were submitted to waterlogging-induced hypoxia by filling the pots with the nutrient solution for a maximum duration of 72 hours. The shoots were not flooded. The establishment of hypoxia was controlled by measuring oxygen content in the pots by an electrochemical oxygen meter (GMH 3630, Greisinger, Regenstauf, Germany). Control plants were watered by the same nutrient solution. Root and shoot were collected separately, weighed and frozen in liquid nitrogen and maintained in -80°C freezer for further analyses.

RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen, Breda, the Netherlands) according to the manufacturer's protocol. A 2 µg sample of total RNA was retro transcribed for 1h at 37°C, using 200 units of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI) and 2 mg of pd (N)6 Random Hexamer (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) in the presence of 40 units of Recombinant Rnasin Ribonuclease Inhibitor (Promega), and in a final volume of 50 µl. Genomic DNA was removed by purifying the first strands using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, German Town, MD).

Real-time polymerase chain reaction (RT–PCR) and SYBR Green detection

PCR was performed on the light cycler ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA) with the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Each reaction was performed on 5 ml of a 1: 2 (vv) dilution of the first cDNA strands, synthesized as described above with 0.3 mM of each primer in a total reaction of 20 ml. The reactions were incubated for 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 60 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The specificity of the PCR amplification procedures was checked with a heat-dissociation protocol (from 65 to 95°C) after the final cycle of the PCR. Each reaction was done in triplicate and the corresponding Ct values were determined. The amplified fragment (100 bp) was cloned into pGEM T Easy vector (Promega). The plasmids were diluted several times to generate templates ranging from 105 to 103 copies used for standard curves for the estimation of copy numbers. The results are expressed as copy number of cDNA in 5 ml of first strands.

Metabolites extraction and analysis

The total amino acids and sugars were extracted in 96% ethanol for 1 h at 4°C. After centrifugation, the ethanol fraction was removed and the same process was then repeated with de-ionized water. The ethanol and water fractions were combined and stored at –20°C. After evaporation of the extract under vacuum, organic residues were dissolved in de-ionized water and extracted with the same volume of chloroform. After centrifugation, an aqueous phase containing amino acids and sugars was vacuum dried and resuspended in de-ionized water for high performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

Amino acids were determined by the Waters (MA, USA) AccQTag method. The AccQTag method uses Waters AccQFluor Reagent (patent pending) to derivatize the amino acids. The reagent is a highly reactive compound, 6-aminoquinolyl-N-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC), which forms stable derivatives with primary and secondary amino acids. Derivatives are separated by reversed-phase (C18 column) HPLC and quantified by fluorescence detection.

Carbohydrates were determined straightforward in the extract by HPLC on a Carbopac PA-1 column (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA).

Nitrate was extracted in boiling water and determined by the colorimetric method of Cataldo (1975).

Nitrate reductase extraction and assay

Extraction was performed on frozen plant material in 1.5 mL of mM Hepes-KOH, pH 7.6, 15 mM magnesium chloride, 1 mM DTT, 10 µM FAD, 10 µM leupeptin and 0,2 mM pefabloc. The homogenate was centrifuged and the supernatant was used as the crude extract. Actual nitrate reductase activity was assayed in the following medium, 50 mM Hepes-KOH, pH 7.6, 10 mM magnesium chloride, 200 µM NADH, 5 mM potassium nitrate for 15 minutes at 27°C. The reaction was initiated by adding 500 µl of crude extract. Activity of the enzyme was estimated by determination of nitrite formed during the enzymatic reaction. Nitrite was determined by colorimetric reaction by incubation an aliquot of the reaction medium, 30 minutes in a mixture of sulfanilamide diluted HCl and N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride. Optical density was measures at 540 nm.

Results and discussion

Although carbon metabolism was not thoroughly investigated we found that glucose and fructose contents increased significantly in the shoot and the root (Figure 1) while starch and sucrose contents decreased to the point that sucrose was not detected by HPLC (data not shown) indicating probably that carbon reserves were thoroughly mobilized to support glycolysis. This result is in agreement with the commonly observed increase in the rate of glycolysis and subsequent increase in substrate level ATP production to ameliorate the hypoxia – induced energy crisis (Greenway and Gibbs, 2003).

The contribution of nitrogen metabolism to the short term – adaptive response of plants to waterlogging was more thoroughly studied. For this aim several aspects of nitrogen metabolism under hypoxic condition were analyzed in *Medicago truncatula* seedlings during the first hours of stress. In the present article we are reporting only the most significant changes *i.e.* changes pertaining to nitrate reduction and assimilation into amino acids.

Nitrate metabolism

Major changes in nitrate metabolism occurred in the root. Nitrate reductase activity (NRA) increased dramatically in hypoxic roots to represent two to three times NRA in the control while it remained fairly similar in the shoot of the control and waterlogged plants (Figure 2). This result agrees with the observation that hypoxia-induced acidification of cytosolic pH

may increase NR activity because of the low pH optimum of this enzyme (Botrel and Kaiser, 1997; Stoimenova et al., 2007). It was shown that NR was highly phosphorylated, thus inactive in aerated roots of hydroponically grown barley while it was partly dephosphorylated and active in hypoxic roots (Shi et al., 2008) (Botrel and Kaiser, 1997). Changes in NRA impacted nitrate and ammonium contents in the root. As expected the content of nitrate was lower and the content of ammonium, the product of nitrate reduction was higher in hypoxic roots than that in the control (Figure 2 and 3). It is important to note that the increase in ammonium content under hypoxia strongly suggest a discrepancy between nitrate reduction and ammonium assimilation into amino acids. Another source may contribute ammonium accumulation under hypoxia is proteolysis. Nitrate content in the shoot was lower in plants submitted to waterlogging condition (Figure 2). As NRA and ammonium content were similar in the control and stressed plants, it is suggested that the lower content of nitrate in the shoot of stressed plants is probably due to a lower transport of nitrate to the shoot. Nitrate beneficial effect is probably not exerted by nitrate per se but due to the action of nitrate reductase. The reduction of nitrate is NADH-dependent; it occurs in the cytosol, the same compartment as glycolysis and contributes to cellular acclimation to hypoxia by regenerating NAD^+ from NADH. Accordingly tolerant species to oxygen deprivation show higher nitrate reductase activity than sensitive species (Bailey-Serres and Voesenek, 2008). Tobacco as well as tomato deprived of NRA either by genetic manipulation or by inhibition by tungstate showed higher sensitivity to waterlogging than control plants (Horchani et al., 2010; Stoimenova et al., 2003). Conversely it was observed that maize seedlings supplied with nitrate during anoxia showed better tolerance to hypoxia and control of cytosolic pH (Libourel et al., 2006).

Activation of alanine and GABA shunt

It has been suggested that one of the aspects of tolerance to hypoxia is the decrease in the activity of ATP consuming processes. Ammonium assimilation via glutamine synthetase / glutamate synthase (GS / GOGAT) cycle and asparagine synthesis by asparagine sythetase are ATP consuming processes. In plants submitted to long term hypoxia stress it was observed that contents of glutamine and asparagine decrease as a consequence of ATP shortage (Bailey-Serres et al., 2012; Bailey-Serres and Voesenek, 2008). It is interesting to note that the pathway of ammonium assimilation at the whole plant level was affected very early after the onset of hypoxia stress as suggested by the accumulation of ammonium content in the root and the decrease in asparagine content in the shoot of stressed plants as early as 8 hours after the onset of stress (Figure 4). Alternatively two pathways of amino acids syntheses were

promoted *i.e.* alanine via alanine aminotransferase (AlaAT) and GABA via GABA transaminase (GABA-T) (Figure 5). The activation of these pathways occurred at the transcriptional level as shown by the activation of the expressions of genes encoding two AlaAT and GABA-T (Figure 6). This observation is supported by several studies on legume plants like *Glycine max, Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* (Oliveira et al., 2013; Ricoult et al., 2005; Ricoult et al., 2006; Rocha et al., 2010). Alanine and GABA syntheses are proposed to contribute to the mitigation of damaging effects of hypoxia. Alanine constitutes a carbon and nitrogen store readily utilizable during post-stress recovery. By accumulating alanine plants save carbon (pyruvate) that otherwise would be lost because alcohol fermentation pathway leads to ethanol a dead end product that either accumulates or leaks out of the tissue representing in both cases a net loss of carbon (Albrecht et al., 2004; Ismond et al., 2003). Furthermore through alanine shunt, synthesis of alanine generates 2-oxoglutarate which can be further metabolized to succinate, via the TCA cycle enzyme succinate CoA ligase, thus providing additional ATP per molecule of sucrose metabolized (Rocha et al., 2010). The GABA shunt starts by the decarboxylation of glutamate by glutamate decarboxylase (GDC). This first step contributes to cellular pH homeostasis as glutamate decarboxylation is a proton consuming reaction that increases pH (Drew, 1997; Greenway and Gibbs, 2003).

Conclusion

In the present study we have shown that nitrogen metabolism contributes to the adaptive response of plants to hypoxia very early after the onset stress. Nitrate reduction as well as amino acids syntheses were involved in the mitigation of hypoxia damaging consequences *i.e.* energy crisis and cytosolic pH acidification. Our results together with the increasing amounts of results published in similar areas dealing with low oxygen sensing, signaling and adaptation of plants to oxygen limitation at both cellular and whole plant levels should be taken into account in breeding programs and agronomical practices for saving plant fitness, growth and development in a world threatened by climatic change and increase of frequency of heavy rains, flooding and waterlogging (Licausi, 2013).

Acknowledgment

The author HD is indebted to French ministry of research for Ph.D fellowship. Research was funded by QUALISEM contract with ‘Region des pays de Loire’.

References

Albrecht G, Mustroph A and Theodore C (2004) Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. *Physiologia Plantarum* 120:93-104.

Allègre A, Silvestre J, Morard P, Kallerhoff J and Pinelli E (2004) Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. *J Exp Bot* 55:2625-2634.

Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voesenek LA and van Dongen JT (2012) Making sense of low oxygen sensing. *Trends Plant Sci* 17:129-138.

Bailey-Serres J and Voesenek LA (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu Rev Plant Biol* 59:313-339.

Botrel A and Kaiser WM (1997) Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. *Planta* 201:496-501.

Davies DD (1987) The role of lactate dehydrogenase isozymes in controlling the cytosolic pH of plant cells. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 16:193-207.

Davies DD and Patil KD (1974) Regulation of 'malic' enzyme of Solanum tuberosum by metabolites. *Biochem J* 137:45-53.

Drew MC (1997) OXYGEN DEFICIENCY AND ROOT METABOLISM: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.223. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:223-250.

Greenway H and Gibbs J (2003) Mecahnisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintainance and energy distribution to essential processes. *Functional Plant Biology* 30:37.

Horchani F, Aschi-Smiti S and Brouquisse R (2010) Involvement of nitrate reduction in the tolerance of tomato (Solanum lycopersicum L.) plants to prolonged root hypoxia Acta Physiol Plant. p^pp 1113-1123.

Ismond KP, Dolferus R, De Pauw M, Dennis ES and Good AG (2003) Enhanced Low Oxygen Survival in Arabidopsis through Increased Metabolic Flux in the Fermentative Pathway. *Plant Physiol* 132:1292-1302.

Libourel IG, van Bodegom PM, Fricker MD and Ratcliffe RG (2006) Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. *Plant Physiol* 142:1710-1717.

Licausi F (2013) Molecular elements of low-oxygen signaling in plants. *Physiol Plant* 148:1-8.

Morard P, Silvestre J, Lacoste L, Caumes E and Lamaze T (2004) Nitrate uptake and nitrite release by tomato roots in response to anoxia. *J Plant Physiol* 161:855-865.

Oliveira HC, Freschi L and Sodek L (2013) Nitrogen metabolism and translocation in soybean plants subjected to root oxygen deficiency. *Plant Physiol Biochem* 66:141-149.

Ricoult C, Cliquet J-B and Limami AM (2005) Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume Medicago truncatula contribute to anoxia stress tolerance. *Physiologia Plantarum* 123:30-39.

Ricoult C, Echeverria L, Cliquet J and Limami A (2006) Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume Medicago truncatula. *J Exp Bot* 57:3079-3089.

Rocha M, Licausi F, Araujo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR and van Dongen JT (2010) Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of Lotus japonicus 10.1104/pp.109.150045. *Plant Physiol* 152:1501-1513.
Shi K, Ding X-T, Don D-K, Zhou Y-H and Y JQ (2008) Putrescine enhancement of tolerance to root-zone hypoxia in Cucumis sativus: a role in increased nitrate reductase. *Functional Plant Biology* 35:48.
Stoimenova M, Hansch R, Mendel R, Gimmler H and WM K (2003) The role of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots. I. Characterization of root morphology and normoxic metabolism of wild type tobacco and a transformant lacking root nitrate reductase Plant Soil. p^pp 145-153.
Stoimenova M, Igamberdiev AU, Gupta KJ and Hill RD (2007) Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria. *Planta* 226:465-474.

Figure 1: Sugars quantified in *Medicago truncatula* seedlings by HPLC in roots and shoot. Results are the mean ± SE of three replicates.

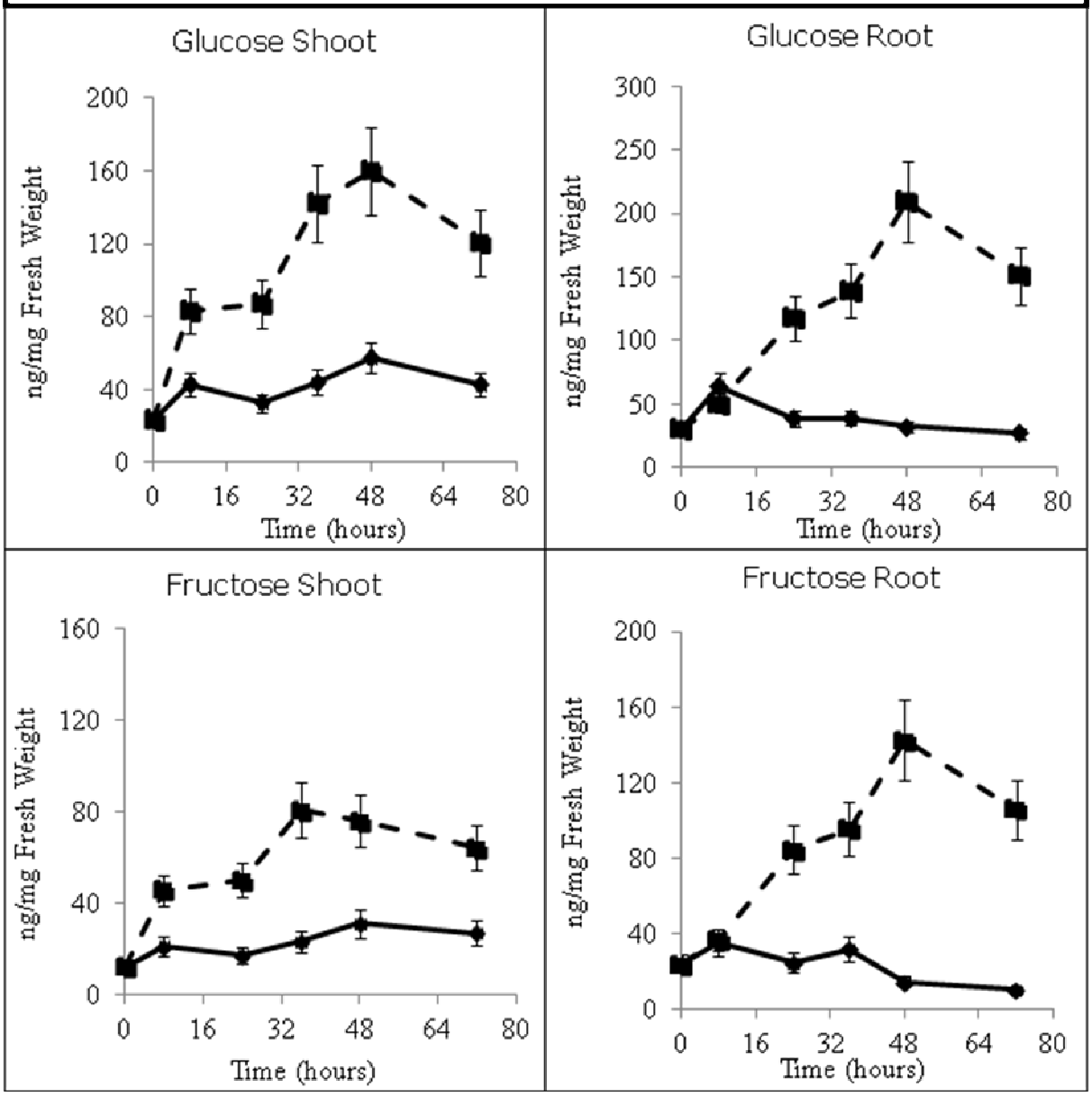


Figure 2: Nitrate reductase activity and nitrate content quantified in *Medicago truncatula* seedlings in roots and shoot. Results are the mean ± SE of three replicates.

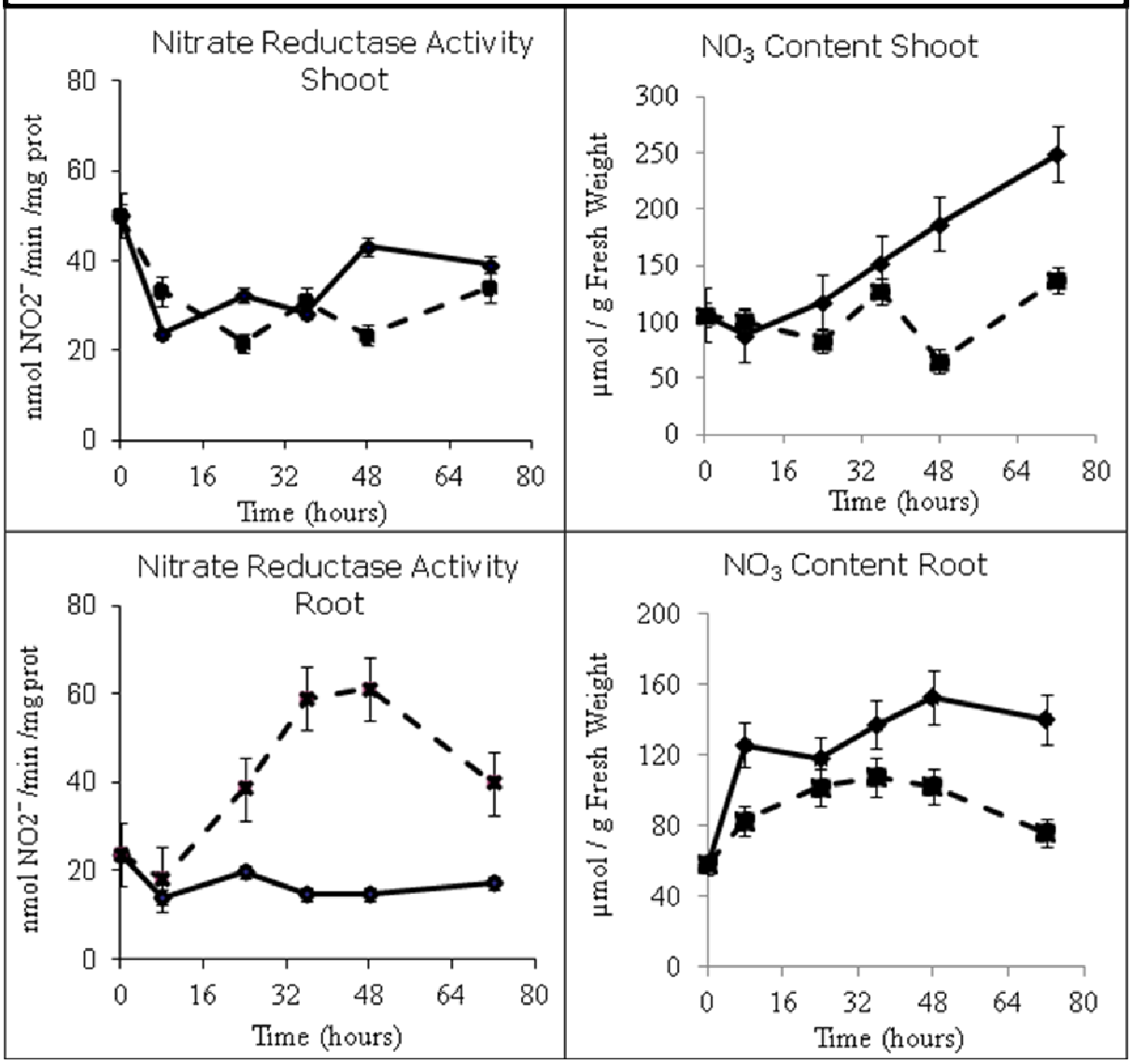


Figure 3: Ammonium content quantified in *Medicago truncatula* seedlings in roots and shoot. Results are the mean ± SE of three replicates.

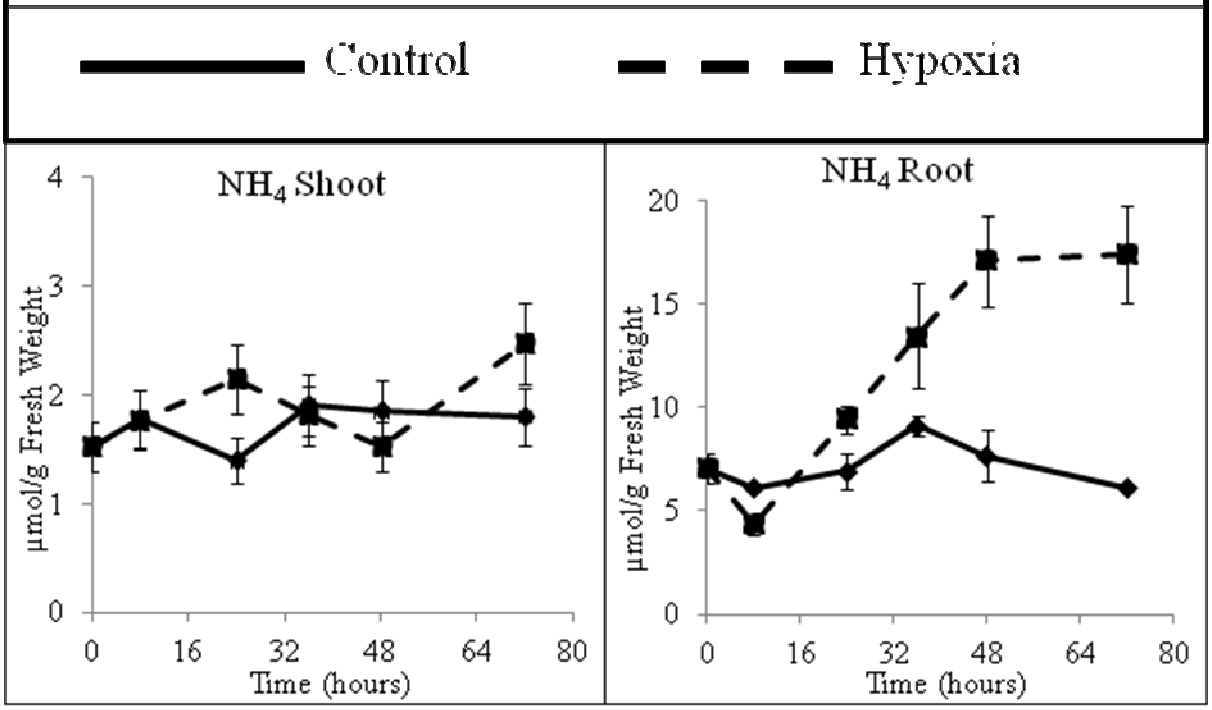


Figure 4: Amino acid, asparagine content quantified in *Medicago truncatula* seedlings in roots and shoot. Results are the mean ± SE of three replicates.

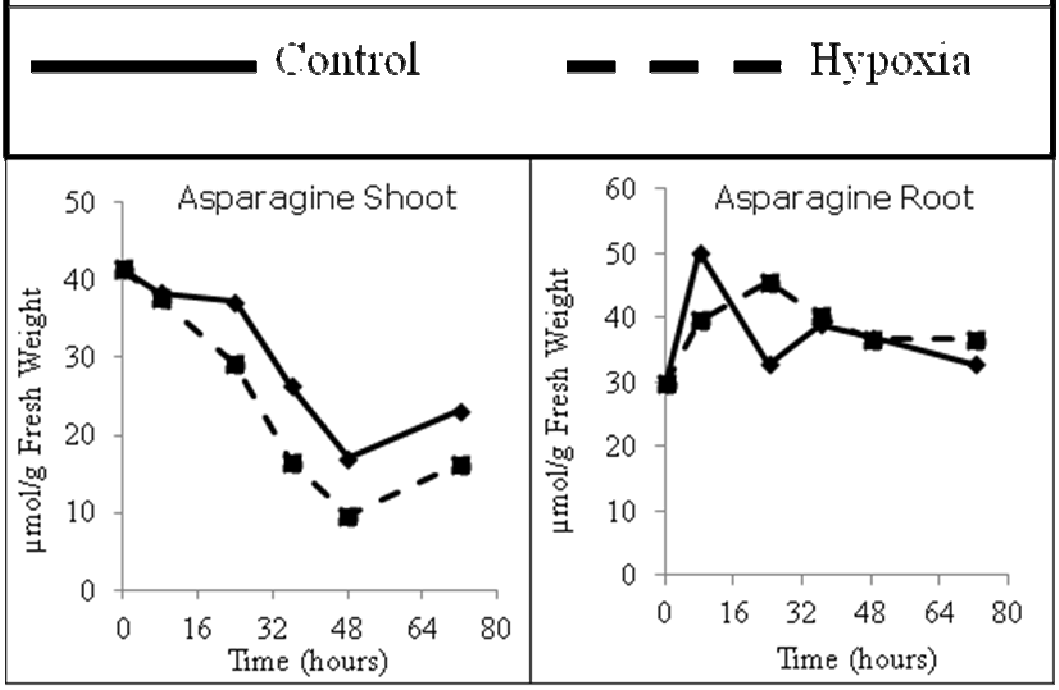


Figure 5: Amino acids, alanine and GABA content quantified in *Medicago truncatula* seedlings in roots and shoot. Results are the mean ± SE of three replicates.

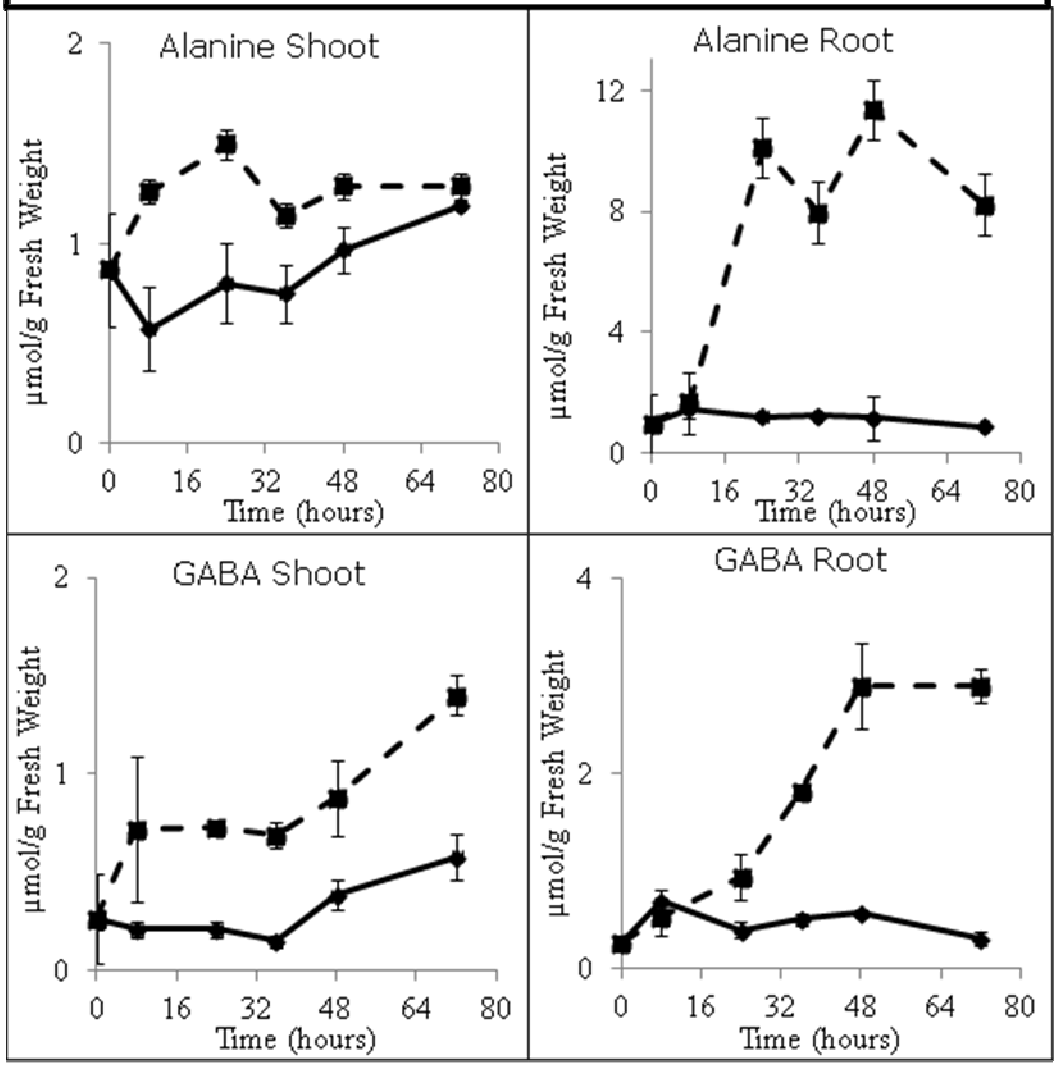
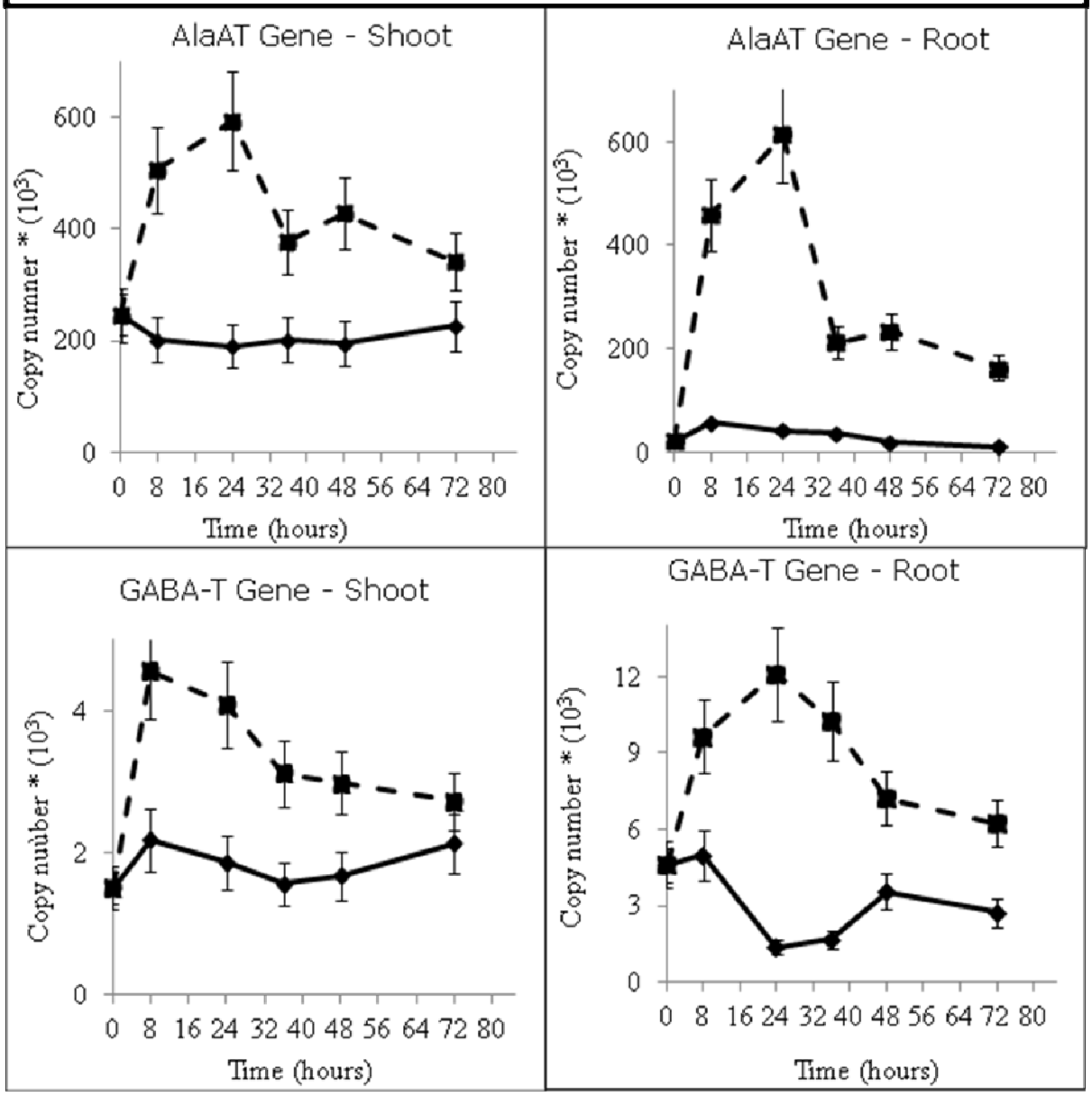


Figure 6: Expression of *Medicago truncatula AlaAT* and *GABA-T* measured by Q-RT-PCR. Results are the mean ± SE of three replicates.



III-2-2 Résultats : expérience, stress hypoxique racinaire à long terme

III-2-2-1 Effets de l'hypoxie racinaire sur la croissance des plantes

La solution nutritive (Milieu MS de Murashige et Skoog, 1962), contenant tous les éléments minéraux nécessaires (en particulier, NO_3 12mM) pour le bon développement de la plante, a été utilisée pour appliquer l'hypoxie racinaire dans notre étude. Les résultats présentés dans cette partie correspondent à des plantes âgées de trois semaines, à la fin de laquelle, les plantes sont soumises à un stress hypoxique racinaire par une solution nutritive (la même solution utilisée pour arroser les plantes témoins) durant 7 semaines ; toutes les semaines, la solution nutritive a été renouvelée, cela pour éviter l'épuisement des éléments nutritifs.

- **Effets de l'hypoxie racinaire sur la croissance de la partie aérienne :**

Les graines de « *Medicago truncatula* » sont mises à germer à l'obscurité pendant 48 heures et à température de 21°C, ensuite elles sont transférées dans des pots en les arrosant (une fois tous les deux jours) avec la solution nutritive dite standard (12mM NO_3^-).

Les figures III.8 montrent l'effet de l'hypoxie racinaire sur la croissance de plantes en matière fraiche (MF) et en matière sèche (MS) de la partie aérienne des plantes ; on remarque que les deux groupes, témoins et sous hypoxie racinaire, se développent d'une façon similaire avec une légère différence durant la première semaine ensuite les plantes, sous hypoxie racinaire, se développent plus rapidement que les plantes témoins (la 2ème vers la 4ème semaine) où elles ont plus de biomasse aérienne que les plantes témoins mais elles atteignent un maximum au bout de 3-4 semaines d'hypoxie, à partir de laquelle elles commencent à perdre leur biomasse aérienne (figures III.9 et III.10).

- **Effets de l'hypoxie racinaire sur la croissance de la partie racinaire :**

Les graphes de la figure III.8 montrent que les plantes, mises en hypoxie racinaire ont la tendance à avoir plus de biomasse racinaire que les plantes témoins jusqu'à environ la 4ème semaine, à partir de laquelle leur biomasse racinaire commence à diminuer, comparées aux plantes témoins qui continuent à se développer normalement jusqu'à la 7ème semaine de développement. Les biomasses sont suivies, en matière fraiche et en matière sèche (figure III.8) à partir du temps T= 0 (temps du début de l'application du stress hypoxique et qui correspond à l'âge de 3 semaines de développement des plantes en normoxie) jusqu'à T= 7 ou la 7ème semaine du stress hypoxique racinaire.

- **Effet de l'hypoxie racinaire sur la croissance des plantes : un effet propre à l'hypoxie racinaire ?**

Nous avons montré que les plantes, sous hypoxie racinaire, ont plus de biomasse que les plantes témoins, cela en utilisant une solution nutritive riche en éléments minéraux (12mM de nitrate) ; dans ce contexte, une question se pose : **« L'effet positif de la submersion des racines sur la croissance de la biomasse foliaire est- il propre au stress hypoxique ou a – t – il un lien avec la composition de la solution nutritive ? »** et en d'autre terme : « Cet effet serait – il encore visible en utilisant une solution nutritive à faible richesse en éléments minéraux (spécifiquement en utilisant une faible concentration en nitrate (NO_3^-) de 2 mM et de l'eau déminéralisée » ?

Pour répondre à cette question, une solution nutritive à **faible teneur en nitrate** (**2mM) et de l'eau déminéralisée** sont utilisées chez deux séries de plantes.

Les graphes de la figure III.11 et III.12 montrent que, sous hypoxie racinaire, les plantes ont plus de biomasse (partie aérienne et racinaire) que les plantes témoins à 2 mM de nitrate ou avec de l'eau déminéralisée ; cependant, à partir de la $5^{ème}$ semaine, l'effet du stress apparait et la croissance des plantes cesse et la sénescence s'installe.

Donc, l'effet positif de l'hypoxie racinaire sur la production de biomasse foliaire et racinaire est propre au traitement, en d'autre terme, cet effet est toujours visible avec une solution nutritive à faible richesse en éléments minéraux (figures III.13 et III.14).

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de poursuivre nos expériences avec une solution nutritive à 12 mM de NO_3^- en appliquant le stress hypoxique racinaire pendant 5 semaines.

III-2-2-2 Evaluation de la respiration et la photosynthèse chez la plante sous hypoxie racinaire

L'évaluation de la respiration et la photosynthèse est réalisée sur des disques foliaires par la mesure de la quantité d'oxygène émise à la lumière et celle consommée à l'obscurité.

Les résultats (Figures III.15 et III.16) montrent que la quantité d'oxygène produite à la lumière ou bien la valeur de la photosynthèse nette et la quantité d'oxygène consommée à l'obscurité donc la respiration, sont plus importantes sous stress hypoxique racinaire par rapport au témoin.

Ces résultats suggèrent une activation de la respiration et la photosynthèse chez les plantes sous hypoxie racinaire.

III-2-2-3 Teneur en nitrate

Les résultats obtenus dans les différentes parties des plantes sous stress hypoxique racinaire et témoins sont présentés dans la figure III.17. on remarque que dans la partie aérienne et dans les racines, la concentration de nitrate diminue en fonction du temps par réponse à l'hypoxie racinaire comparée à celle des plantes témoins ; dans la partie aérienne, la valeur la plus faible a été observée juste après la première semaine du traitement et reste toujours inférieure à celle du control jusqu'à la fin de l'expérience, mais dans les racines, la plus basse valeur de nitrate a été observée en troisième semaine après le traitement et reste toujours inférieure à celle du control jusqu'à la cinquième semaine d'hypoxie racinaire.

Donc, d'une façon globale, la concentration du nitrate diminue dans la plante sous hypoxie racinaire.

III-2-2-4 Teneur en azote total et mesure de l'absorption du NO_3^- par marquage ^{15}N

Après un développement de 3 semaines, trois plantes témoins, pour chaque temps, sont arrosés par la solution nutritive, contenant 12mM de $^{15}NO_3^-$, et trois autres plantes du groupe sous hypoxie racinaire, sont transférées dans des récipients contenants aussi la solution nutritive (à 12mM de $^{15}NO_3^-$) pour les mettre en hypoxie racinaire ; le marquage est effectué durant 24 heures, ensuite les échantillons sont prélevés et cela pendant toutes les semaines durant 5 semaines d'hypoxie racinaire.

Nos résultats montrent que :

- La teneur en azote total dans les racines des plantes, en hypoxie racinaire, est plus élevée que celle des plantes témoins alors qu'il y a pas de différence entre ces deux groupes dans la partie aérienne (figures III.18 et III.19) ; Nos résultats montrent aussi que, dans les deux parties de la plante, la quantité en azote total augmente avec le temps sous hypoxie racinaire comparée aux plantes témoins pour atteindre un maximum durant la 3ème semaine (2 fois plus d'azote en hypoxie racinaire que chez les témoins), à partir de laquelle elle tente à avoir des valeurs plus faibles que chez les témoins en 5ème semaine.

- En deuxième temps, l'analyse isotopique nous a permis de suivre l'évolution de la RSA (Relative Specific Allocation) des racines et de la partie aérienne des plantes sous hypoxie racinaire et témoins en fonction du temps ; en fait, le RSA représente l'allocation spécifique relative de l'azote et qui est donné par la formule suivante :

RSA= (A%t – A%c)/ (A%l – A%n)

Où - A%t : Abondance isotopique de la plante traitée

- A%c : Abondance isotopique de le plante témoins
- A%l : Abondance isotopique de l'atmosphère enrichie (solution nutritive contenant le ^{15}N)
- A%n : Abondance isotopique de l'atmosphère naturelle (solution nutritive ne contenant pas le ^{15}N)

On remarque (figure III.20) que le RSA dans les racines et la partie aérienne des plantes est plus important sous hypoxie racinaire que chez les témoins à partir de la première semaine du stress où la différence est plus marquée (ainsi que durant la 2ème et la 3ème semaine d'hypoxie racinaire) ; cette différence diminue avec le temps jusqu'à la 5ème semaine où il n'y a pas de différence entre ces deux groupes.

Ensuite, la vitesse d'incorporation de l'azote dans la plante a été calculé à partir du RSA dans les racines et la partie aérienne ; le graphe de la figure III.21 montre que la vitesse d'incorporation de l'azote sous stress hypoxique racinaire est plus élevée qu'en condition témoin dès la première semaine d'hypoxie racinaire et elle diminue avec le temps jusqu'à la 5ème semaine de stress.

III-2-2-5 Etudes de l'expression des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie racinaire

L'expression des gènes : mito-AlaAT (alanine aminotransférase mitochondriale), GABA-T (acide gamma-aminobutyrate transaminase), NADH GOGAT (nicotinamide adénine dinucléotide, glutamine-2-oxoglutarate aminotransférase), GDH (glutamate déshydrogénase), GS (glutamine synthétase), IDH (isocitrate déshydrogénase mitochondrial), ICDH (isocitrate déshydrogénase cytosolique), NR (nitrate réductase) et P5CS (synthétase 1-pyrroline-5-carboxylate) a été étudié en temps réel par PCR quantitative dans la partie aérienne et racinaire des plantes de *« Medicago truncatula »* soumises à un stress hypoxique racinaire et témoins.

III-2-2-5-1 Expression des gènes dans les racines

La figure III.22 présente l'expression des différents gènes étudiés sous stress hypoxique racinaire :

L’expression des gènes, mAlaAT et GABA-T (marqueurs du stress hypoxique racinaire), commence à augmenter dans les racines des plantes de *« Medicago truncatula »* après une semaine du stress hypoxique racinaire ; cette expression d’AlaAT et du GABA-T a augmenté d’une façon significative par rapport au témoin (normoxie), ce qui indique que, dans ces conditions expérimentales, les plantes passent d’un métabolisme normoxique à un métabolisme hypoxique.

Concernant d'autres gènes qui sont étudiés, nous constatons que l’expression du GS et du NADH GOGAT est plus élevée dans les racines des plantes sous stress hypoxique racinaire par rapport aux plantes témoins, le même cas pour la GDH : ils sont surexprimées sous le stress hypoxique après une semaine du traitement et continuent jusqu’à la 5ème semaine. Contrairement à l'expression d'autres gènes, l'expression du gène P5CS est inhibée dans les racines sous stress hypoxique, elle diminue en fonction du temps pour atteindre un minimum à la 5ème semaine. L’expression du gène NR1 dans les racines a augmenté de façon significative sous le stress hypoxique par rapport au groupe témoin, dés la première semaine d’hypoxie racinaire puis elle diminue à partir de la troisième semaine pour atteindre un minimum en 5ème semaine tandis que celle du gène NR2 montre qu’il n’y a pas de différences significatives entre ces deux groupes.

Il n'y a pas de différence dans l'expression des gènes ICDH et IDH dans les deux conditions, témoins et stress hypoxique racinaire, mais ils présentent beaucoup de fluctuations en fonction du temps de traitement.

III-2-2-5-2 Expression des gènes dans les feuilles

L'expression des gènes codants pour des marqueurs du stress hypoxique, mAlaAT et GABA-T, est légèrement stimulée dans la partie aérienne des plantes sous stress hypoxique racinaire (figure III.22) ; leur expression commence à augmenter à partir de la première semaine du traitement et elle continue jusqu'à la 5ème semaine.

NR2 a été inhibée dans la partie aérienne des plantes sous stress hypoxique à partir de la première semaine et elle atteint un minimum au cours de la troisième et la cinquième semaine du traitement. L’expression du gène P5CS diminue chez le groupe en hypoxie racinaire comparé au groupe témoin et cela pendant toute la durée du traitement.

Cependant, il n’y a pas de différence significative dans l’expression du gène GS1a au cours de la première et la deuxième semaine d’hypoxie racinaire, à partir de laquelle, elle commence à diminuer pour atteindre un minimum en 3ème semaine.

Par ailleurs, l'expression des gènes suivants : NADH GOGAT, GDH, NR1, ICDH et IDH montre qu'il n'y a pas de différences entre ces deux groupes étudiés.
Donc, en général, des modifications de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme azoté et carboné des plantes, ont été montrées dans les racines.

III-2-2-6 Analyse métabolomique pour l'étude de l'effet du stress hypoxique racinaire sur le métabolisme azoté chez les plantes de *« Medicago truncatula »*

Les résultats d'analyse métabolomique sont présentés sous forme de ratio de valeurs obtenues en condition d'hypoxie racinaire par les valeurs en condition de normoxie.
Les graphes présentés dans les figures III.23 et III.24 montrent l'évolution de ces ratios pour les différents acides aminés considérés :
On remarque une augmentation des ratios du GABA, α-Ala et β-Ala (valeur en hypoxie racinaire / valeur en normoxie) avec le temps d'application du stress hypoxique racinaire ; dans la partie racinaire, on remarque que le GABA et les deux formes d'alanine, augmentent avec le temps avec un maximum atteint en 3ème semaine d'hypoxie racinaire et dans la partie aérienne, le GABA et l'α-Ala augmentent avec le temps mais d'une façon moins marquante que dans les racines et pas des différences pour le β-Ala chez les deux groupes étudiés.
Concernant les autres acides aminés, citons la glycine, la sérine, la tyrosine et la glutamine, ils sont accumulés dans les deux parties de la plante sous hypoxie racinaire en fonction du temps ; cette augmentation atteint le maximum durant la 3ème semaine d'hypoxie dans les racines et durant la 2ème semaine dans la partie aérienne.

Cette deuxième partie fait l'object d'un article en cours de rédaction.

III-3 Discussion

III-3-1 Effet de l'hypoxie racinaire à court terme

Dans la première partie de ce chapitre, on a montré la réponse de la plante au stress hypoxique racinaire à court terme, dans les racines et la partie aérienne.

Nos résultats ont montré la diminution de la concentration du nitrate parallèlement à l'accumulation d'ammonium dans les racines et dans la partie aérienne et d'autre part, l'activité de l'enzyme « nitrate réductase » est favorisée par le stress hypoxique racinaire (Morard at al., 2004) ; L'étude du rôle de la réduction du nitrate pour produire l'ammonium et l'oxyde nitrique (NO) et son oxydation ultérieure par l'oxyhémoglobine comme un mécanisme efficace (Allèrge et al.,2004) pour maintenir l'énergie nécessaire des cellules végétales au cours de l'hypoxie, a montré que la réduction du nitrate dans des conditions hypoxiques peut être considéré comme une voie respiratoire alternative, avec le nitrate comme accepteur d'électrons intermédiaires, contribuant à l'oxydation du NADH (Igamberdiev et Hill, 2009).

Nous avons vu que sous hypoxie racinaire, les métabolites, marqueurs de l'hypoxie racinaire chez les plantes (Biais et al., 2010 ; Vanlerberghe et al., 1991 ; Rocha et al., 2010a ; Narsai et al., 2011), l'alanine et le GABA, s'accumulent avec le temps. Dans ce contexte, l'étude de l'expression de gènes, codants pour la synthèse des enzymes jouant un rôle important dans la production de ces acides aminés, a montré la surexpression de ces deux gènes par réponse à l'hypoxie racinaire. Cependant, la production et l'accumulation de ces deux acides aminés est en effet une autre réponse commune des plantes soumises à un stress hypoxique (Reggiani et al., 2000; Ricard et al., 1994; Streeter et Thompson, 1972). Plusieurs études suggèrent que le « shunt GABA » est, en partie, responsable de l'accumulation d'alanine sous hypoxie racinaire (Miyashita et al., 2008 ; Lee et al., 2009) et que l'accumulation de l'alanine est considérée comme un mécanisme de défense de la plante pour résister contre l'hypoxie racinaire ; d'autre part, l'importance du métabolisme de l'alanine est très bien connue vue sa capacité à réguler le niveau de pyruvate (Rocha et al., 2010b).

En deuxième temps, le dosage des sucres, dans les racines et la partie aérienne chez les deux groupes, témoins et en hypoxie racinaire, a montré une forte accumulation de sucres, en hypoxie racinaire comparé au groupe témoins, avec des différences significatives ; en fait, les plantes sont en mesure d'utiliser des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres (subbaiah et al., 1994) et cela pour avoir la capacité de maintenir la fermentation active pour la production de l'ATP en alimentant la glycolyse ainsi que cette forte accumulation de sucres dans la plante stressée pourrait être une manière de défense et ensuite d'adaptation aux

contraintes qu'elle subit et peut être partiellement utilisée pour l'épaississement de la paroi secondaire (Albrecht et Mustroph, 2003).

Chez les plantes soumises à un stress hypoxique racinaire, la plupart des sucres sont accumulés, la glycolyse est stimulée et l'énergie est canalisée vers le métabolisme primaire (Li et al., 2011). La capacité de maintenir un métabolisme actif de fermentation, pour la production d'ATP en alimentant la voie glycolytique avec les glucides fermentescibles, est plus grande chez les plantes sous stress hypoxique racinaire par rapport aux plantes témoins par stimulation de l'ensemble des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres solubles (Kato-Noguchi, 2004 ; Andrews et al., 1994 ; Huang et al., 2003). Ces résultats suggèrent que les plantes résistent à l'hypoxie racinaire en activant la voie de synthèse des sucres, qui représente la principale source d'énergie, nécessaire aux besoins de croissance de la plante.

III-3-2 Effet de l'hypoxie racinaire à long terme

Suite à notre étude à court terme, nous avons ensuite montré la réponse (adaptative) de la plante au stress hypoxique racinaire à long terme, qui s'est traduite par des modifications physiologiques et moléculaires.

Les changements de l'activité photosynthétique sont associés à des changements dans la biomasse des plantes sous stress hypoxique (Van Dongen et al., 2010) ; nos résultats montrent que l'évaluation de la respiration et la photosynthèse a soutenu l'augmentation de biomasse observée chez les plantes, par réponse à l'hypoxie racinaire, du fait que chez ces plantes, la respiration et la photosynthèse sont plus importantes comparées aux plantes témoins, avec une teneur plus élevée en azote dans les racines, associée à une forte vitesse d'incorporation d'azote sous hypoxie racinaire.

D'autres part, des études ultérieures ont montré que le stress hypoxique racinaire induit une diminution de la photosynthèse en réduisant la teneur en pigment photosynthétique, mais l'application du GABA améliore d'une manière significative les caractéristiques photosynthétiques dans des conditions de stress hypoxique et en état normal (Xia et al., 2011) ainsi que le GABA peut augmenter les activités des enzymes antioxydants, et joue un rôle important dans l'amélioration de la résistance au stress hypoxique racinaire (Gao et Guo, 2004). Mais aussi l'alanine, car son accumulation est en faveur de l'amélioration de la tolérance des plantes à l'hypoxie racinaire (Kang et al., 2008). D'autres métabolites pourraient améliorer la résistance à l'hypoxie racinaire des plantes en augmentant H^+-ATPase de la membrane plasmique dans les racines (Wang et al., 2005 ; Lu et al., 2012).

Ensuite, l'étude de l'expression des gènes marqueurs du stress hypoxique racinaire, a montré une surexpression de ces gènes dans les racines et dans la partie aérienne des plantes par réponse à ce stress (Ricoult el al., 2006 ; Miyashita et al., 2007) et précisément, les deux gènes : m-AlaAT et GABA-T. Ces modifications génétiques des plantes sont reliées à des changements dans leur croissance afin de mieux résister au stress hypoxique racinaire appliqué (Fukao et Bailey-Serres, 2006) ; mais aussi, la diminution d'autres gènes tels que le P5CS, qui est inhibé sous stress hypoxique. Suite aux modifications génétiques, les différents métabolites impliquées dans le métabolisme azoté sont affectés plus ou moins par réponse à l'hypoxie racinaire ; ces résultats sont compatibles avec de nombreuses autres études existantes dans ce domaine et qui ont montré que les plantes réagissent en réponse à des faibles teneurs en oxygène, par activation de leur voie métabolique azotée (Streeter et Thompson, 1972 ; Su et al., 2011), y compris une augmentation de la teneur totale en acides aminés (Puiatti et Sodek 1999 ; Thomas et Sodek 2006 ; van Dongen et al. 2009 ; Rocha et al., 2010a).

Donc l'ensemble de ces mécanismes, comme la stimulation de l'activité photosynthétique, la surexpression des gènes impliqués dans le métabolisme azoté, l'accumulation de métabolites ainsi que d'autres mécanismes biologiques pourraient expliquer la réponse des plantes au stress hypoxique racinaire et leur adaptation.

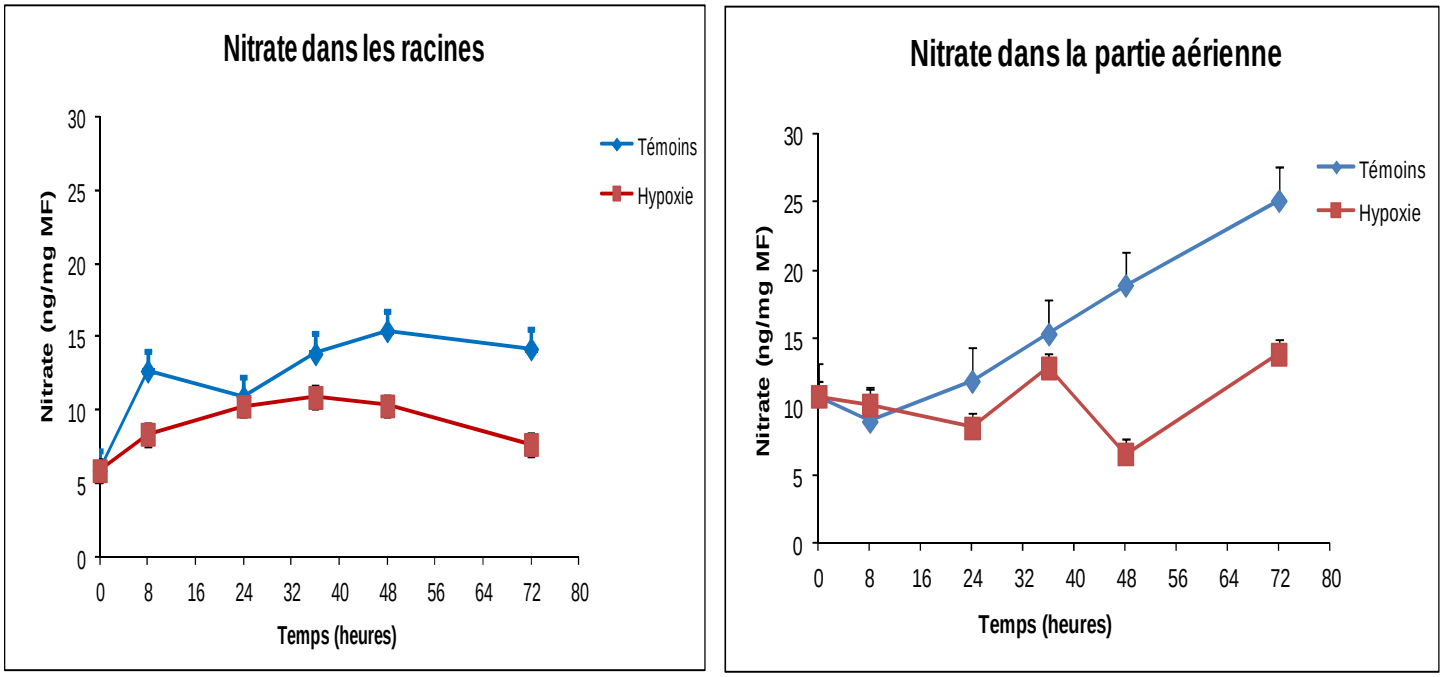


Figure III.1 : Teneur du nitrate dans la partie aérienne et dans les racines en fonction du temps de traitement ; les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard (nb de répétition = 3).

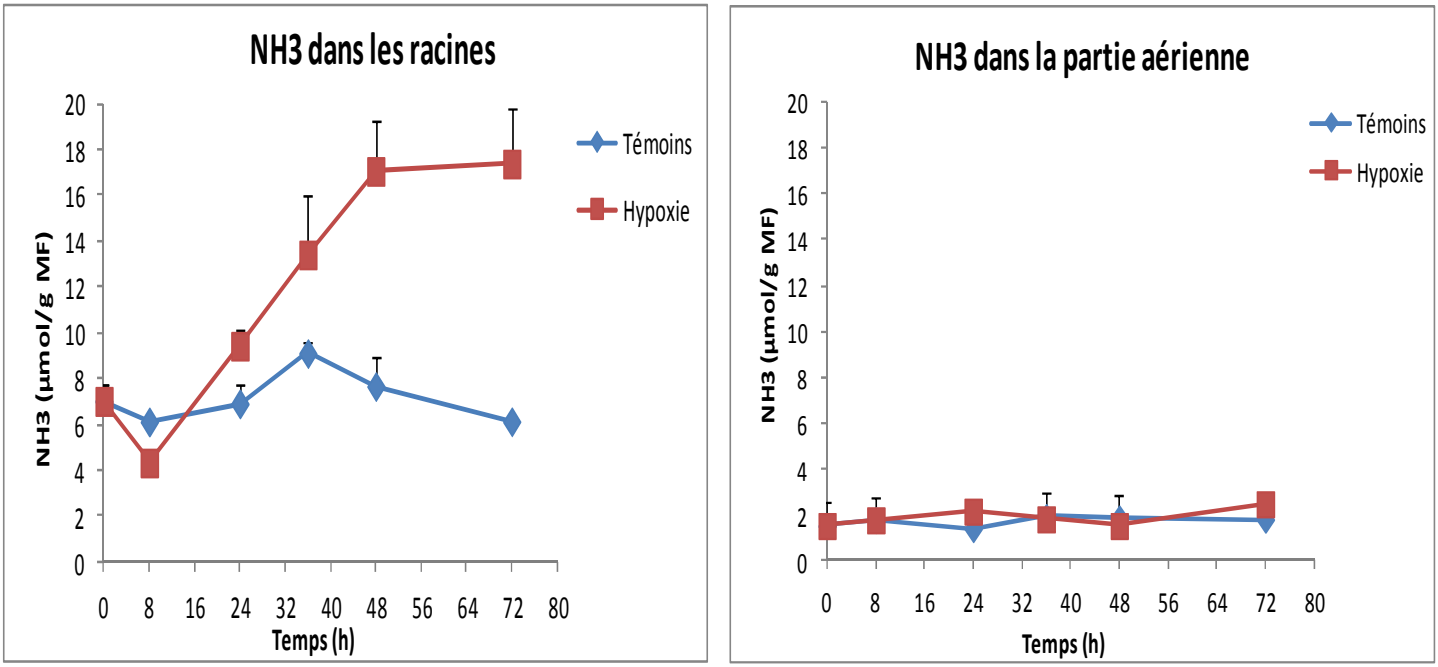


Figure III.2 : Teneur en ammonium (NH_4^+) en fonction du temps de traitement ; les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard (nb de répétition = 3).

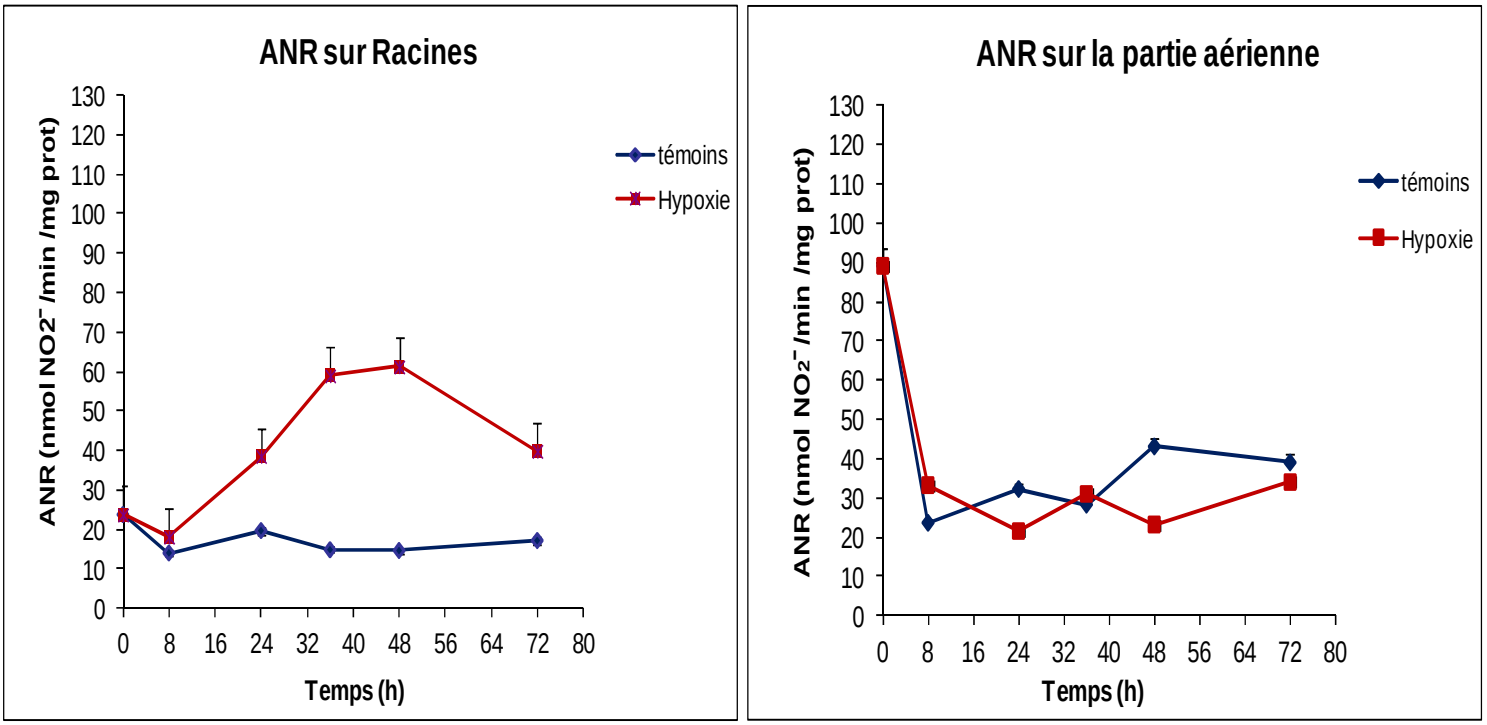


Figure III.3 : Mesure de l'activité nitrate réductase (ANR) en fonction du temps de traitement ; les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard (nb de répétition = 3).

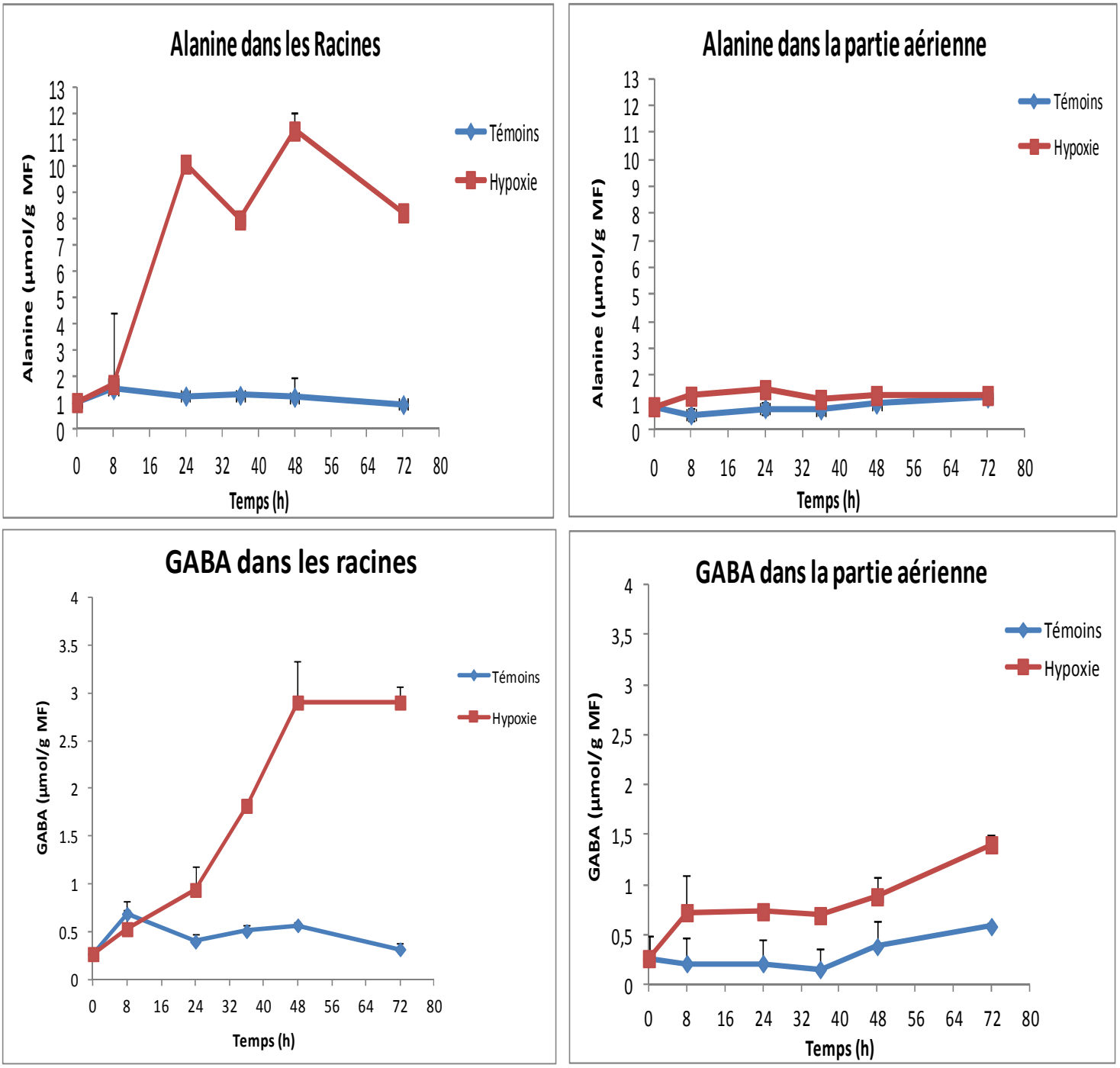
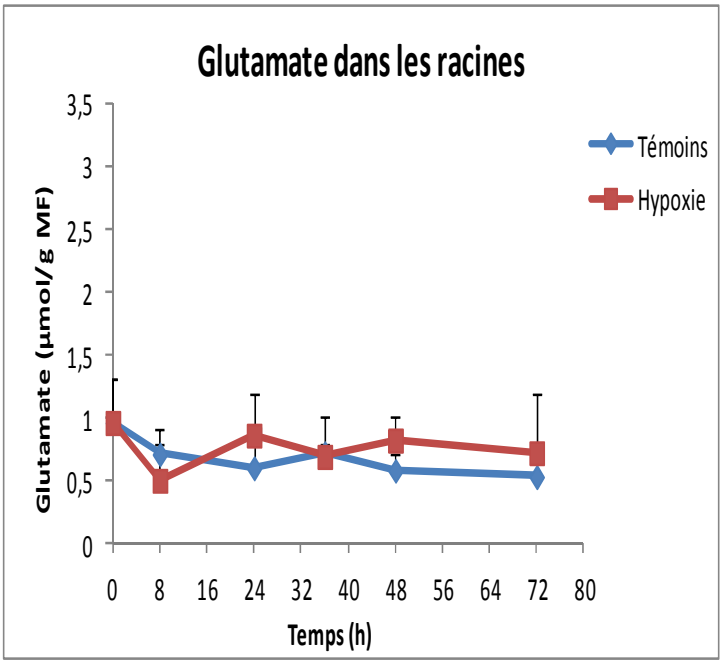
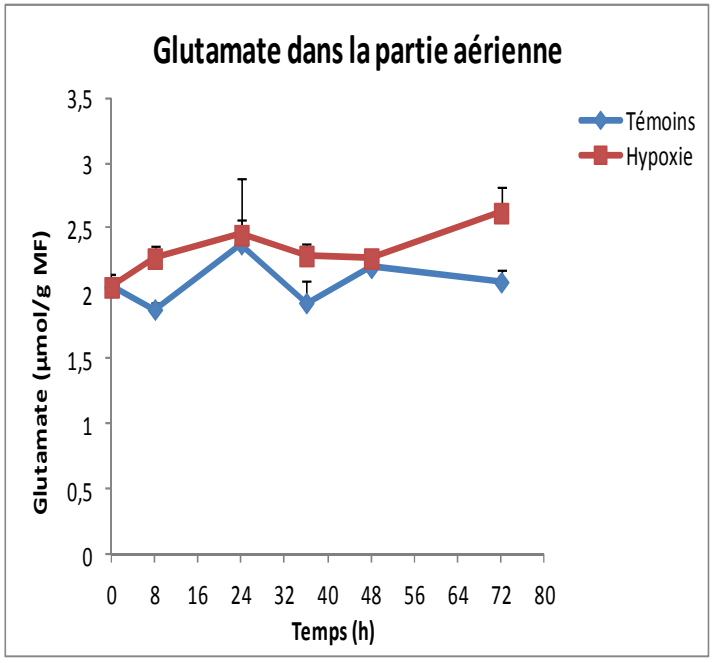
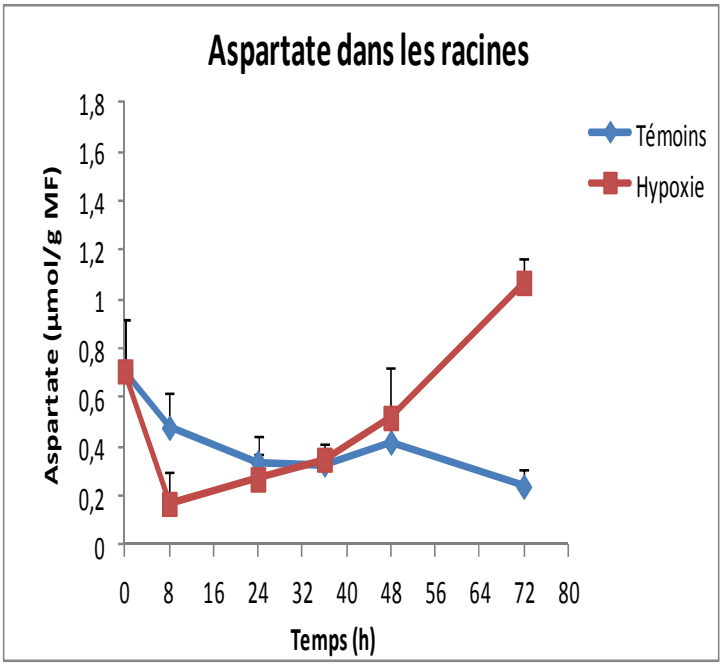


Figure III.4 : Evolution de la teneur d'alanine et du GABA en fonction du temps de traitement ; les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard (nb de répétition = 3).







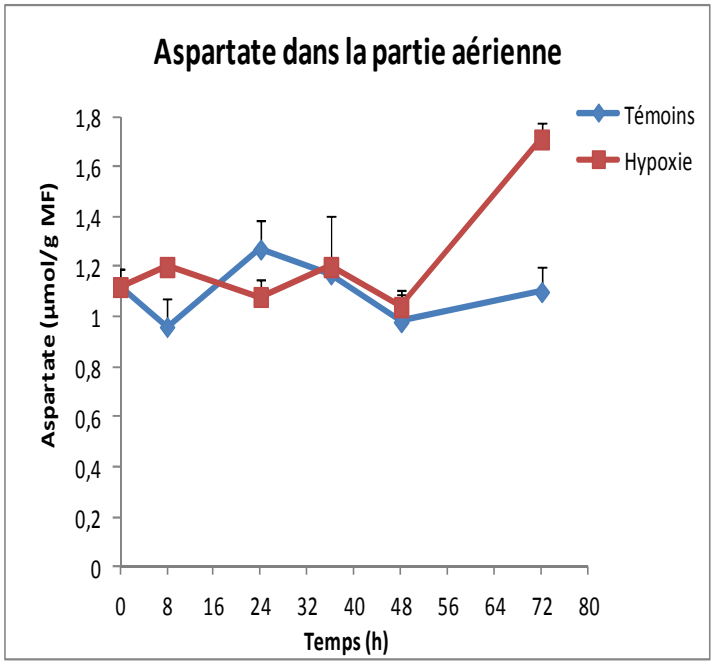


Figure III.5 : Teneur en glutamate et aspartate en fonction du temps de traitement ; les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard (nb de répétition = 3).

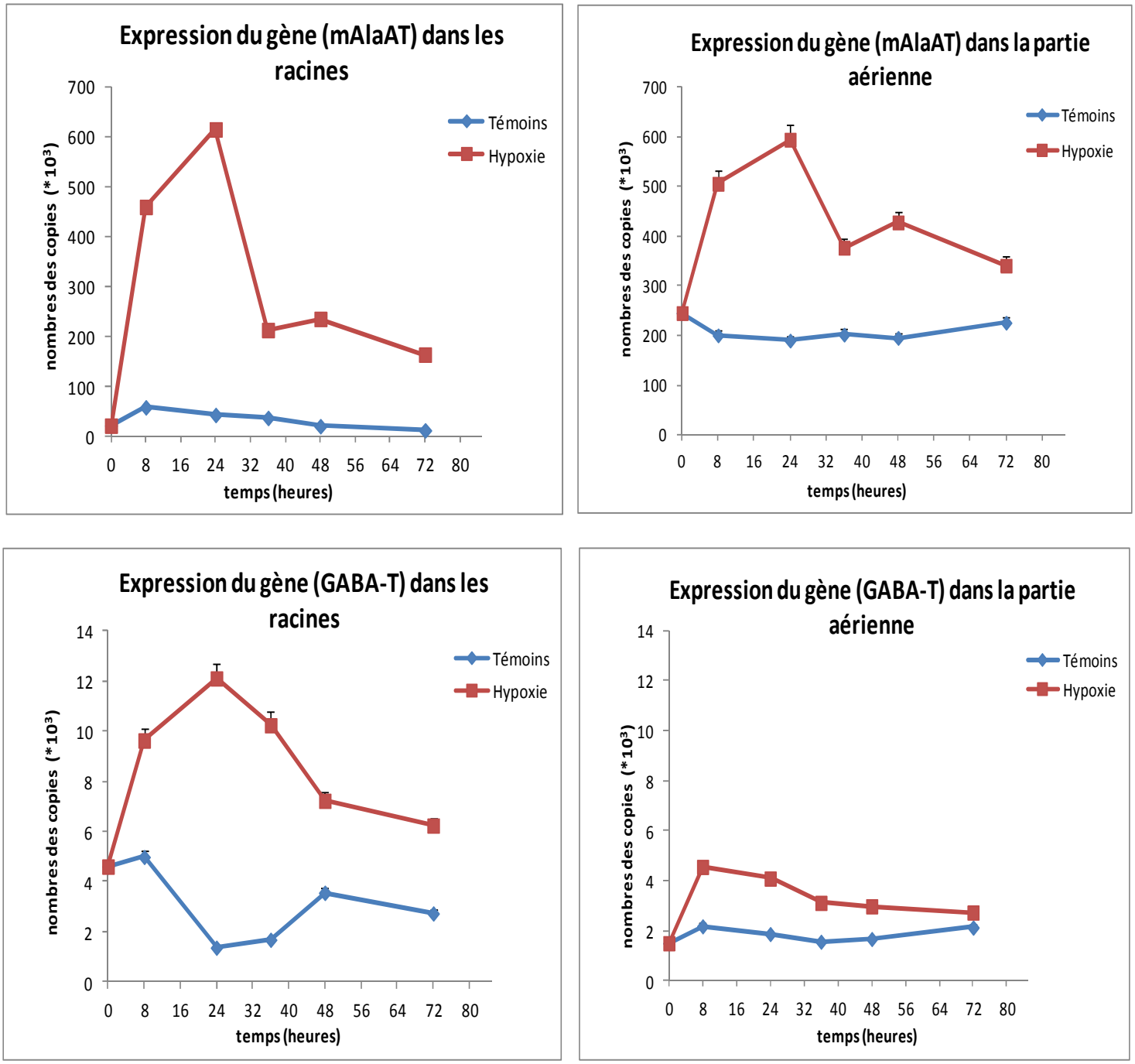


Figure III.6 : Graphes d'expression des gènes **mAlaAT et GABA-T** dans les racines (à gauche) et dans les feuilles (à droite) en fonction du temps de traitement ; les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard (nb de répétition = 3).

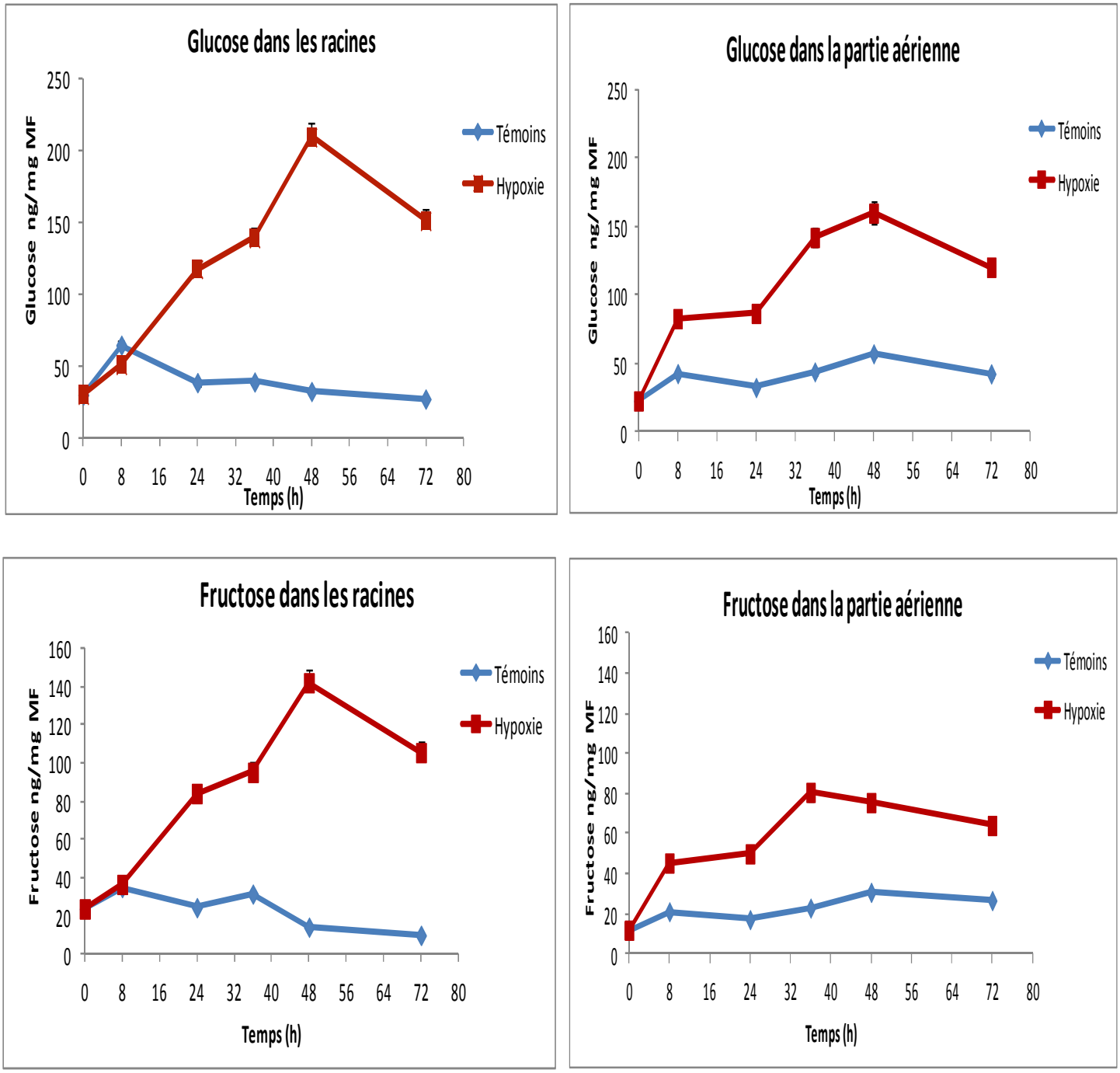


Figure III.7 : Graphes d'évolution de la teneur des sucres (glucose et fructose) dans les racines et la partie aérienne des deux groupes de plantes, sous stress hypoxique racinaire et témoins en fonction du temps de traitement ; les valeurs sont présentées sous la forme de moyenne ± erreur standard (nb de répétition = 3).

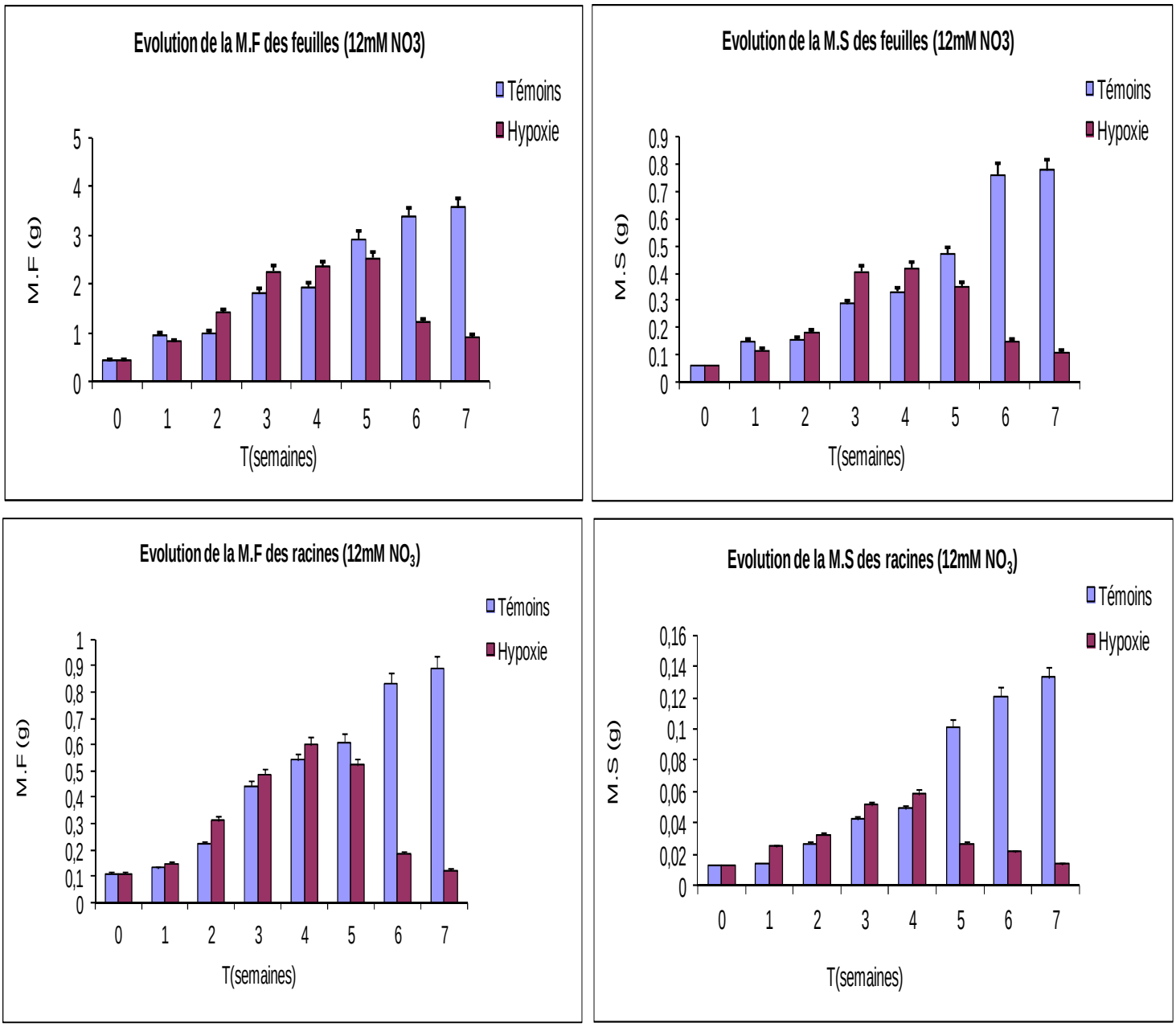
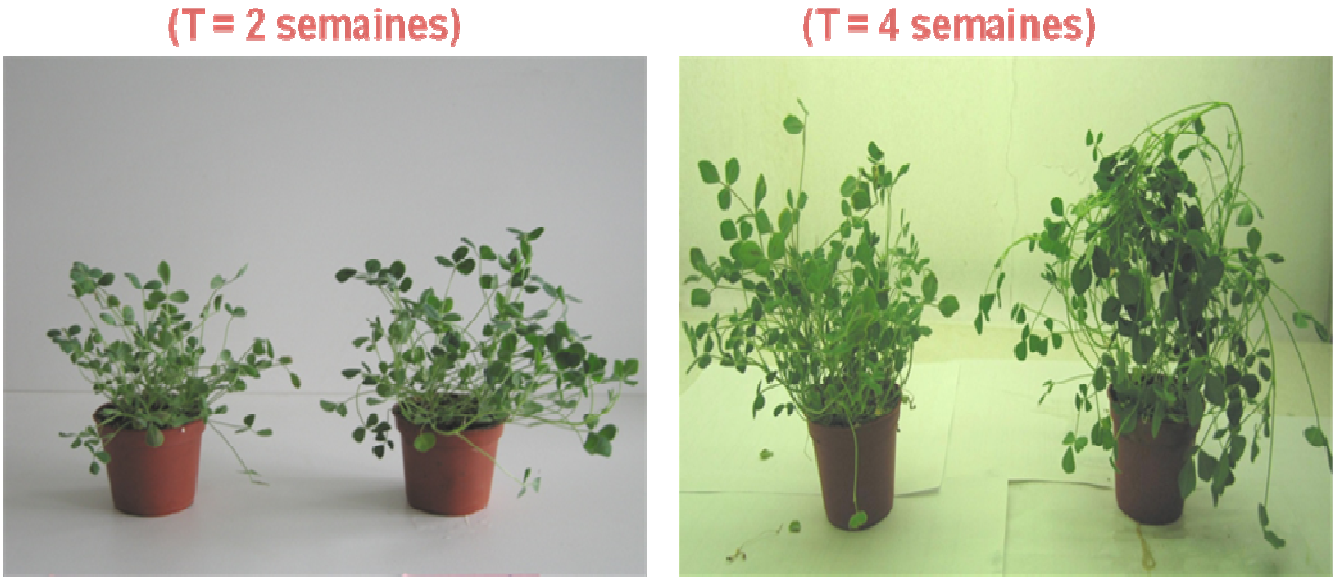


Figure III.8 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche (à gauche) et sèche (à droite) de la partie aérienne et racinaire chez les plantes en « hypoxie » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement, avec la concentration 12mM de NO_3^-.
Chaque valeur représente la moyenne de 8 à 15 plantes et se présente dans les graphes sous forme de « valeur ± erreur standard.



Normoxie (12 mM nitrate) **Hypoxie (12 mM nitrate)** **Normoxie (12 mM nitrate)** **Hypoxie (12 mM nitrate)**

Figure III.9 : Plantes de "*Medicago Truncatula*" témoins et en hypoxie à 2 (à gauche) et à 4 semaines (à droite) d'application du stress hypoxique racinaire avec la solution nutritive de 12mM de nitrate.

Plantes de « *Medicago truncatula* » témoins

Plantes de « *Medicago truncatula* » après 7 semaines d'hypoxie

Figure III.10 : état des plantes, témoins (à gauche) et en hypoxie racinaire (à droite) après 7 semaines d'application du stress.

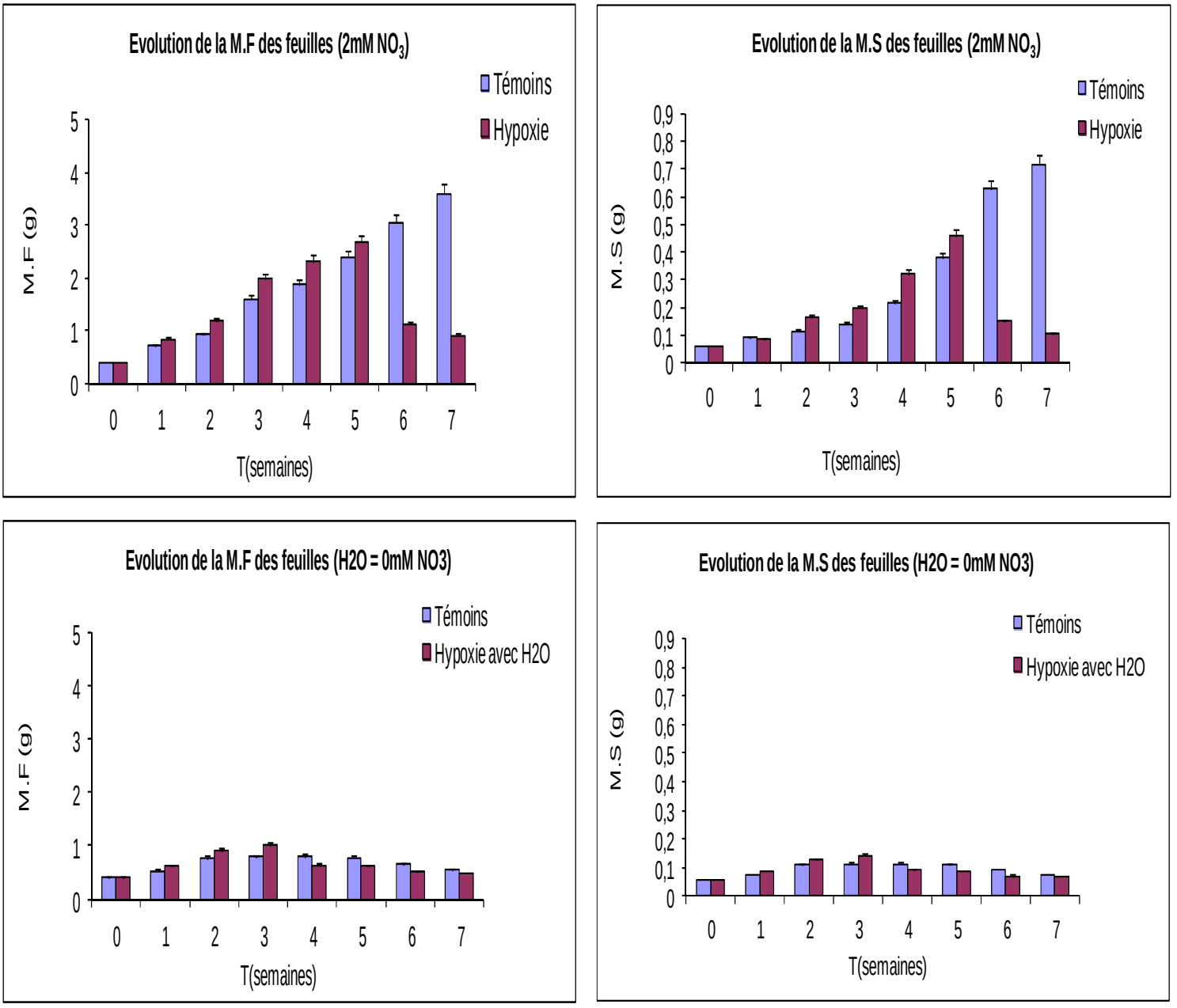


Figure III.11 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche (à gauche) et sèche (à droite) de la partie aérienne chez les plantes en « hypoxie » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) avec 2 mM de NO_3^- et l'eau déminéralisée. Chaque valeur représente la moyenne de 8 à 15 plantes et se présente dans les graphes sous forme de « valeur ± erreur standard.

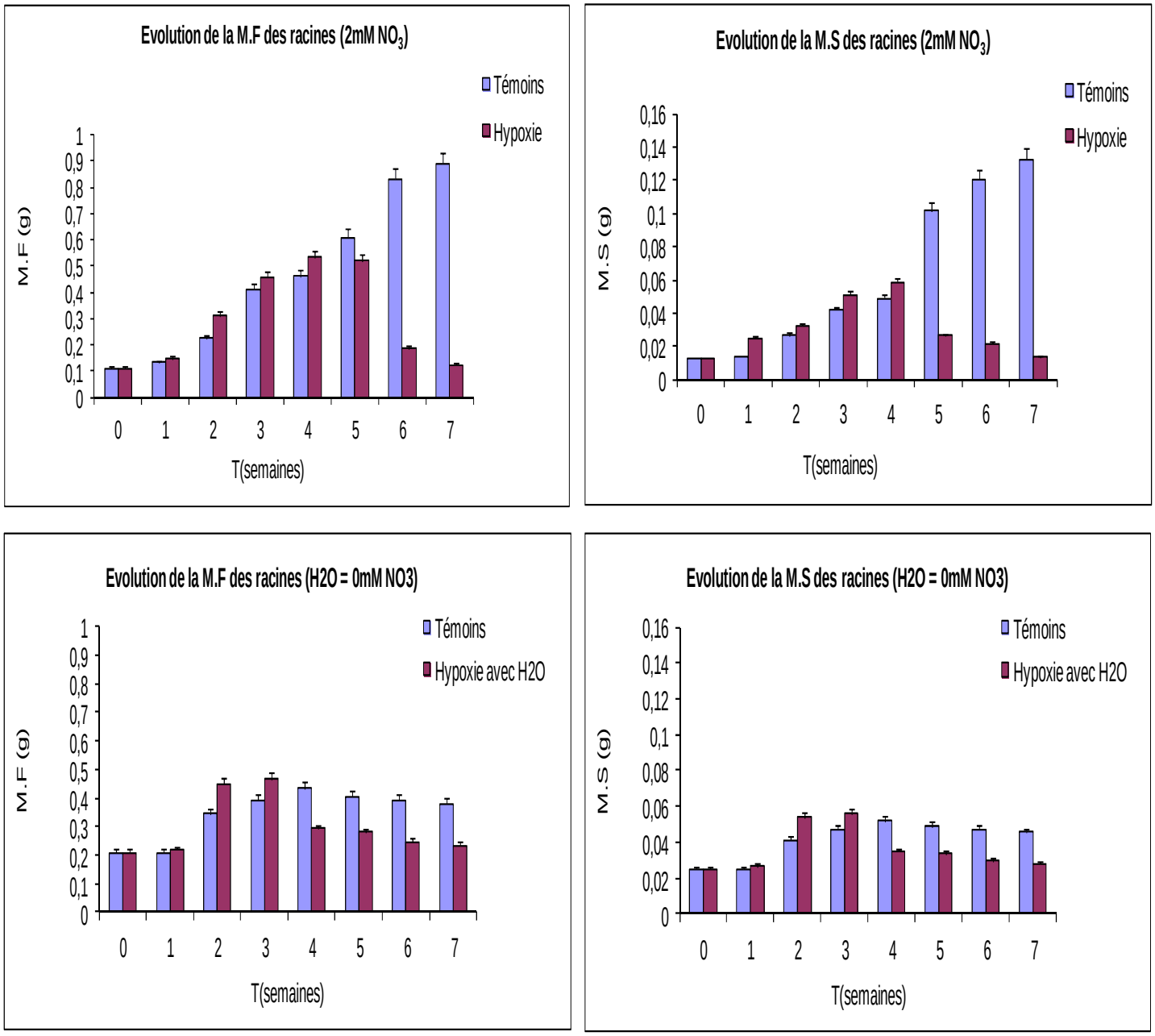


Figure III.12 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche (à gauche) et sèche (à droite) des racines chez les plantes en « hypoxie » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement avec 2 mM de NO_3^- et l'eau déminéralisée. Chaque valeur représente la moyenne de 8 à 15 plantes et se présente dans les graphes sous forme de « valeur ± erreur standard.

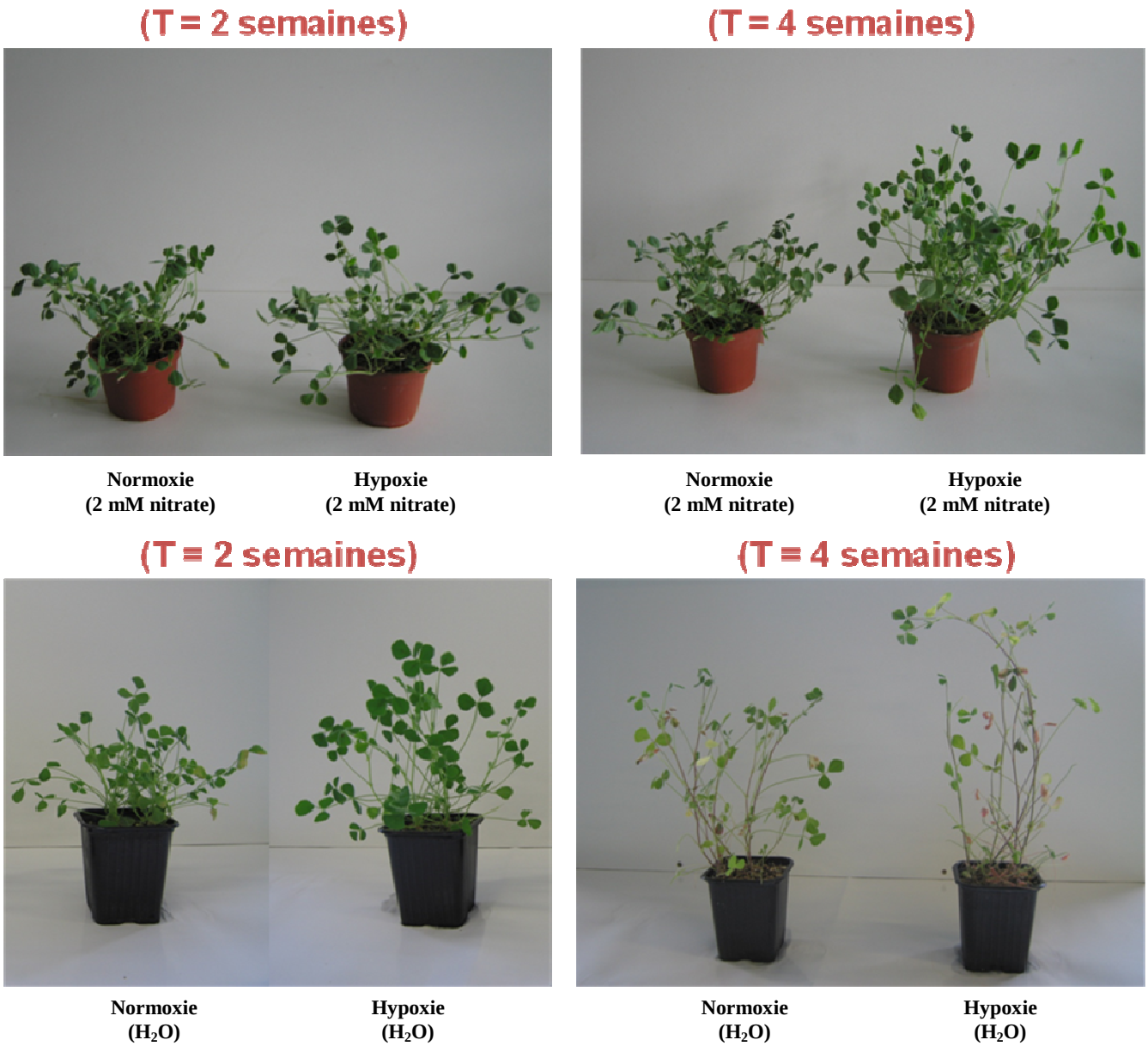


Figure III.13 : Plantes de "*Medicago Truncatula*" témoins et en hypoxie à 2 (à gauche) et à 4 semaines (à droite) d'application du stress hypoxique racinaire avec la solution nutritive à 2mM de nitrate et l'eau déminéralisé

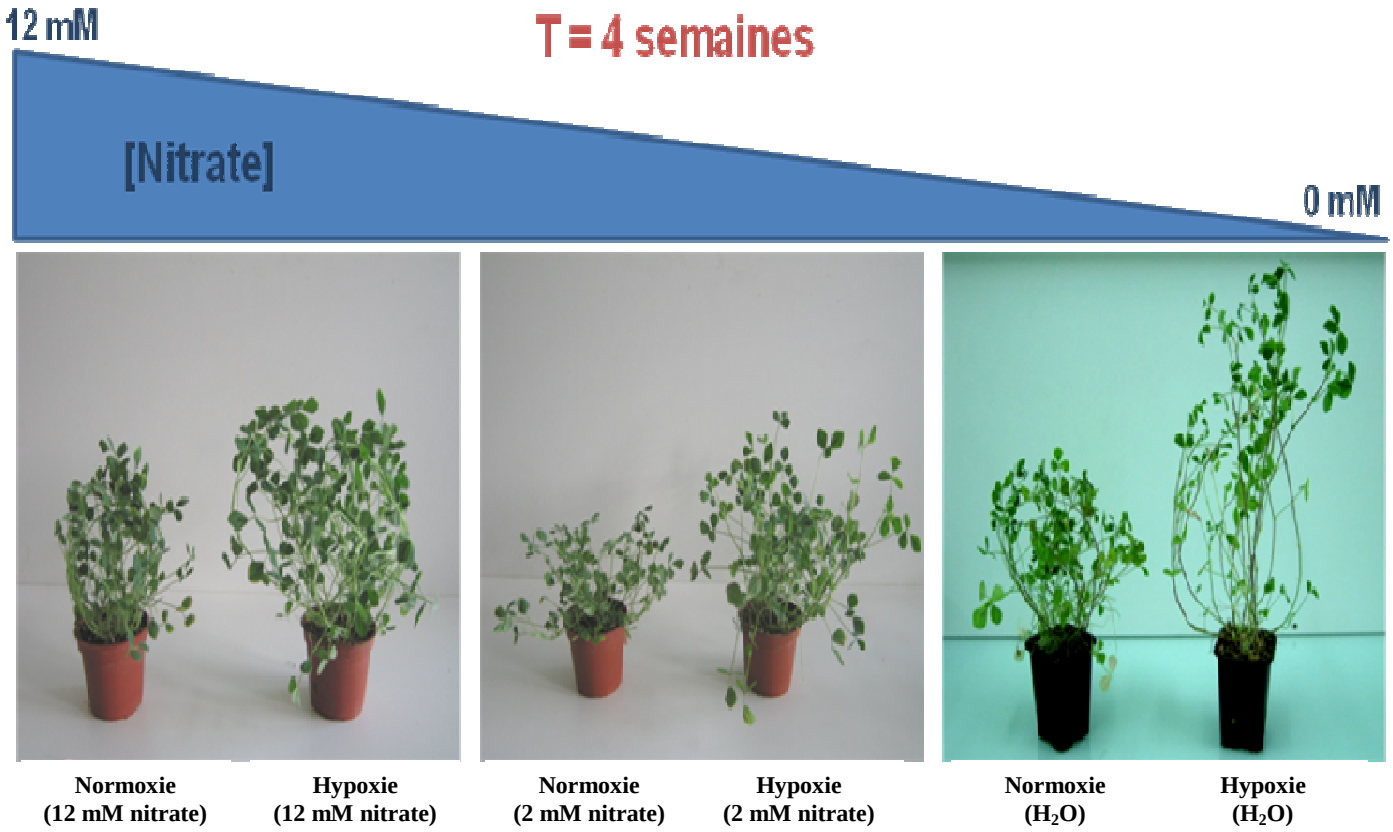


Figure III.14 : Schéma récapitulative de l'effet de l'hypoxie racinaire sur la croissance de la biomasse aérienne ; effet persistant et indépendant de la concentration en éléments minéraux de la solution nutritive allant de 12 à 2mM de nitrate et l'eau déminéralisée.

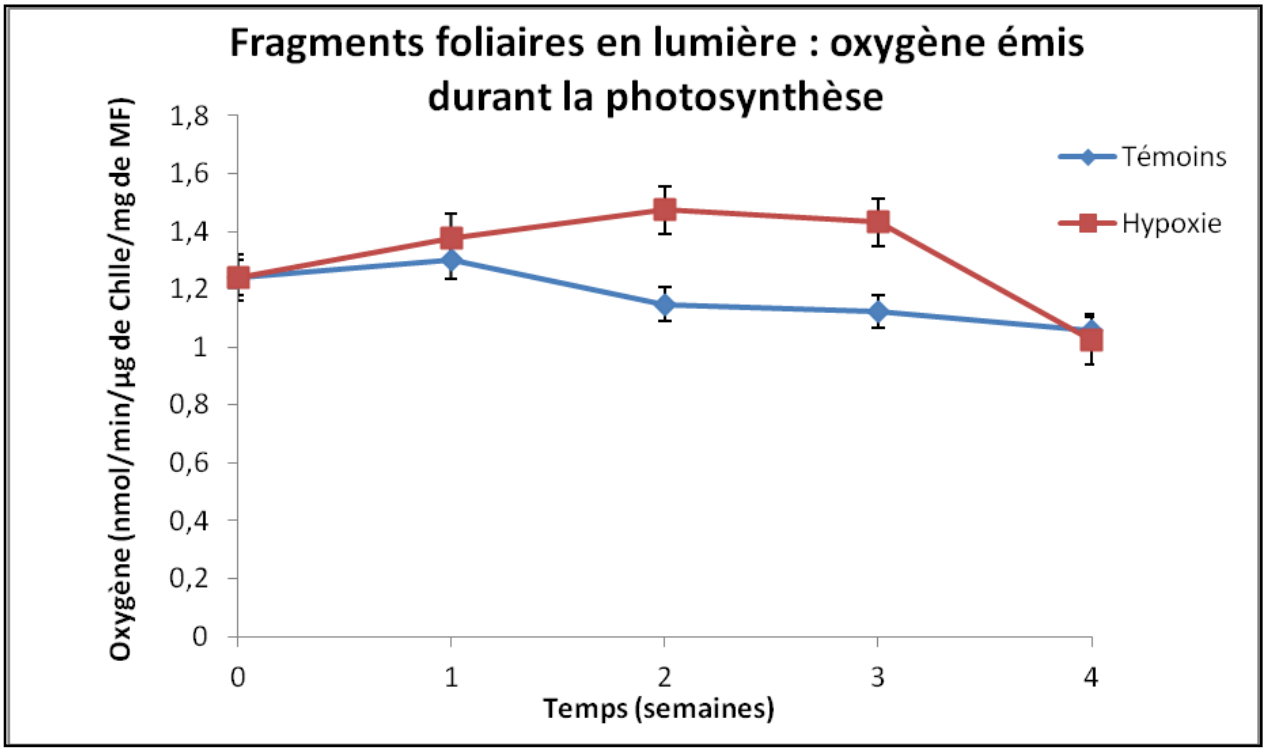


Figure III.15 : Mesure de la quantité d'oxygène émise durant la photosynthèse, en lumière des fragments foliaires. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).

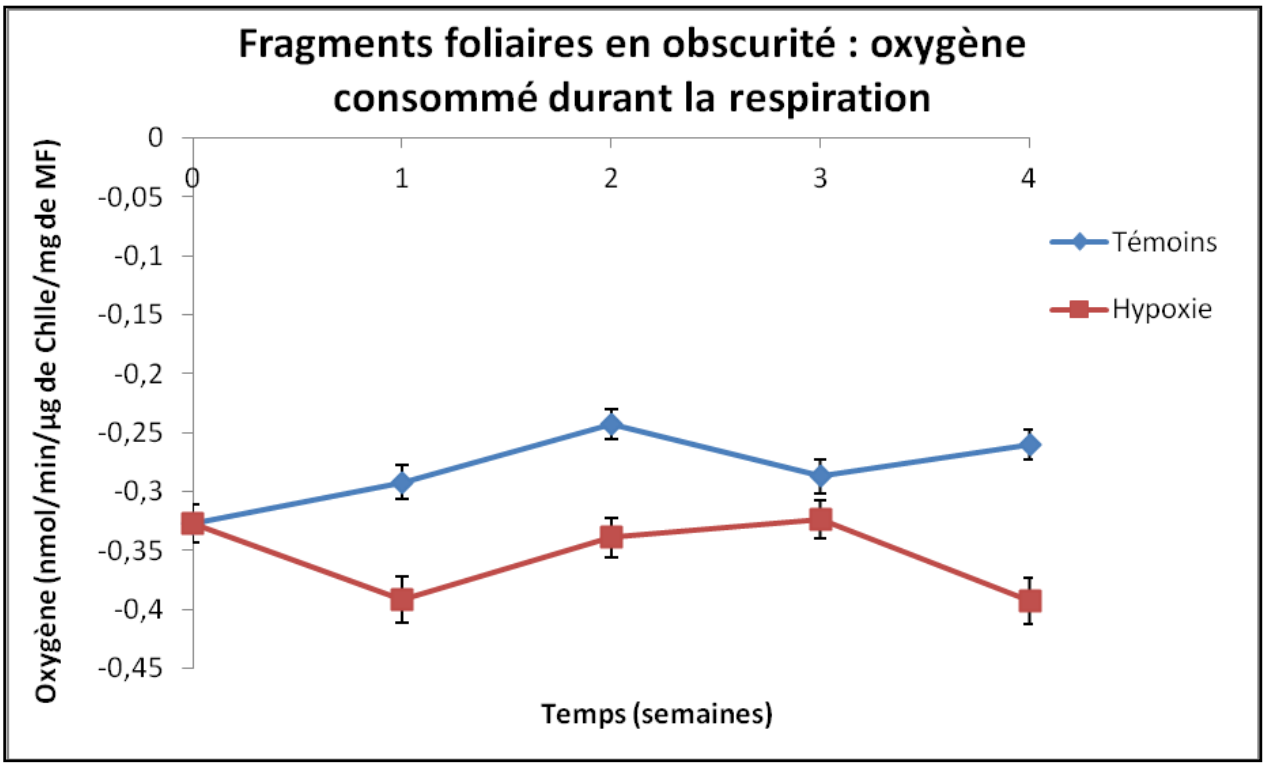


Figure III.16 : Mesure de la quantité d'oxygène consommée durant la respiration, en obscurité des fragments foliaires. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).

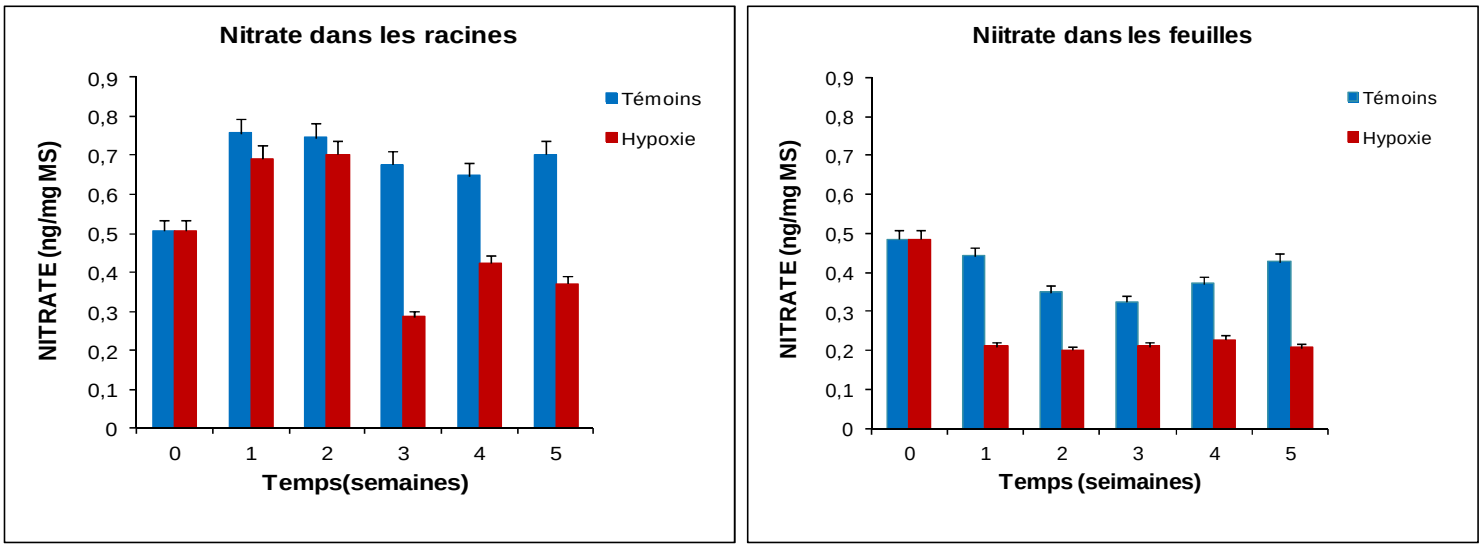


Figure III.17 : Graphes d'évolution de la concentration du nitrate dans les racines (à gauche) et dans la partie aérienne (à droite) des plantes en fonction du temps (semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).

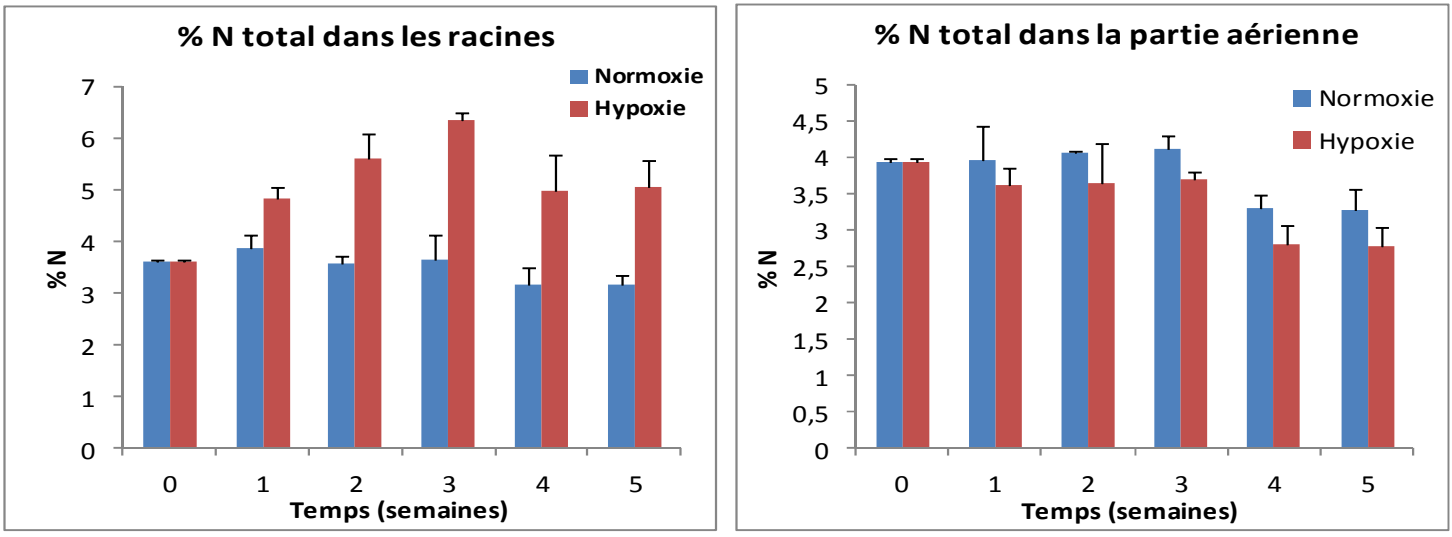


Figure III.18 : Graphes d'évolution de la teneur en azote dans les racines (à gauche) et dans la partie aérienne (à droite) des plantes en fonction du temps (semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).

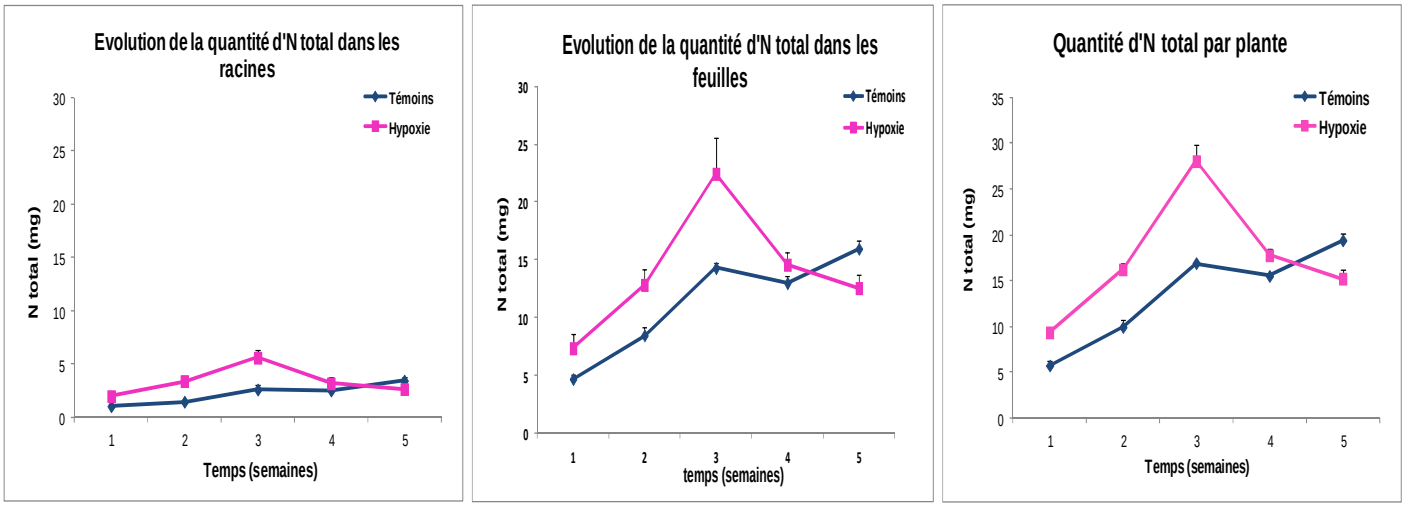
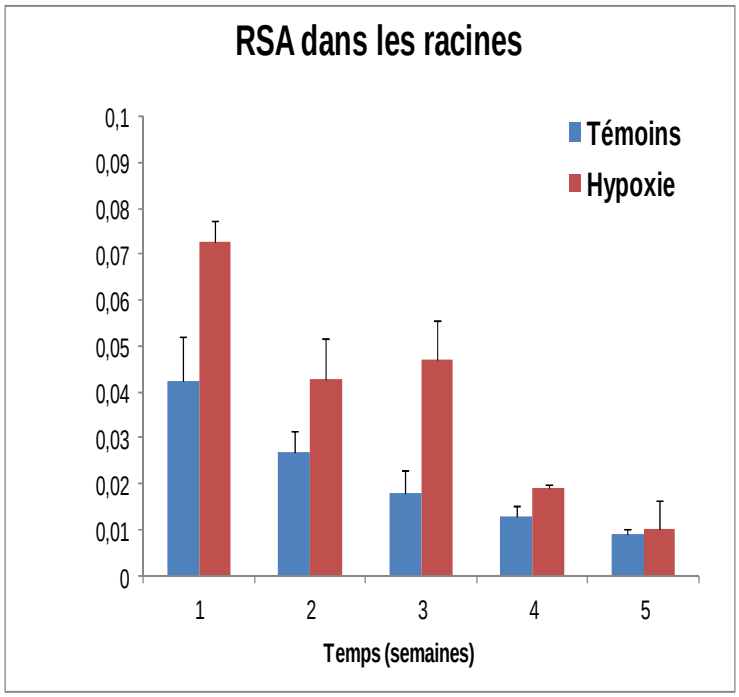


Figure III.19 : Graphes d'évolution de la quantité d'azote en fonction du temps (semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).



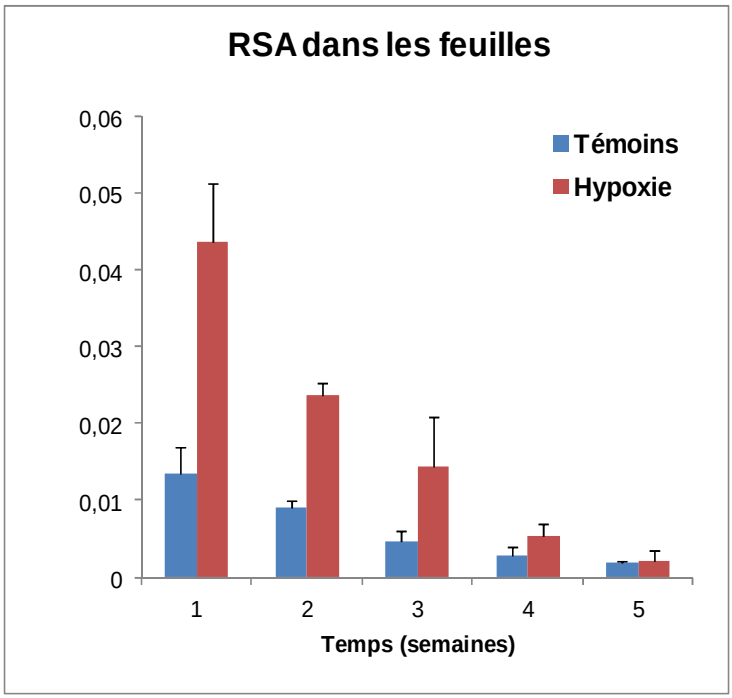


Figure III.20 : Graphes d'évolution du RSA dans les racines (à gauche) et dans la partie aérienne (à droite) des plantes en fonction du temps (semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).

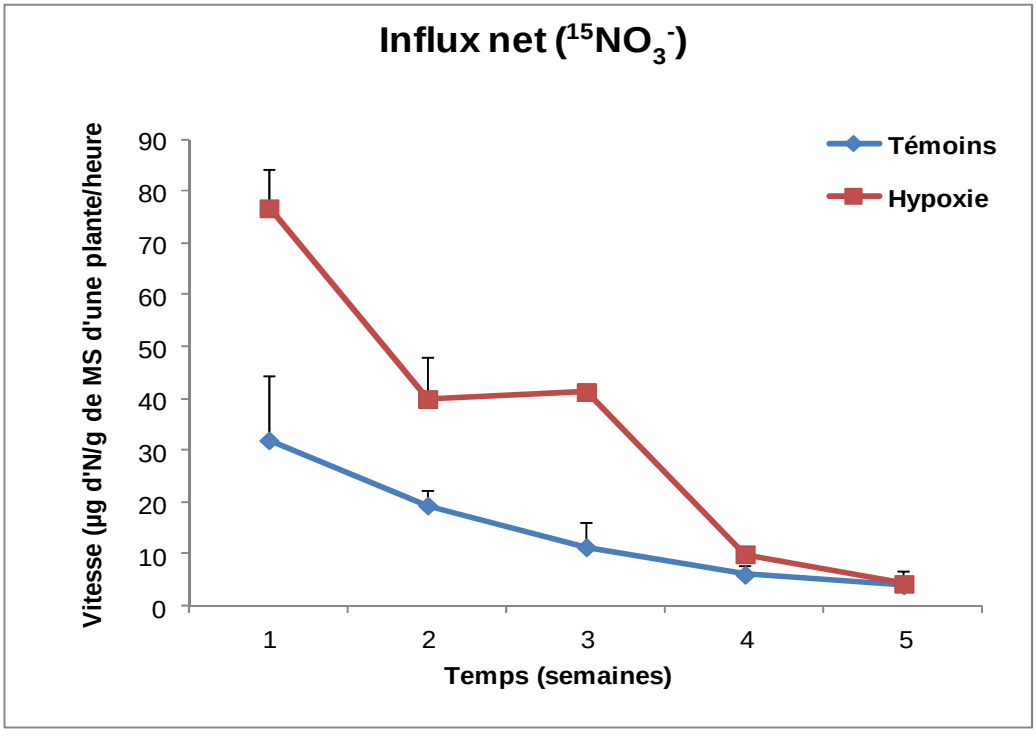


Figure III.21 : Graphes d'évolution de la vitesse d'incorporation d'azote par plante en fonction du temps (semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).

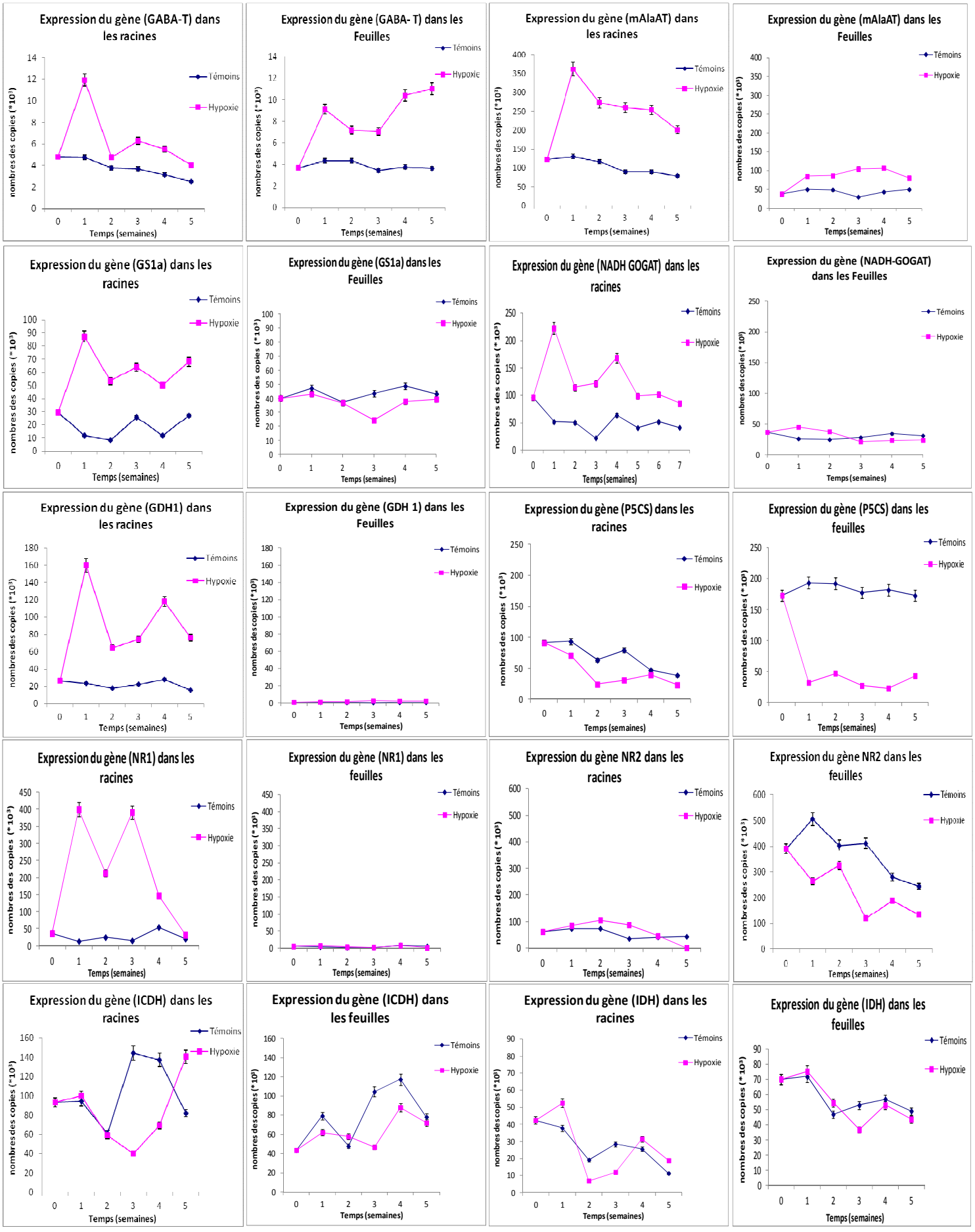
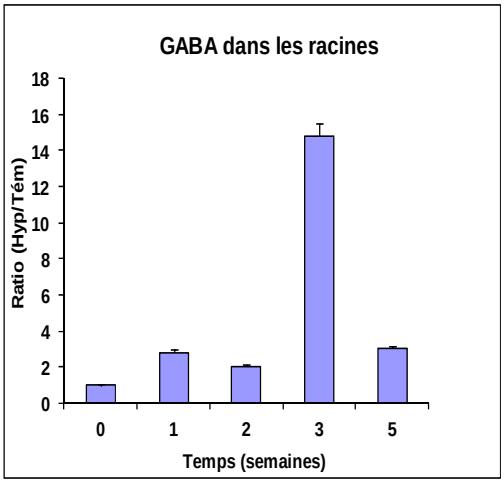
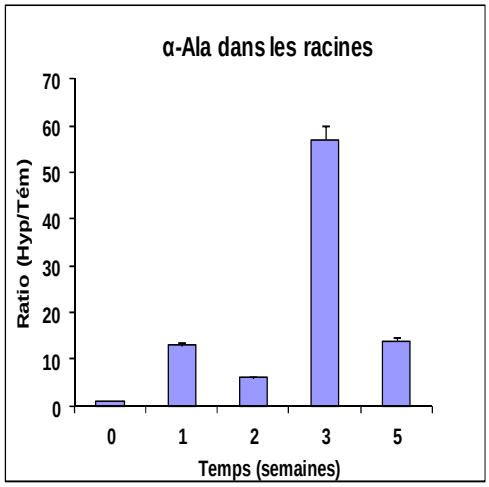
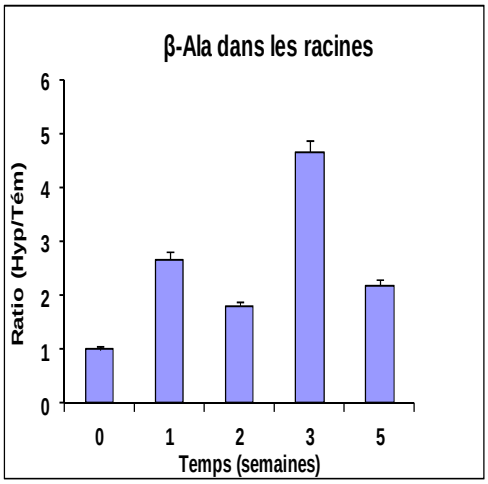
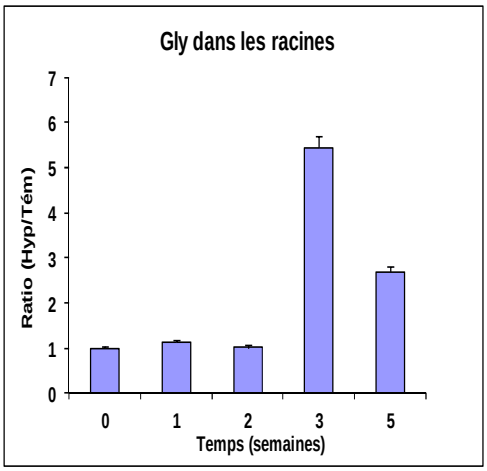


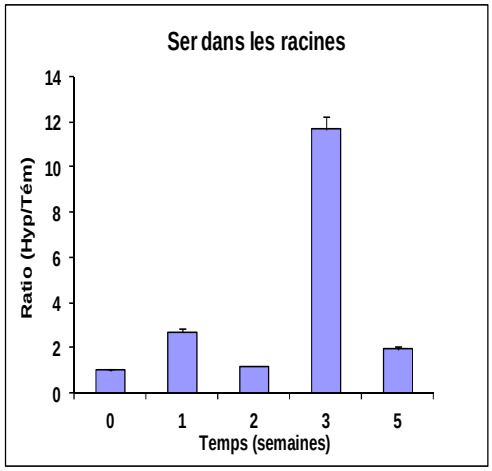
Figure III.22: Graphes d'évolution de l'expression de gènes (en nombre de copies) du métabolisme azoté et carboné dans les racines et les feuilles en fonction du temps (en semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 3).

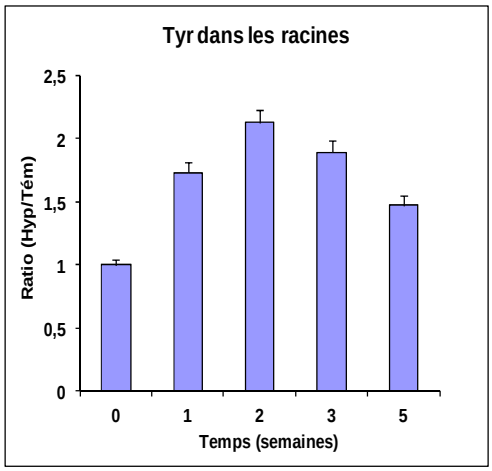












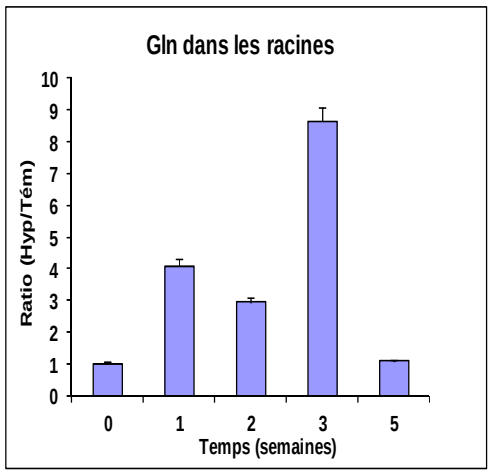


Figure III.23 : graphes des ratios (valeurs en hypoxie racinaire / valeurs en normoxie) de quelques acides aminés accumulés par réponse à l'hypoxie racinaire (GABA, α-Ala : alfa-alanine, β-Ala : béta-alanine, Gly : glycine, Ser : sérine, Tyr : tyrosine et Gln : glutamine) dans les racines des plantes en fonction du temps de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 2).

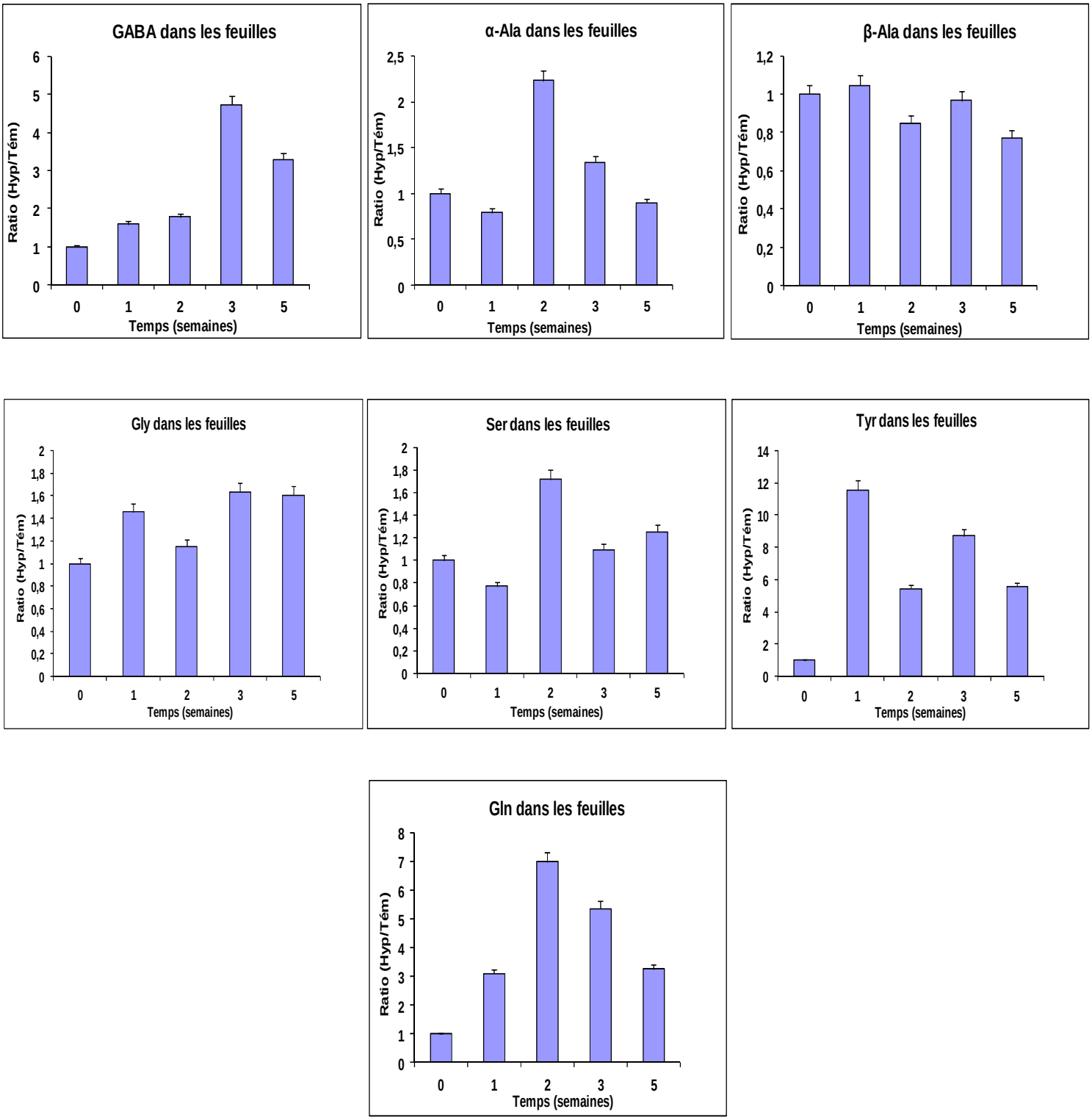
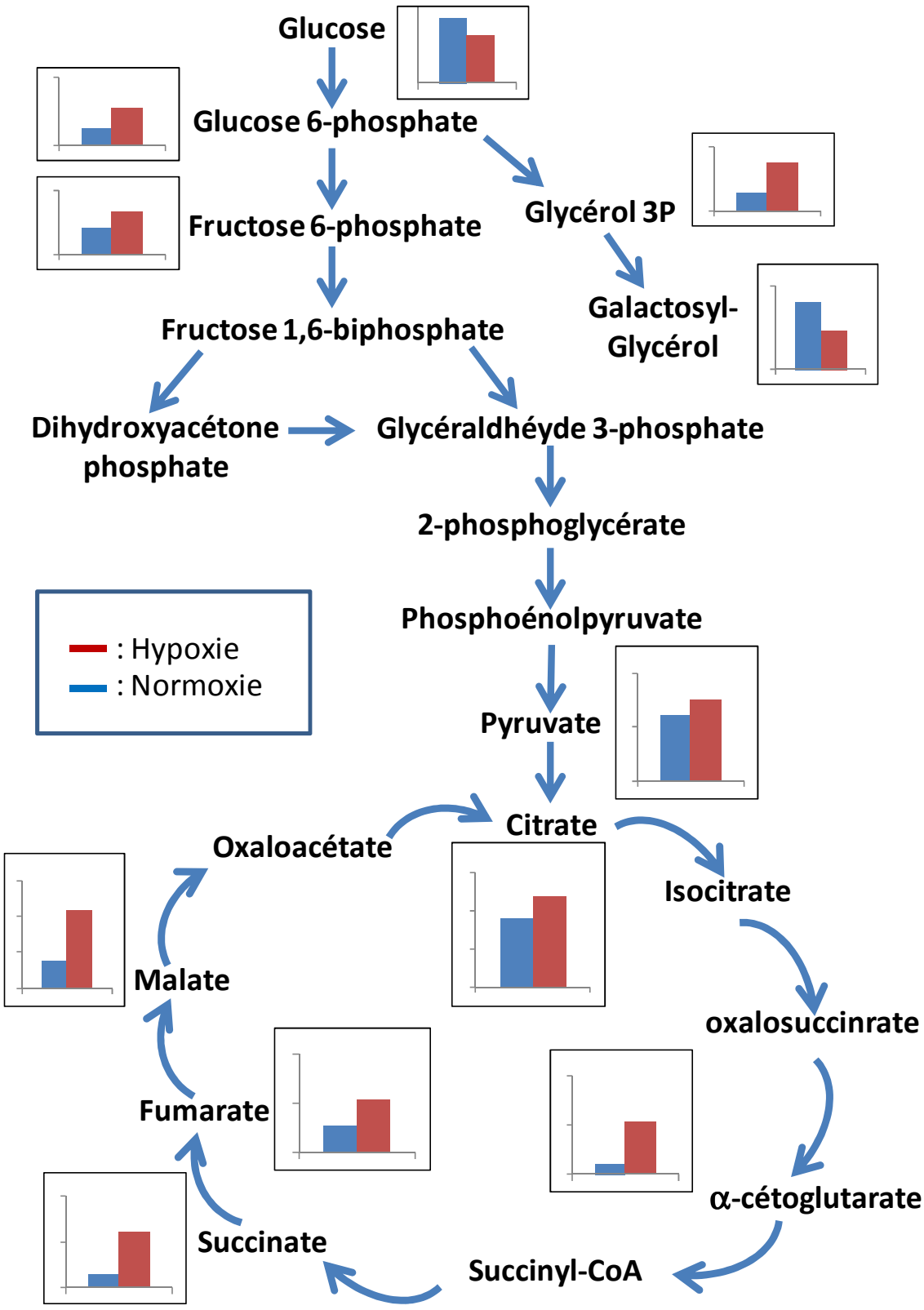
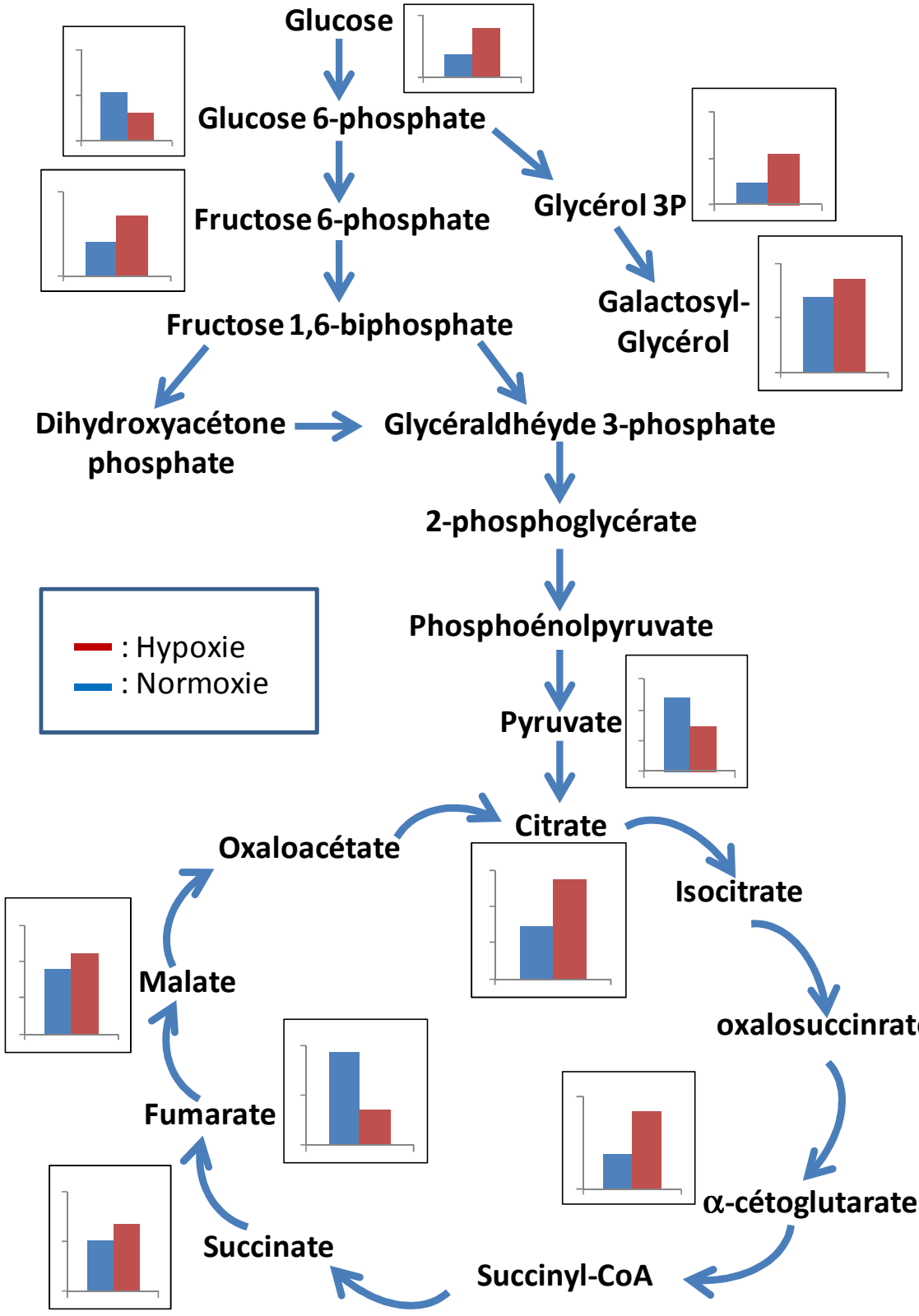


Figure III.24 : graphes des ratios (valeurs en hypoxie racinaire / valeurs en normoxie) de quelques acides aminés accumulés par réponse à l'hypoxie racinaire (GABA, α-Ala : alfa-alanine, β-Ala : béta-alanine, Gly : glycine, Ser : sérine, Tyr : tyrosine et Gln : glutamine) dans la partie aérienne des plantes en fonction du temps de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 2).

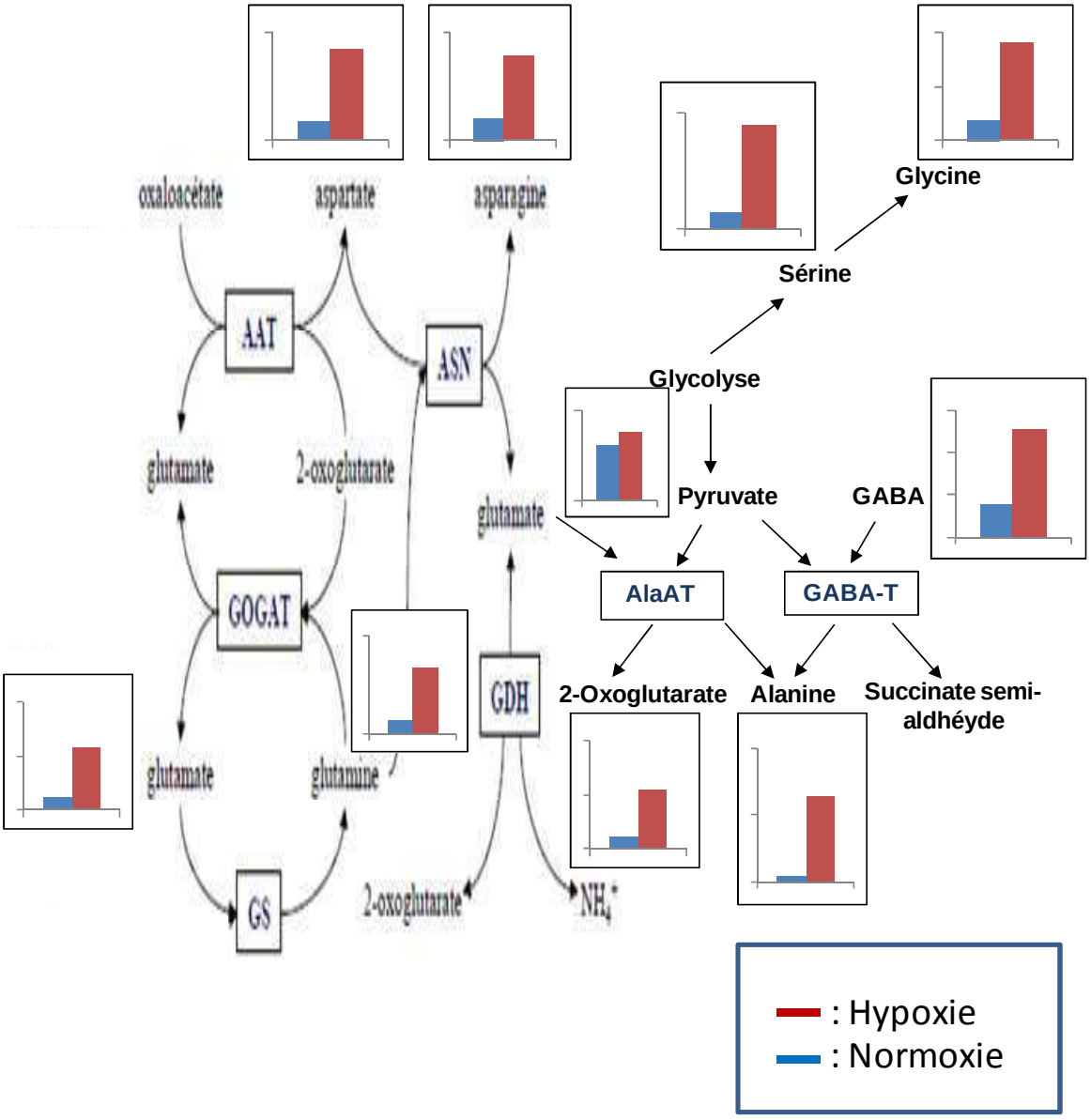
Shéma récapulatif des modifications du métabolisme carboné sous hypoxie racinaire dans les racines



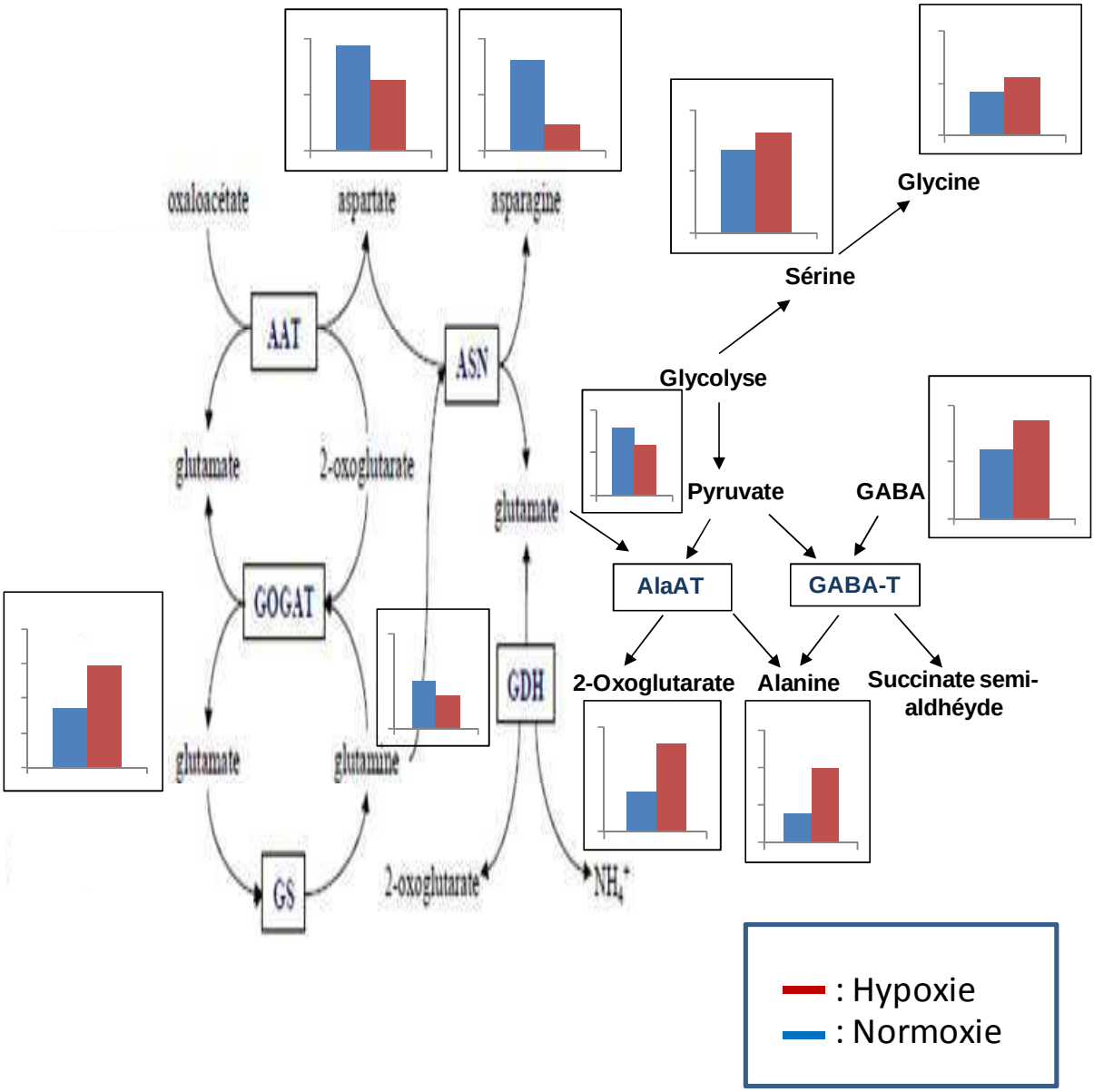
Shéma récapulatif des modifications du métabolisme carboné sous hypoxie racinaire dans la partie aérienne



Shéma récapulatif des modifications du métabolisme azoté sous hypoxie racinaire dans les racines



Shéma récapulatif des modifications du métabolisme azoté sous hypoxie racinaire dans la partie aérienne



Chapitre IV :

Effet de l'hypoxie racinaire sur le développement de la partie aérienne : Relation partie racinaire – partie aérienne

IV-1 Introduction

L’immersion se produit sur des vastes régions à travers le monde (Gomes et Kozlowski, 1984 ; Kozlowski 1997) affectant environ 10% de la superficie mondiale (FAO, 2002). Elle survient généralement lorsque les précipitations d'eau d'irrigation sur la surface du sol durent pendant une période prolongée ; ca peut également se produire lorsque la quantité d'eau apportée sous forme de pluie ou d'irrigation est plus que ce qui peut s'infiltrer dans le sol dans un ou deux jours. Dans les études physiologiques des plantes, le terme «hypoxie» est réservé aux situations dans lesquelles la concentration d'oxygène est un facteur limitant (Morard et Silvestre, 1996) ; la forme la plus courante de ce stress se produit à court terme par des inondations lorsque les racines sont immergées dans l'eau, mais la partie aérienne reste dans l'atmosphère.

Une des propriétés les plus importantes du sol est l'aération, liée à la capacité d'échanger l’air atmosphérique avec le sol. Cette échange est généralement réalisée principalement par la diffusion des gaz du et vers le sol par l'intermédiaire des pores. Dans la plupart des sols bien drainés, les espaces remplis d'air (les pores) représentent 10 à 40% du volume total du sol. L’immersion diminue ces pores et affaibli l'alimentation d’oxygène pour les racines (Ponnamperuma, 1972), ce qui rend la diffusion du gaz dans le sol plus faible que dans un sol bien drainé (Armstrong, 1979 ; Ponnamperuma, 1984) ; En outre, les gaz formés par le métabolisme du sol, y compris le dioxyde de carbone, s'accumulent à proximité des surfaces racinaires (setter et Belford, 1990) ; cependant, en conditions naturelles, la concentration d'oxygène diminue progressivement, et, par conséquent, l'hypoxie précède toujours le phénomène d'anoxie (setter et Waters, 2003) lorsque les champs sont immergés pendant des longues périodes.

Les espèces végétales tolérantes à l'hypoxie racinaire peuvent développer certaines caractéristiques morphologiques et modifier leur métabolisme en réponse au manque d'oxygène pour survivre et pour maintenir leur croissance.

Les mécanismes de la tolérance à l'hypoxie racinaire comprennent : i) le maintien d’une forte aération interne à travers l’aérenchyme constitutive et la création d'une zone oxydée autour des racines (Armstrong et al., 1994), ii) l'adaptation métabolique qui maintient la production d'énergie sous hypoxie racinaire (Brandle et Crawford, 1987) et le stockage substantiel des glucides pour la fermentation (Brandle, 1991 ; Waters et al., 1991). Ainsi que l’adaptation des plantes à l'immersion est caractérisée par la croissance des racines séminales et la production des racines adventives avec des aérenchymes (Belford, 1981 ; Trought et Drew, 1982 ; Drew, 1983 ; Justin et Armstrong, 1987 ; Barrett-Lennard et al., 1988 ; Thomson et al., 1992 ; Huang et al., 1994a). En fait, la formation d’aérenchyme est considéré comme une des plus

importantes adaptations morphologiques pour la tolérance au stress hypoxique ou anoxique (Jackson et Armstrong, 1999 ; Evans, 2003 ; Visser et Voesenek, 2004) ; les aérenchymes assurent, dans les racines, la respiration aérobique et le maintien de la croissance dans des conditions hypoxiques. En cas de déficit en oxygène, la production d'éthylène est accéléré pour stimuler la formation d'aérenchyme dans les racines adventives et induit leur croissance (Drew et al., 1979 ; Jackson, 1989) : Le précurseur immédiat de l'éthylène est le 1-amino cyclopropane 1-carboxylique (ACC), qui est synthétisé dans les racines (Bradford et Yang, 1980) ; L'activité d'ACC synthase est stimulée dans les racines en conditions de stress hypoxique (Cohen et Kende, 1987), cependant, la conversion de l'ACC en éthylène est bloquée car c'est une réaction qui nécessite de l'oxygène. L'ACC est par conséquent, transporté à travers les cellules des racines vers la partie aérienne et plus précisément, vers la partie inférieure des tiges qui sont généralement la région principale d'accumulation d'ACC et ensuite, en présence d'oxygène, l'éthylène est formé puis libéré (Sairam et al., 2008).

Les plantes immergées par l'eau sont affectées par diverses contraintes, autre que la limitations en gaz, par les carences en éléments minéraux du sol (Setter et Waters, 2003 ; Setter et al., 2009), ce qui rend l'hypoxie racinaire comme principale cause de réduction de la croissance des plantes (Trought et Drew, 1980 a, b ; Drew, 1991 ; Huang et al., 1994a, b).

La tolérance des plantes à l'immersion dépend aussi de leur réponse à l'hypoxie racinaire par des modifications de leurs caractères métaboliques (Thomson et al., 1992 ; Huang et al., 1997) : en général, les plantes soumises au stress hypoxique racinaire subissent un manque d'énergie (Gibbs et al., 2000) par réduction de la respiration racinaire (Marshall et al., 1973 ; Lambers, 1976 ; Drew, 1983, 1990) ; elles répondent à ce manque énergétique par des adaptations métaboliques :

Ces adaptations comprennent : la respiration anaérobique, le maintien de la synthèse des glucides, la diminution de l'acidification cytoplasmique et le développement du système de défense antioxydant (Armstrong et al., 1994 ; Drew, 1997 ; Setter et al., 1997). Les cellules des plantes produisent l'énergie, en présence d'oxygène, par la respiration aérobique, qui comprend la glycolyse, cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative mais en cas de déficit en oxygène (sous condition hypoxique), le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative sont bloqués, et les cellules subissent la respiration anaérobique pour assurer la demande d'énergie (Davies, 1980) et cela via la glycolyse et la fermentation.

Dans ce chapitre, nous avons examiné les mécanismes de réponse du « *Medicago truncatula* » à l'immersion : les changements morphologiques et métaboliques et les mécanismes d'adaptation à l'hypoxie (déficit en oxygène) induite par l'hypoxie racinaire par un système de « Split-root » pour montrer la communication possible entre la partie racinaire et aérienne des plantes soumises à un stress hypoxique racinaire pour répondre à la question suivante : **comment les plantes vont réagir, lorsqu'une partie de ces racines est soumise au stress hypoxique racinaire (système de split-root) et quelles sont les modifications physiologiques et métaboliques possibles dans la partie aérienne de ces plantes par réponse à ce stress ?**

IV-2 Résultats

IV-2-1 Etude de la croissance des plantes et leur réponse à l'hypoxie racinaire dans un système « Split root » : réponse systématique ou réponse localisée

Les résultats de nos analyses métabolomiques du chapitre précèdent (chapitre III) ont montré que la plante a du répondre à l'hypoxie racinaire par des modifications morphologiques et métaboliques ; la plante a répondu à l'hypoxie racinaire par des modifications dans sa partie aérienne, pour cela, il se peut qu'un signal a été transmis de la partie racinaire vers la partie aérienne et qui a induit ces modifications.

Dans ce chapitre, la relation entre la partie racinaire et aérienne de la plante a été étudiée ; pour cela, le système de « split root » a été proposé.

IV-2-1-1 Effet sur la biomasse de la partie aérienne

La biomasse des trois groupes de plantes, correspondants aux trois traitements suivants : témoin, hypoxie racinaire totale et hypoxie partielle, est suivie pendant 7 semaines du stress hypoxique racinaire. Le premier groupe de plantes (témoin) est un groupe se développant dans un milieu normoxique et arrosé par la solution nutritive, le deuxième groupe est un groupe se développant dans un milieu hypoxique où toutes les racines sont immergées par la solution nutritive (hypoxie totale) et le troisième groupe des plantes, à deux parties racinaires séparées, une partie qui est en hypoxie et une autre partie en normoxie.

Nos résultats montrent que les plantes en hypoxie racinaire totale ont plus de biomasse que les plantes témoins (résultats déjà vus dans le chapitre précèdent) mais aussi que celles qui sont en hypoxie partielle jusqu'à la 4ème semaine du traitement à partir de laquelle elles commencent à diminuer (figure IV.1). Les plantes en hypoxie partielle se développent plus rapidement et ont plus de biomasse (en matière fraiche et sèche) que les plantes témoins et cela jusqu'à la 7ème semaine.

IV-2-1-2 Effet sur la biomasse de la partie racinaire

Les racines des plantes en hypoxie totale se développent plus rapidement que celles des plantes témoins et des plantes en stress hypoxique racinaire partiel, jusqu'à la 4ème semaine, à partir de laquelle elles commencent à décliner pour atteindre un minimum au bout de la 7ème semaine. Cependant, les racines des plantes en hypoxie partielle se développaient plus rapidement que les plantes témoins jusqu'à la 7ème semaine (figure IV.2).

IV-2-2 Réponse des métabolites à l'hypoxie racinaire :

IV-2-2-1 Dans les racines

A- Variations des métabolites

Les résultats présentés ci-dessous sont effectués jusqu'à la 5ème semaine de stress hypoxique racinaire pour avoir des plantes en bon état physiologique et représentent les aires mesurées pour chaque métabolite identifié rapportées à l'aire de notre étalon interne, et à la masse exacte de chaque échantillon. Les métabolites détectés sont divisées en plusieurs groupes, selon leur réponse à l'hypoxie racinaire :

a) Métabolites affectées directement par l'hypoxie racinaire

Des modifications directes très importantes, ont été détectées dans le métabolisme azoté des plantes en hypoxie racinaire totale et la partie racinaire des plantes qui sont en hypoxie racinaire partielle ou « split root » comparées à leur partie racinaire en normoxie et aux plantes témoins.

- Parmi les acides aminés et leurs précurseurs qui sont accumulés, la thréonine, qui s'est accumulé dés la première semaine d'hypoxie totale ou partielle et continue jusqu'à la 5ème semaine (figure IV.3) ainsi que d'autres métabolites comme l'acide décanoïque, il diminuait en hypoxie totale et partielle comparé au témoin.
- D'autre part, des sucres comme le digalactosylglycérole, fucose, galactose, galactosylglycérole, glucose et le ribose, ont montré une diminution, en fonction du temps, sous hypoxie racinaire totale et dans la partie racinaires en hypoxie, des plantes en hypoxie racinaire partielle comparés aux plantes témoins (figure IV.4).

b) Métabolites affectées directement et indirectement par l'hypoxie racinaire

La réponse des plantes à l'hypoxie racinaire a été montrée par des modifications des taux de métabolites, dans les différentes conditions de stress : hypoxie totale et les deux parties racinaires des plantes en hypoxie partielle ou « Split-root » comparées aux plantes témoins :

- les deux marqueurs de l'hypoxie racinaire, l'alanine et le gaba (figure IV.5) sont accumulés ainsi que d'autres acides aminés detectés sont présentés dans les graphes de la figure IV.6.
- Les acides organiques, citons : l'acide succinique, l'acide fumarique, l'acide kétoglutarique, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide pyruvique, l'acide lactique et le phosphorique (figure IV.7).
- les polyamines : ornithine, spermidine et putrescine (figure IV8).

- Parmi les autres acides, deux groupes : un groupe des acides qui sont accumulés et un autre groupe des acides qui sont diminués :
    - Dans le premier groupe, on a : l'acide butanoïque, l'acide hydroxyglutarique, l'acide benzoïque, l'acide glycérique, l'acide glycolique, l'acide laurique, l'acide malonique, l'acide malonique tris, l'acide nicotinique, l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide P-OH benzoïque, l'acide stéarique, l'acide trans-aconitique, l'acide tétradécanoïque, l'acide thréonique, l'acide thréonique-lactone et l'acide shikimique (figure IV.9).
    - Dans le 2ème groupe on a : l'acide salicylique et l'acide vanillique (figure IV.10).
- Certains sucres, formés à partir de l'amidon (forme de réserve dans les plantes), ont montré une accumulation et d'autres ont montré une diminution :
    - Parmi les sucres qui sont accumulés, on a : le fructose 1, le fructose 2, fructose 6P, le B-sitostérol, le galactinole, le mannitol, le myo-inositol, le glucose 6P1, le glucose 6P2, le glycérol, le glycérol 2P, le glycérol 3P, le mannose 1, le tréhalose, le thréitole et le thréitole d2 (figure IV.11).
    - Le mélibiose, le raffinose, le rhamnose, le ribose, la xylose 1 et 2 et le maltose 1 ont montré une diminution (figure IV.12).

c) Métabolites non affectées par l'hypoxie racinaire :

- La figure IV.13 montre l'évolution de l'éthanolamine (une monoamine issue de la décarboxylation de la sérine par une sérine décarboxylase) ; il est plus ou moins stables et ne change pas en hypoxie racinaire totale et partielle comparés aux témoins.
- Cependant plusieurs acides détectés n'ont pas montré des différences comme l'acide aminoadipique, l'acide butirique, l'acide ascorbique, l'acide ascorbique d1, l'acide citramalique, l'acide galactonique, l'acide galacturonique, l'acide gluconique, l'acide linolénique, l'acide octanoïque, l'acide coumarique et l'acide ribonique (figure IV.14).
- Un ensemble des sucres ne sont pas affectés comme le maltose et le sucrose (figure IV.15) ; ils restaient plus ou moins stables.

B- Analyses statistiques

Pour faciliter le résonnement dans nos analyses statistiques, un numéro et un nom avec le poids et la condition expérimentale sont associés à chaque échantillon (voire tableau « a » du tableau IV.1) avec :

- **RnTm** pour les échantillons des racines des plantes témoins (N°1 à 10)
- **RnHm** pour les échantillons des racines des plantes en hypoxie totale (N°11 à 18)
- **RnHmH** pour les échantillons de la partie des racines en hypoxie (N°19 à 26), des plantes en « split root » (hypoxie partielle) et **RnHmN** pour les échantillons de leur deuxième partie de racines en normoxie (N°27 à 34)

a) ACP : Analyse en Composantes Principales

En déterminant les axes qui représentent le mieux les corrélations entre les variations des métabolites, des groupes d'échantillons, pour lesquels les profils métaboliques présentent des similarités, sont mis en évidence (figure IV.16).

Cette analyse montre, d'une part, que les échantillons de chaque groupe sont répartis dans un espace bien déterminé et sont proches les uns des autres ; d'autre part, les échantillons des deux groupes de plantes : en hypoxie totale (N°11 à 18) et en hypoxie partielle (N°19 à 26 pour la partie des racines en hypoxie et N°27 à 34 pour la partie des racines en normoxie) présentent plus de corrélations (sont plus proches les uns des autres) entre eux, comparés au groupe témoin (N°1 à 10).

b) Analyse de variance à deux facteurs

Les métabolites, variant significativement entre chaque série des deux répliquas, ont été recherché pour indiquer pour chaque échantillon, la valeur des deux facteurs de variation : temps et condition expérimentale. Nos résultats, présentés en détails avec les valeurs de « p-value » calculées, dans les tableaux IV.2, IV.3, IV.4 et IV.5, montrent que :

- Pour le facteur « **temps »**, 74 métabolites varient d'une façon significative (61% des métabolites détectés).
- Pour le facteur « **condition »**, 111 métabolites varient d'une façon significative (92% des métabolites détectés).
- Pour le facteur « **condition x temps »**, 78 métabolites varient d'une façon significative (64% des métabolites détectés).
- 10 métabolites ne varient pas d'une façon significative (8% des métabolites détectés).

c) Classification hiérarchique (HCL)

L'analyse des échantillons et de leur taux de métabolites permet de les grouper en fonction de leur ressemblance (niveau d'expression) et de schématiser ces regroupements sous

forme d’arbre. Les arbres permettent de mettre en évidence les groupes de métabolites qui suivent la même tendance (clusterisation).

Pour chacun des deux facteurs, temps et condition, ainsi pour la combinaison « temps x condition », on remarque que plusieurs groupes de métabolites, variant significativement, sont divisés en plusieurs groupes où chaque groupe représente les métabolites qui suivent la même tendance dans les trois conditions étudiées (figure IV.17 et IV.18), comparés au groupe témoin (N° 1 à 10 pour le groupe témoins, N°11 à 18 pour le groupe en hypoxie totale, N°19 à 26 et 27 à 34 pour les deux parties des racines en hypoxie et en normoxie respectivement, des plantes en hypoxie partielle). Ces résultats montrent qu’ils existent des groupes de métabolites qui répondent spécifiquement ou directement à l’hypoxie racinaire (chez le groupe des plantes en hypoxie totale et la partie des racines en hypoxie des plantes en hypoxie partielle), des groupes de métabolites qui répondent directement et indirectement à l’hypoxie racinaire (chez le groupe des plantes en hypoxie totale et les deux parties racinaires des plantes en hypoxie partielle) et des groupes de métabolites qui ne sont pas affectés par l’hypoxie racinaire, comparés au groupe témoin.

IV-2-2-2 Dans les feuilles

A- Variations des métabolites

Les plantes en hypoxie partielle « split-root » et les plantes en hypoxie totale, ont montré des modifications dans leur partie aérienne, des différents métabolites mesurés par GC-MS ; les métabolites identifiés, sont divisés en trois grands groupes : un groupe affecté directement, un deuxième groupe affecté directement et indirectement et un troisième groupe non affecté par l'hypoxie racinaire comparés au groupe témoin.

a) Métabolites affectés directement par l'hypoxie racinaire

Ces métabolites ont été affectés par réponse au stress hypoxique racinaire totale, comparés aux plantes en hypoxie racinaire partielle et témoins. Ces métabolites comportent :

- Les acides aminés comme la lysine qui s'est accumulée dès la première semaine du stress et continue jusqu'à la 5ème semaine. D'autres acides aminés comme l'aspartate et l'homosérine sont diminués avec des différences significatives (figure IV.19).
- Les acides organiques : l'acide fumarique, lactique et pyruvique qui sont diminués (figure IV.20).
- Les acides suivants : ribonique, ascorbique et héxanoique, qui sont accumulés. Par contre les acides, citramalique, décanoique et shikimique, qui sont diminués ; cette diminution est plus marquée chez l'acide citramalique que chez les autres acides où cette diminution est un peu tardive.
- Les sucres qui sont accumulés comme le galactose, l'arabinose, le maltose et le ribose qui présente une différence plus marquée (figure IV.21).

b) Métabolites affectés directement et indirectement par l'hypoxie racinaire

Ces métabolites se divisent en plusieurs groupes :

- Les acides aminés et leurs précurseurs : parmi les acides aminés qui ont montrés des modifications dans la partie aérienne des plantes par réponse à l'hypoxie racinaire totale et partielle (split-root), il y a ceux qui sont accumulés comme l'A-alanine, la glutamine d (un dérivé de la glutamine), la glycine, l'isoleucine, la leucine, la lévoglucosane, la lysine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, , la tryptophane, la tyrosine et la valine et ceux qui sont diminués comme l'asparagine, l'aspartate, le B-alanine et la glutamine (figure IV.22).
- Les acides organiques : par réponse à l'hypoxie racinaire totale et partielle, les acides organiques impliqués dans le cycle de creps comme l'acide citrique, malique,

pyruvique, ketoglutarique et d'autre part, l'acide phosphorique et son dérivé, le phosphorique, sont diminués comparés aux plantes témoins (figure IV.23).

- Les polyamines : l'ornithine et la putrescine qui sont diminués (figure IV.24).
- D'autres métabolites comme l'acide butirique, ascorbique, benzoïque, galactonique, galacturonique, glucarique, glycolique, laurique, nicotinique, tétradécanoique, T-ferrulique et thréonique, sont accumulés (figure IV.25) ; cependant, l'acide glutamique, linoléique, malonique, malonique tris et pyroglutamique ont montré une diminution.
- Les sucres comme le fructose, le digalactosylglycérole, le fucose, galactinole, galactosylglycérole, glucose, glycérol, maltose, lactose, mélibiose, myo-inositol, rhamnose, sucrose, thréitol et tréhalose sont accumulés (figure IV.26) tandis que d'autres sucres comme le glycérol 2P et 3P sont diminués.

c) Métabolites non affectées par l'hypoxie racinaire :

Certains métabolites n'ont pas répondu à l'hypoxie racinaire totale et partielle et ne sont pas affectés par ce stress dans la partie aérienne des plantes comparées aux plantes témoins. Parmi ces métabolites, on a :

- Les acides aminés : la figure IV.27 montre l'évolution de l'arginine, la cystéine, l'éthanolamine et la méthionine ; on remarque que ces acides aminés sont plus ou moins stables et ne présentent pas des différences entre les différents groupes étudiés.
- Parmi les polyamines, la spermidine (figure IV.28).
- Les acides suivants : aminoadipique, octanoique, palmitique, P-hydroxybenzoique et salicylique (figure IV.29).
- Parmi les sucres, le fructose 6P, le glucose 6P2, la rhamnose, le sorbitol, le tagatose et le B-sitostérol (figure IV.30).

B- Analyses statistiques

Dans nos analyses statistiques des échantillons de la partie aérienne des plantes, un numéro et un nom avec le poids et la condition expérimentale correspondante sont associés à chaque échantillon (voire tableau « b » du tableau IV.1) avec :

- **FnTm** pour les échantillons de la partie aérienne des plantes témoins (N°35 à 44)
- **FnHm** pour les échantillons de la partie aérienne des plantes en hypoxie totale (N°45 à 52)

- **FnHmH** pour les échantillons de la partie aérienne des plantes en hypoxie partielle ou « split root » (N°53 à 60)

a) ACP : Analyse en Composantes Principales

Les axes qui représentent le mieux les corrélations entre les variations des métabolites sont déterminées pour permettre de mettre en évidence, sans à priori, les groupes d'échantillons pour lesquels les profils métaboliques présentent des similarités ; la répartition des échantillons est présentée dans la figure IV.31 : on remarque que les échantillons de chaque groupe de plante, sont bien assemblés les uns à coté des autres et ce sont bien distingués de l'ensemble des échantillons des autres groupes.

b) Analyse de variance à deux facteurs

Les métabolites, variant significativement entre chaque série de deux répliquas, ont été recherché pour indiquer pour chaque échantillon, la valeur des deux facteurs de variation : temps et condition expérimentale ; nos résultats, présentés en détails avec les valeurs de « p-value » calculées, dans les tableaux IV.6, IV.7, IV.8 et IV.9, montrent que :

- Pour le facteur « **temps »**, 72 métabolites sont modifiés d'une façon significative (60% des métabolites détectés).
- Pour le facteur « **condition »**, 103 métabolites sont modifiés d'une façon significative (85% des métabolites détectés).
- Pour le facteur « **condition x temps »**, 64 métabolites sont modifiés d'une façon significative (53% des métabolites détectés).
- 16 métabolites ne sont pas variés d'une façon significative (13% des métabolites détectés).

c) Classification hiérarchique (HCL)

La comparaison des échantillons et de leur taux de métabolites permet de les grouper en fonction de leur ressemblance (niveau d'expression) et de schématiser ces regroupements sous forme d'arbre. Les arbres permettent de mettre en évidence les groupes de métabolites qui suivent la même tendance (clusterisation).

Pour chacun des deux facteurs, temps et condition, ainsi pour la combinaison « temps x condition », on remarque que dans la partie aérienne, comme dans les racines des plantes des différents groupes, les métabolites, variant significativement, sont divisés en plusieurs groupes où chaque groupe représente les métabolites qui suivent la même tendance chez les

deux conditions étudiées (figure IV.32 et IV.33), comparés au groupe témoins (N° 35 à 44 pour le groupe témoins, N°45 à 52 pour le groupe en hypoxie totale, du N°53 à 60 pour le groupe des plantes en hypoxie partielle). Ces résultats montrent qu'ils existent des groupes de métabolites qui ont répondu directement à l'hypoxie racinaire (chez le groupe des plantes en hypoxie totale), des groupes de métabolites qui ont répondu directement et indirectement à l'hypoxie racinaire (chez le groupe des plantes en hypoxie totale et en hypoxie partielle) et des groupes de métabolites qui ne sont pas affectés par l'hypoxie racinaire.

IV-2-3 Etudes de l'expression de gènes

L'étude de l'expression de gènes marqueurs du stress hypoxique racinaire, mAlaAT et GABA-T, dans les racines et la partie aérienne, montrent la surexpression de ces deux gènes chez les deux groupes, en hypoxie totale et en hypoxie partielle (figure IV.34), où l'expression de ces deux gènes est stimulée dans leur deux parties des racines, en hypoxie et en normoxie (split-root) comparés aux témoins.

IV-3 Discussion

Afin d'étudier l'effet du stress hypoxique racinaire sur le développement des plantes, soumises à ce stress d'une façon totale (hypoxie totale) ou partielle (hypoxie partielle), nous avons suivi le développement des plantes durant 7 semaines de stress.

Les résultats obtenus indiquent que les plantes en hypoxie partielle et les plantes en hypoxie totale, ont tendance à se développer plus rapidement que les plantes témoins ; cependant, contrairement aux plantes en hypoxie totale, qui commencent à perdre leur biomasse dès la 4ème semaine du stress, les plantes, en hypoxie partielle, continuent à se développer jusqu'à la 7ème semaine. Plusieurs espèces, sensibles à l'hypoxie racinaire, ont développé des mécanismes d'adaptation (Bailey-Serres et Voesenek, 2008) qui sont notamment associés à divers réactions physiologiques, biochimique et moléculaires, qui aboutissent à des changements des caractères anatomiques et morphologiques de la plante (Comstock, 2002 ; Colmer et Voesenek, 2009).

Au niveau métabolique, nos résultats ont montré que les plantes ont répondu au stress hypoxique racinaire par des modifications de leur métabolisme azoté dans leur partie racinaire et aérienne. Le système de « split-root » était réalisé pour essayer de mieux comprendre la relation entre ces deux parties des plantes et pour suivre leur comportement lorsqu'elles sont soumises au stress hypoxique racinaire d'une façon partielle. Les figures IV.35, IV.36, IV.37 et IV.38 montrent que la réponse des plantes (en « split-root »), à l'hypoxie racinaire, a été transmit dans les différentes parties des plantes, en modifiant leur métabolisme. D'autre part, le métabolisme carboné a été aussi affecté par ce stress et les niveaux des sucres détectés ont montré des changements significatifs (en « split root ») :

Comme les glucides constituent les principales réserves de carbone chez les plantes, la capacité à utiliser ces réserves pourraient être responsables de la survie des plantes dans des conditions de stress abiotique (Goggin et Colmer, 2007). Les quantités de sucres ont été analysées par réponse au stress hypoxique racinaire ; le saccharose, le glucose et le fructose sont les principaux sucres présents chez *« Medicago truncatula »*, et nos données ont montré une augmentation significative de ces sucres dans les racines et les parties aériennes, accompagnée d'une baisse significative de la concentration du raffinose. Les variations des concentrations de sucres semblent être associées à une augmentation de la croissance et une utilisation accélérée de sources d'énergie.

Cependant, malgré l'importance du carbone et l'azote dans la détermination de nombreux traits physiologiques et agronomiques (Iglesias et al., 2007), il y a peu d'information concernant l'influence de l'hypoxie racinaire sur leur consommation, transport et distribution.

Récemment, l'attention a également été porté sur les mécanismes de transduction du signal conduisant à ces réponses (Arbona et Gomez Cadenas, 2008 ; Rodriguez-Gamir et al., 2011).
En fait, l'hypoxie racinaire a une conséquence immédiate sur la production d'ATP à cause de la diminution de la disponibilité d'oxygène ; pour compenser cet effet, la plante doit générer du NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide, pouvoir oxydant) par d'autres voies alternatives sans utiliser l'oxygène (Drew, 1997) en induisant les gènes impliqués dans la glycolyse et la fermentation pour assurer le passage de la respiration aérobie à la fermentation (Peng et al., 2001). Beaucoup de métabolites identifiées par GC-MS chez *« Medicago truncatula »*, en hypoxie racinaire, sont impliquées dans la glycolyse, la fermentation et le métabolisme des glucides primaires ; ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré que les enzymes métaboliques impliquées dans ces mécanismes sont stimulées (Chang et al., 2000), comme 1'alcool déshydrogénase (ADH), l'énolase et la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPD) et le pyruvate décarboxylase (PDC). La glycolyse, liée principalement à l'éthanol et à la fermentation du lactate, représente le principal moyen pour recycler le NADH, nécessaire pour maintenir le mécanisme de la glycolyse et la production d'ATP ; cependant, la fermentation alcoolique est également importante pour la production d'énergie dans des conditions anaérobiques. Par conséquent, il existe ces deux principales stratégies métaboliques pour compenser la baisse d'oxygène, mais toutefois, ces stratégies ne peuvent être que transitoires et ne seront jamais suffisantes pour maintenir les niveaux d'ATP dans les normes, à long terme sous stress hypoxique racinaire d'où la mort des plantes observée dans nos résultats au bout de la 7ème semaine.

Les études récentes se focalisent plus sur la compréhension des mécanismes de communication, reliant la partie aérienne et la partie racinaire de la plante. Dans ce contexte, il est important d'évoquer que les changements dans le niveau d'ATP pourraient servir comme signal pour la suite des réponses adaptatives de la plante par réponse à ce stress. En outre, chez les plantes, l'adénine nucléotidique joue un rôle clé dans la régulation de la signalisation intracellulaire et extracellulaire et peut réguler l'activité des canaux ioniques (Lew et Dearnaley, 2000 ; Tang et al., 2003) ; cependant, à ce jour, la seule preuve de la signalisation de l'ATP en condition d'hypoxie racinaire reste sa régulation de l'expression du gène d'hémoglobine (Hill, 1998).
Nos résultats ont montré que la réponse de la plante soumise au stress hypoxique racinaire était transmise de la partie racinaire vers la partie aérienne (qui sont en normoxie) ; d'autre part, le message est transmis ensuite, de la partie aérienne vers la partie racinaire qui est en normoxie (système de split-root) et donc la réponse à l'hypoxie racinaire est une réponse

spécifique caractérisée par la transmission d'un signal à travers toute la plante et qui pourrait être sous différentes formes (Voesenek et al., 1993 ; Lorbiecke et al., 1999) : Plusieurs régulateurs de croissance et d'autres molécules de signalisation pourraient y intervenir.

L'éthylène : sa synthèse augmente rapidement (au bout de 4 h) sous hypoxie racinaire (Drew et al., 1979 ; Lorbiecke et Sauter, 1999) ; l'augmentation de la production d'éthylène, sous hypoxie racinaire, est induite par l'accumulation d'ACC et la forte activité d'ACC synthase (kende, 1993 ; Olson et al., 1995) ; En fait, l'ACC est synthétisé puis transporté vers la partie aérienne sous stress hypoxique (Shiu et al., 1998), une fois dans les feuilles, il est converti par l'ACC oxydase en éthylène (Kathiresan et al., 1997) ; mais la biosynthèse de l'éthylène sera ensuite inhibée, car la conversion de l'ACC en éthylène par l'ACC oxydase nécessite de l'oxygène (Peng et al., 2001).

D'autre part, ils existent d'autres molécules qui jouent un rôle très important dans la signalisation du stress hypoxique, des racines vers la partie aérienne des plantes, comme l'acide abscissique (ABA), l'acide gibbérellique (GA), l'auxine (AIA) et les cytokinines (CK) : Sous stress hypoxique, la concentration foliaire d'ABA augmente d'une façon transitoire et elle est doublée dans la sève (Newman and Smit, 1991). Bien qu'il existe plusieurs rapports entre l'accumulation de l'ABA et la réponse à l'hypoxie racinaire, il y a d'autres études qui suggèrent le contraire ; par exemple, chez Arabidopsis, les niveaux endogènes de l'ABA sont restés inchangés et chez le riz, ils diminuent sous stress hypoxique (De Bruxelles et al., 1996 ; Azuma et al., 1995) et les niveaux élevés d'ABA appliqué d'une manière exogène (Hoffmann-Benning et Kende, 1992) réduisent la croissance des feuilles chez *« Ranunculus sceleratus »* (Smulders et Horton, 1991) et *« Potamogeton pectinatus »* (Summers et Jackson, 1996). Le rôle de l'acide gibbérellique dans la stimulation de la croissance des feuilles est bien établi (Rademacher, 2000 ; Rijnders et al., 1997), d'autres études montrent la relation entre l'augmentation de la concentration de l'acide gibbérellique et la sensibilité à l'éthylène pendant le stress hypoxique (Raskin and Kende, 1984). Cependant, la réponse peut varier selon les espèces, comme chez *« Rumex acetosa »*, les niveaux de l'acide gibbérellique restent inchangés, bien que ceux de l'éthylène augmentent au cours de l'hypoxie racinaire (He et al., 1996). L'implication de l'auxine dans la réponse au stress hypoxique a été également démontré par l'augmentation transitoire des niveaux de transcrits de deux gènes sensibles à l'auxine pendant le traitement à l'hypoxie racinaire (IAA2, IAA3) (Klok et al., 2002 ; Visser et al., 1996). Enfin, les cytokinines peuvent également participer à la signalisation (cross-talk) lors de la réponse au stress hypoxique comme il a été démontré chez le tournesol où le tau de cytokinines dans la sève brute est considérablement réduit après 24 heures d'hypoxie racinaire

(Burrows and Carr, 1969), cela par la baisse de la concentration d'oxygène dans la zone de production de cytokinines, le méristème apical racinaire (Zhang et al., 2000).

En fin, un rôle très important du NO, par réponse à l'hypoxie racinaire, a été bien identifié par des études ultérieures, qui ont démontré son implication dans la transduction du signal de cytokinines qui est, à son tour, impliqué dans la régulation de la tolérance au stress hypoxique (Zhang et al., 2000 ; Libourel et al., 2006). NO présente également des étapes communes dans la voie de transduction du signal de l'AIA (Gouvêa et al., 1997). Cependant, le NO a été récemment identifié comme une composante du réseau de signalisation d'ABA, impliqué dans la régulation stomatique (Garcia-Mata et Lamattina, 2002 ; Neill et al., 2002). Malgré, l'importance du NO dans la réponse à l'hypoxie chez les plantes, il n'existe pas beaucoup d'informations sur son rôle exact.

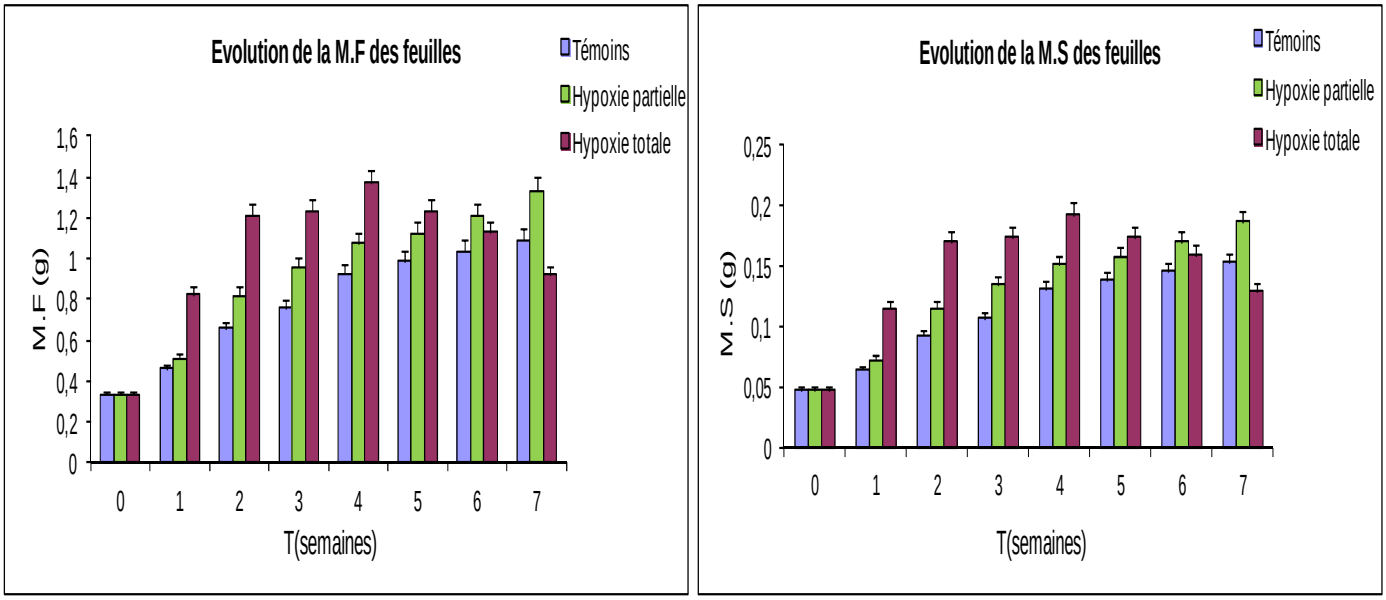


Figure IV.1 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche et sèche de la partie aérienne chez les plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

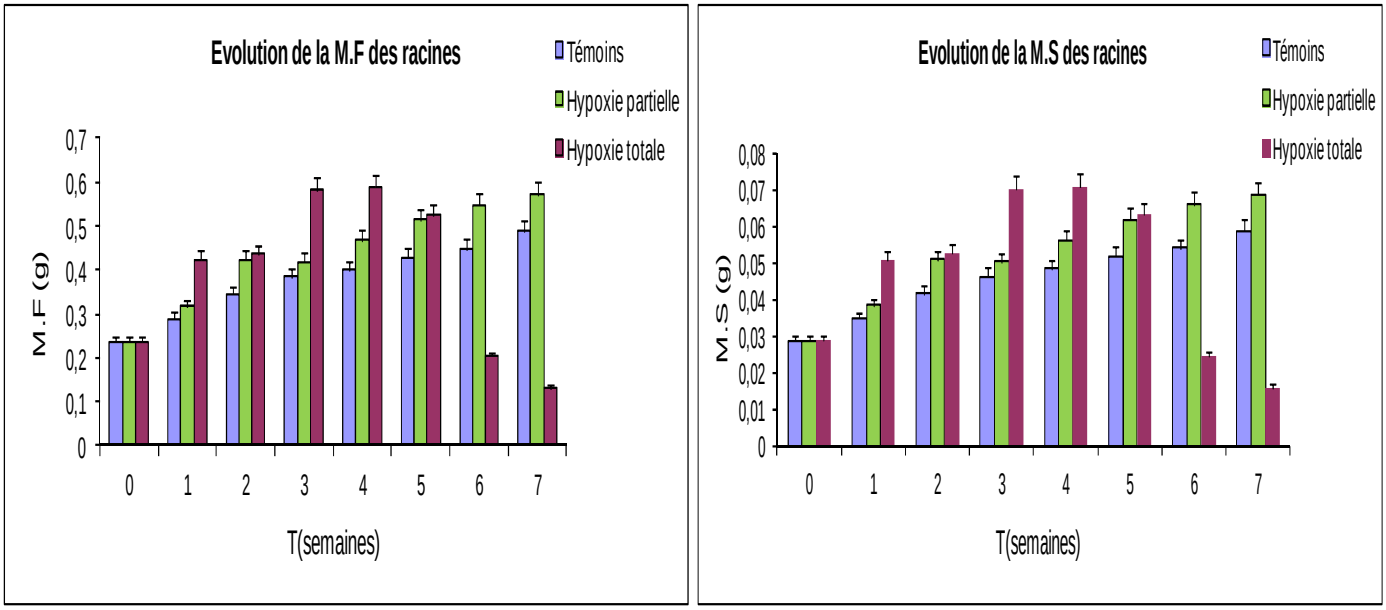


Figure IV.2 : Graphes d'évolution de la biomasse en matière fraiche et sèche de la partie racinaire chez les plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

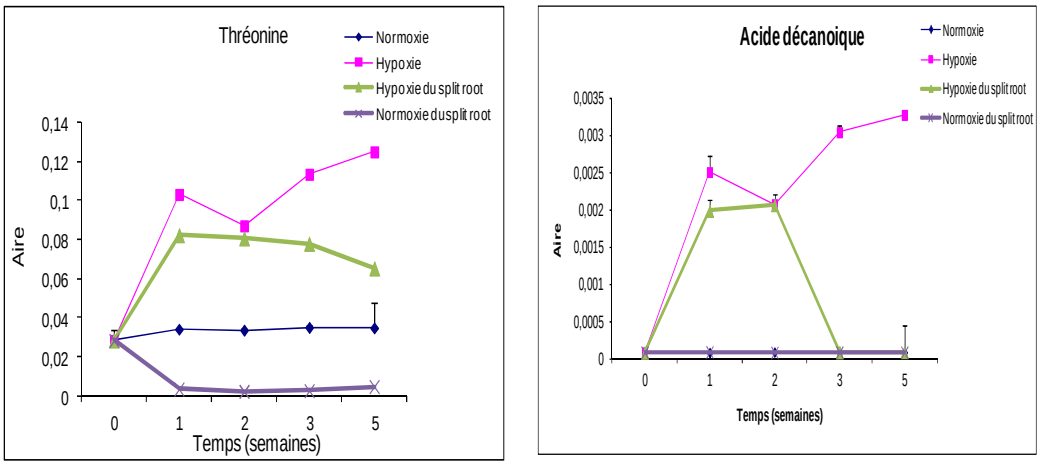


Figure IV.3 : Graphes d'évolution de la thréonine et de l'acide décanoïque dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

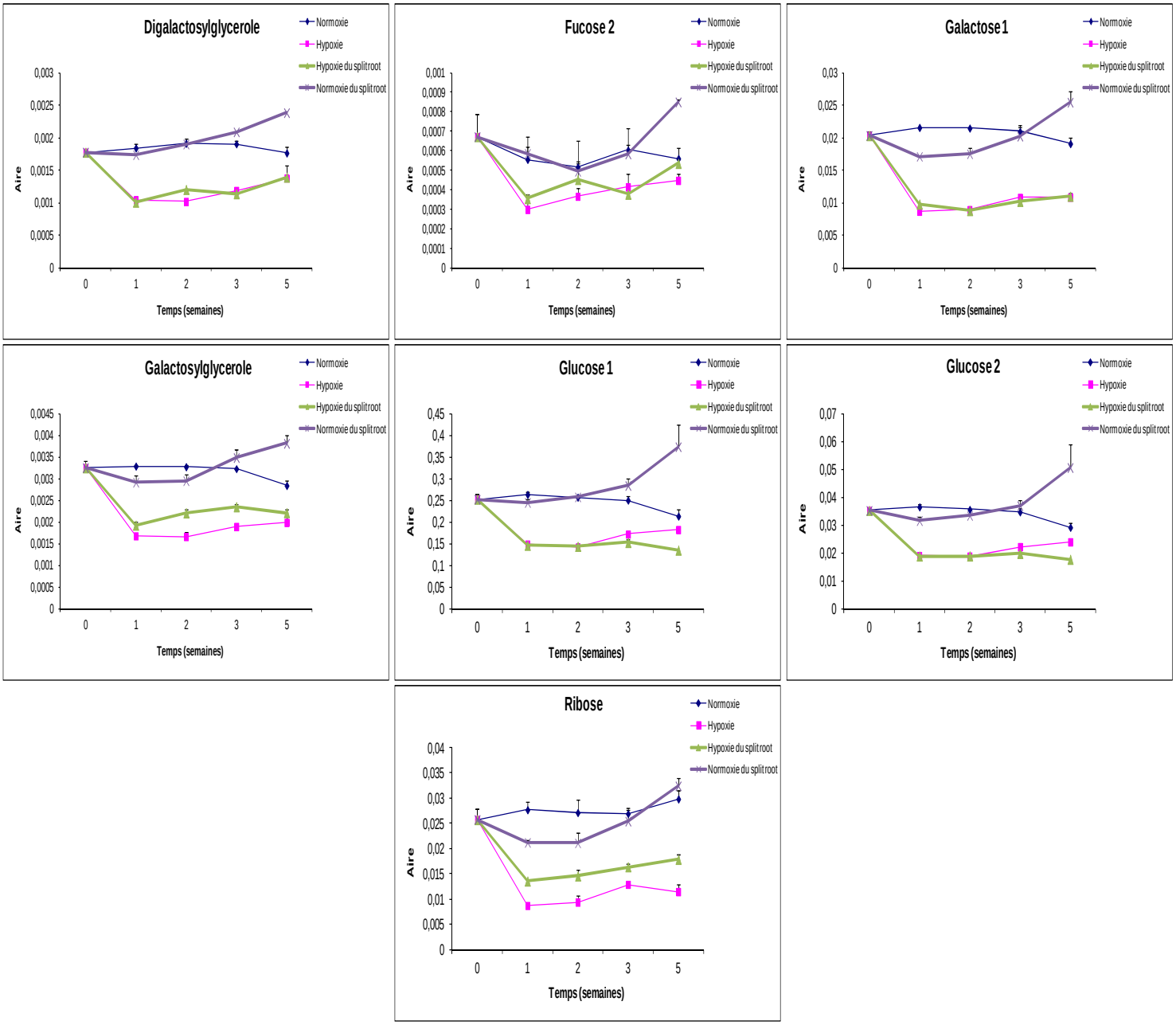


Figure IV.4 : Graphes d'évolution du digalactosylglycérole, fucose 1, galactose 1, galactosylglycérole, glucose 1 et 2 et du ribose dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

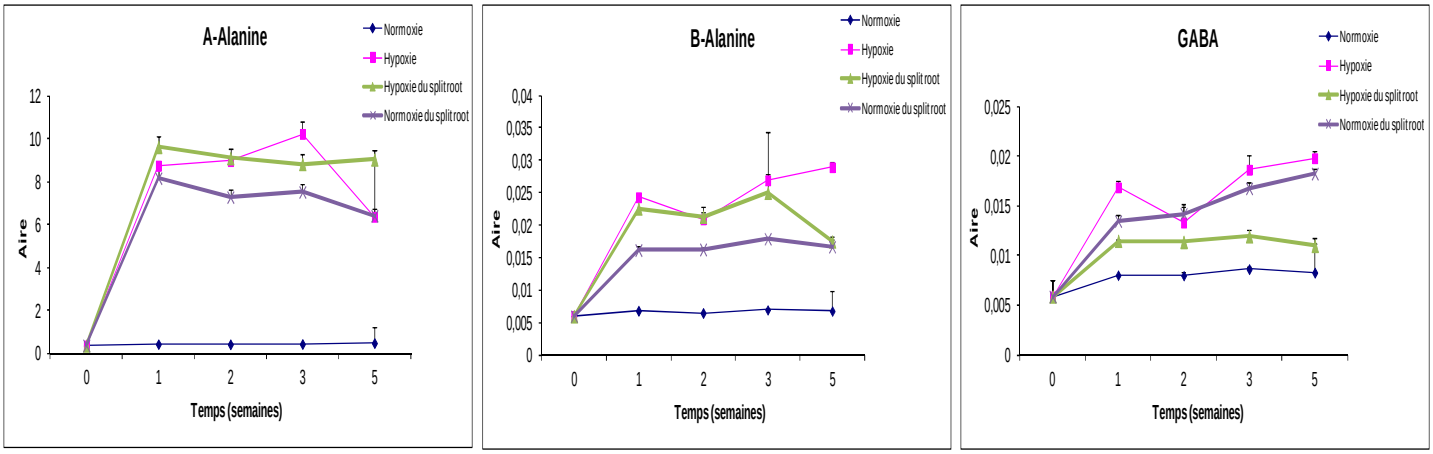
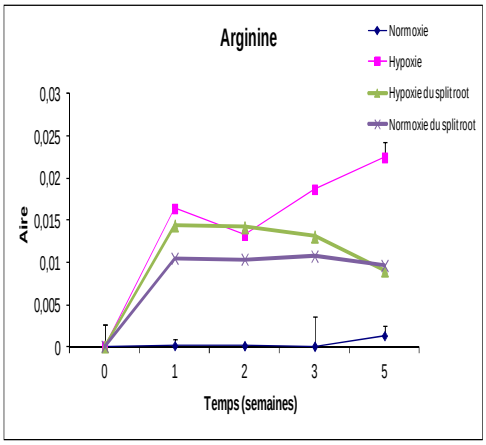
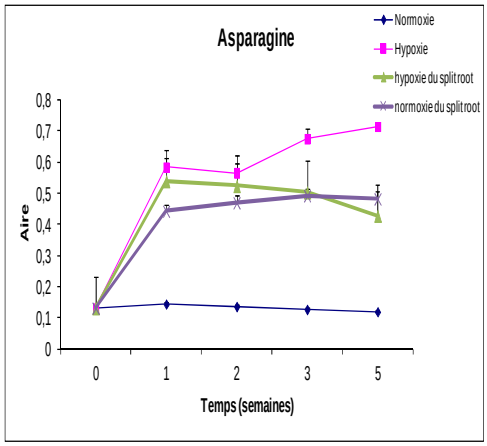
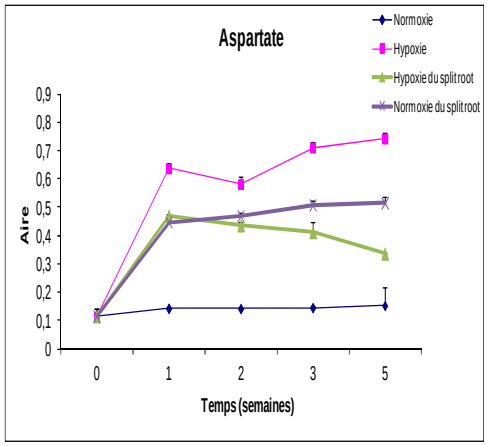
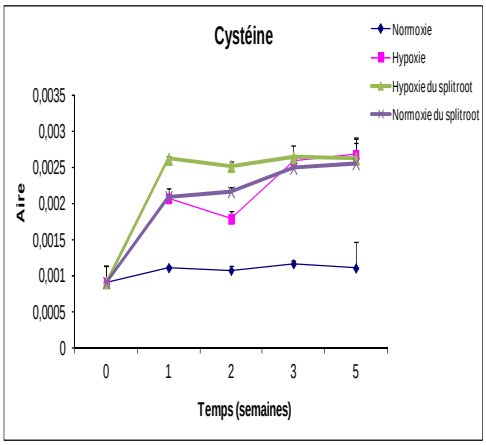


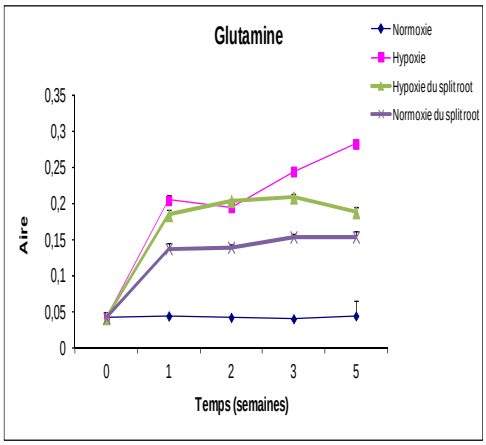
Figure IV.5 : Graphes d'évolution de l'alanine (alfa et beta) et du gaba dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

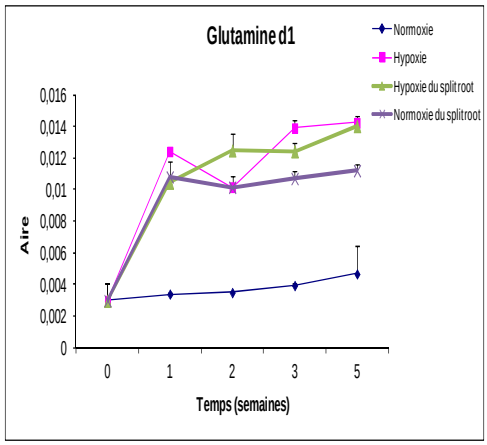

Arginine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

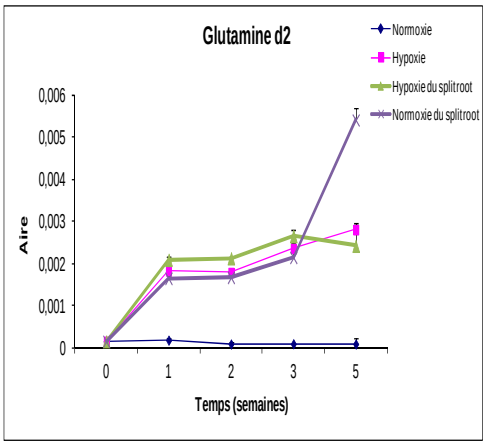

Asparagine
Normoxie
Hypoxie
hypoxie du splitroot
normoxie du splitroot
Aire
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

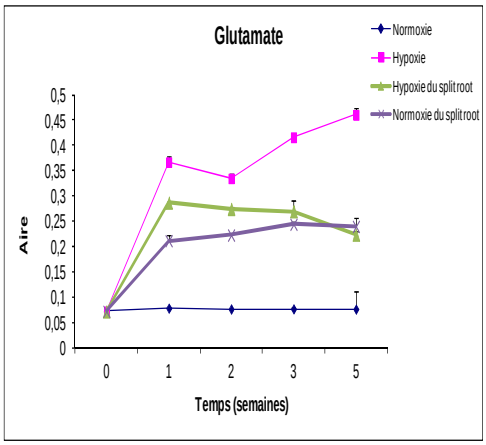

Aspartate
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

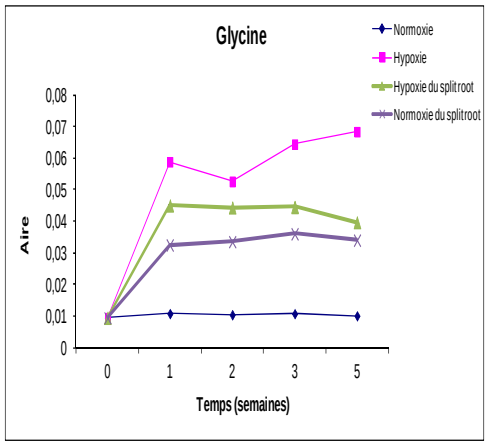

Cystéine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,0035
0,003
0,0025
0,002
0,0015
0,001
0,0005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

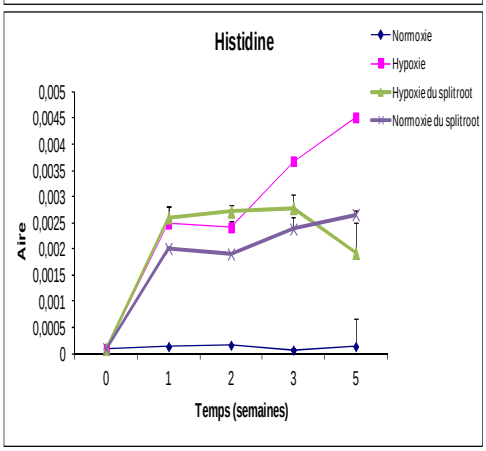

Glutamine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

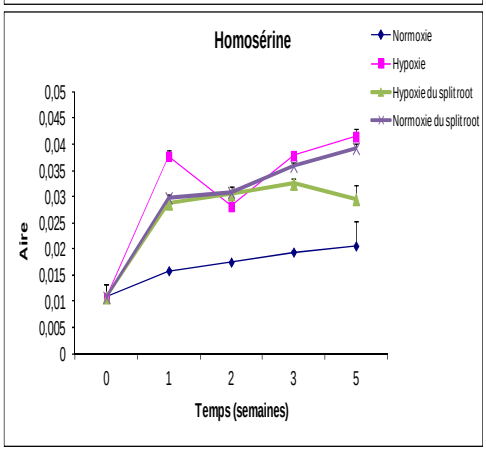

Glutamine d1
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,016
0,014
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

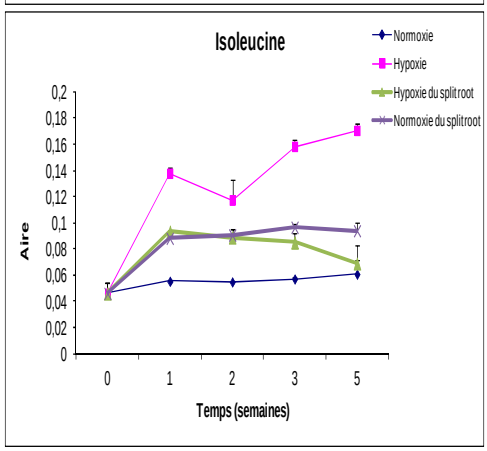

Glutamine d2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,006
0,005
0,004
0,003
0,002
0,001
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Glutamate
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,5
0,45
0,4
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Glycine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Histidine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,005
0,0045
0,004
0,0035
0,003
0,0025
0,002
0,0015
0,001
0,0005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Homosérine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,05
0,045
0,04
0,035
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Isoleucine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
0,2
0,18
0,16
0,14
0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

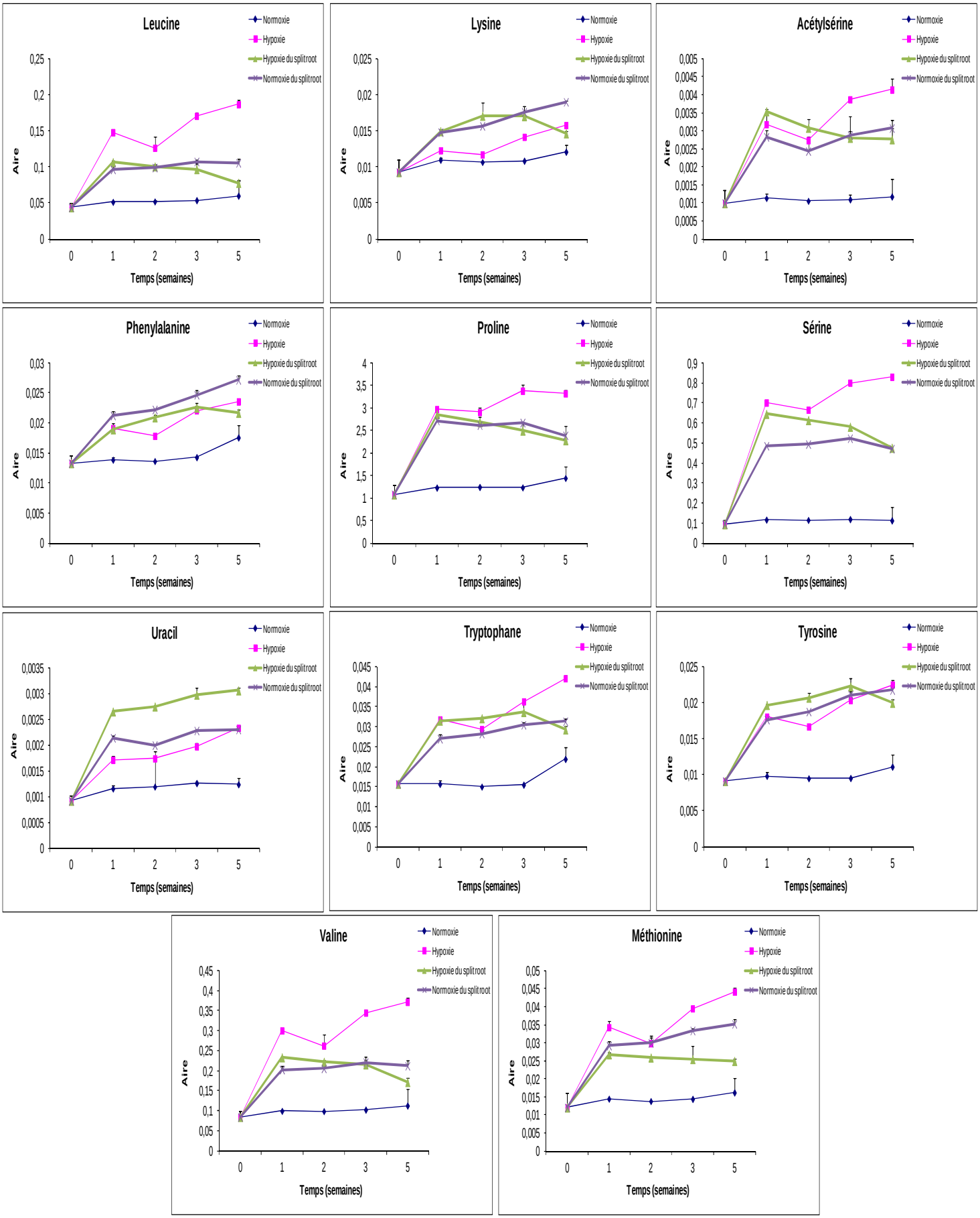


Figure IV.6 : Graphes d'évolution des différents acides aminés accumulés dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» comparés aux « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

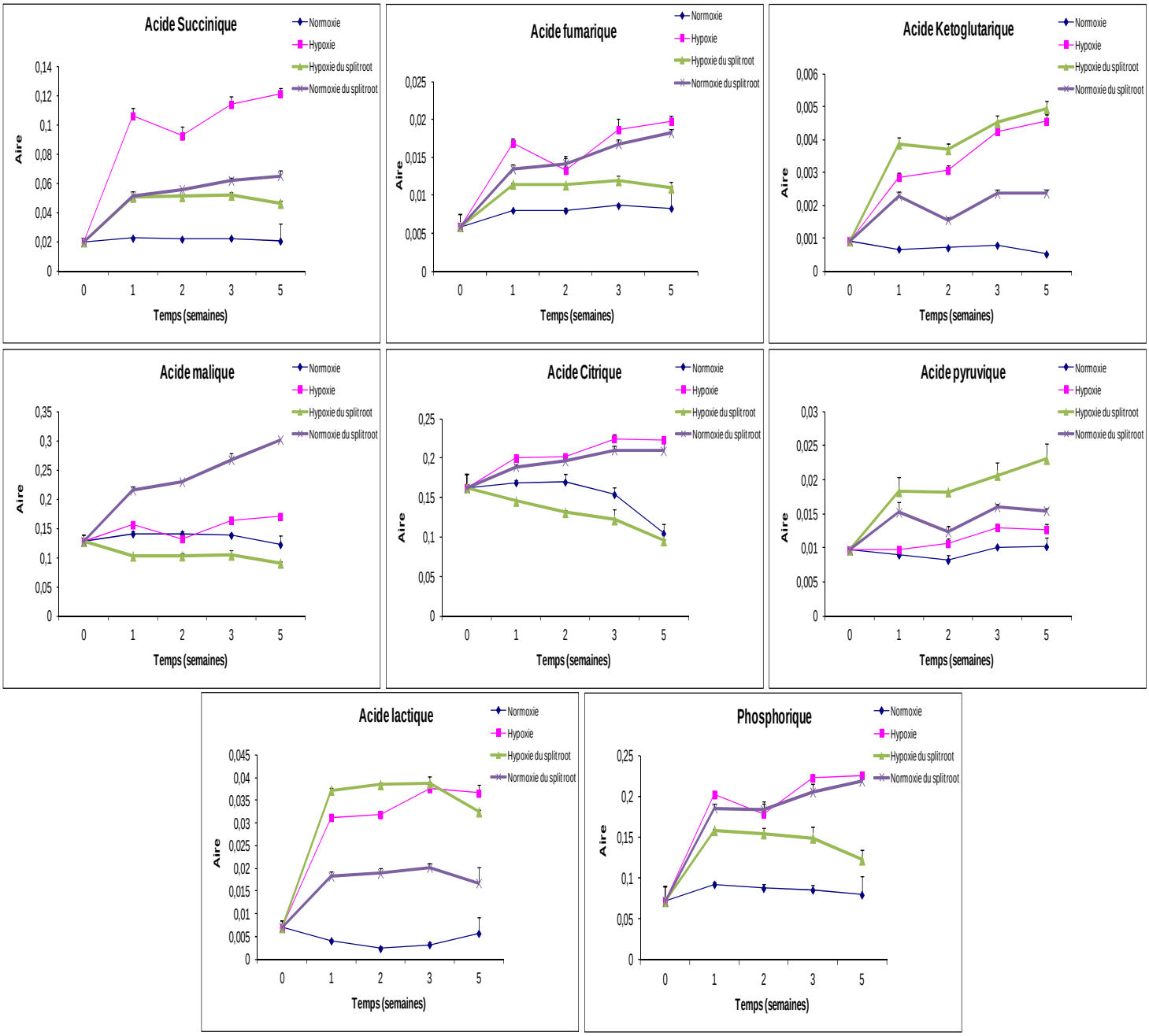


Figure IV.7 : Graphes d'évolution de racinaire l'acide succinique, l'acide fumarique, l'acide kétoglutarique, l'acide malique, l'acide citrique, l'acide pyruvique, l'acide lactique et le phosphorique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

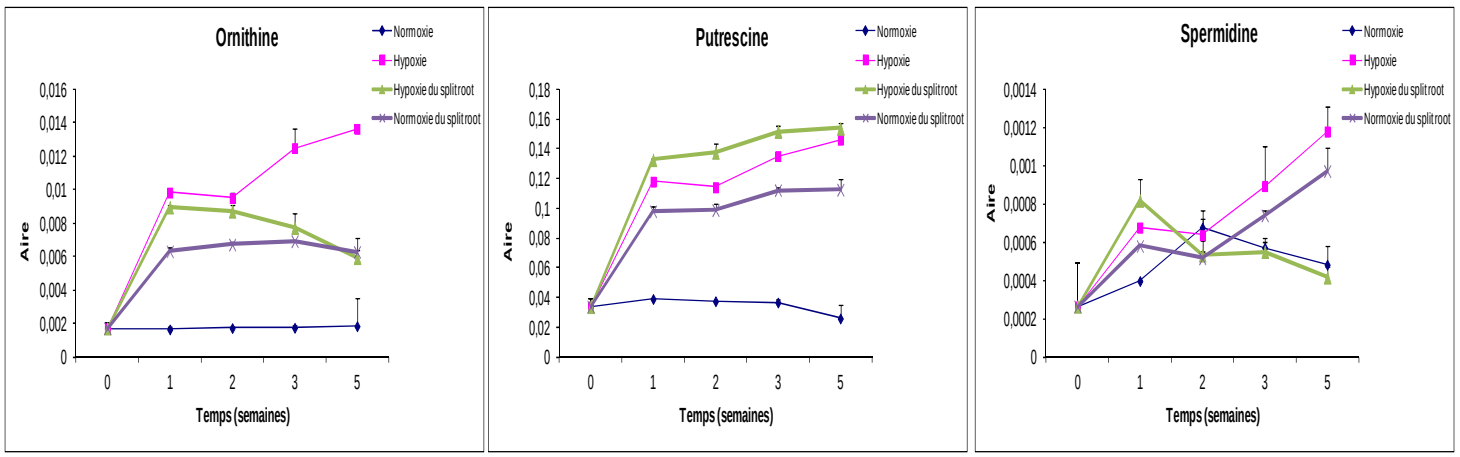
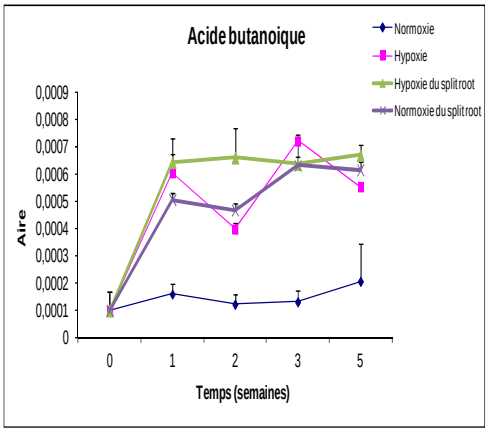
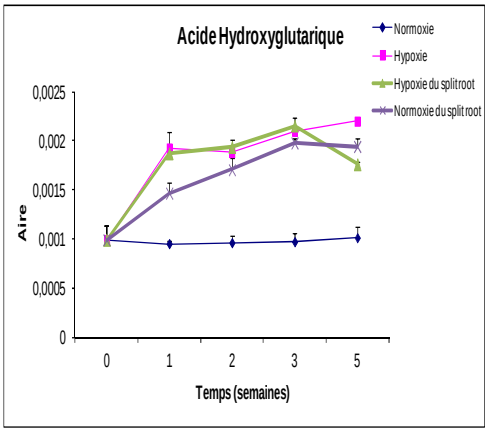
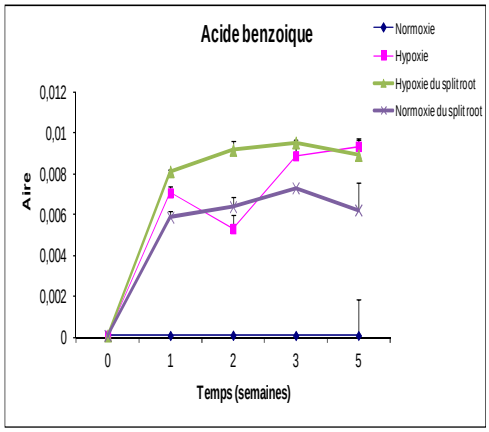
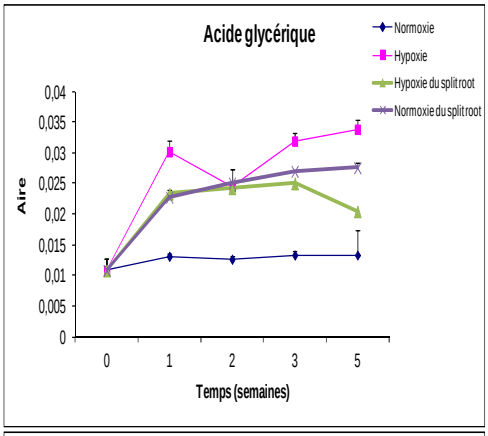


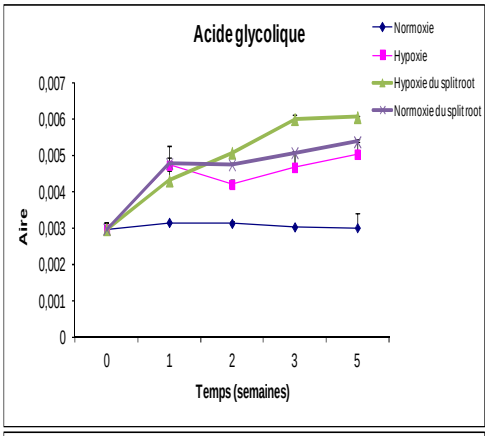
Figure IV.8 : Graphes d'évolution d'ornithine, spermidine et putrescine, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

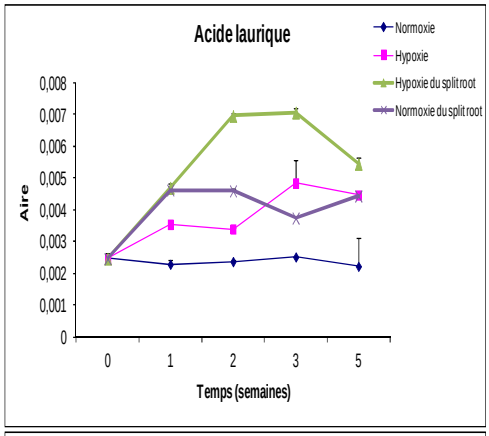

Acide butanoique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

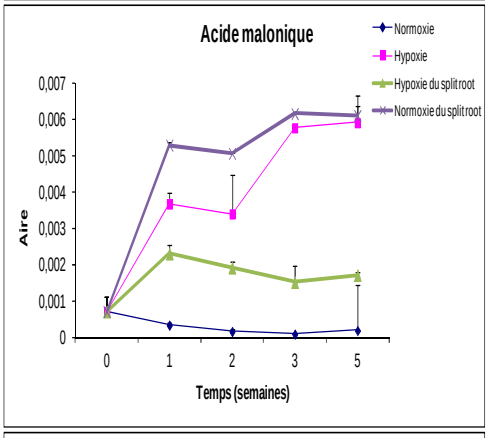

Acide Hydroxyglutarique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

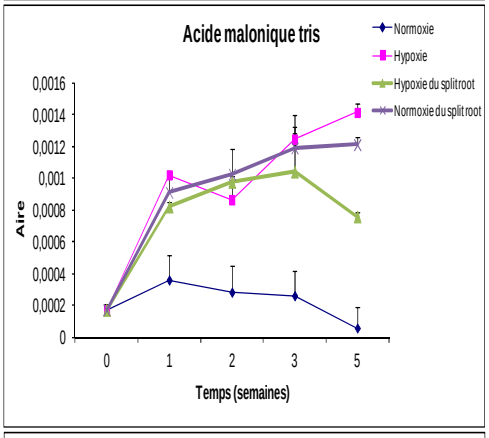

Acide benzoique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

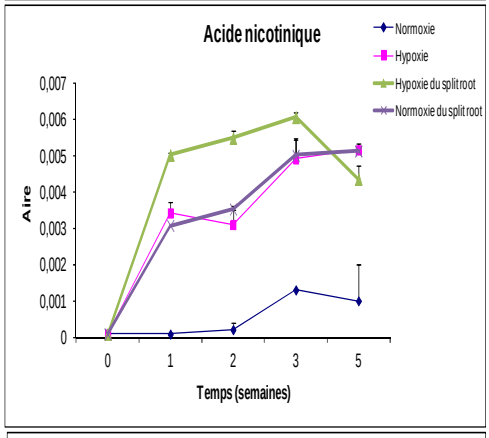

Acide glycérique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

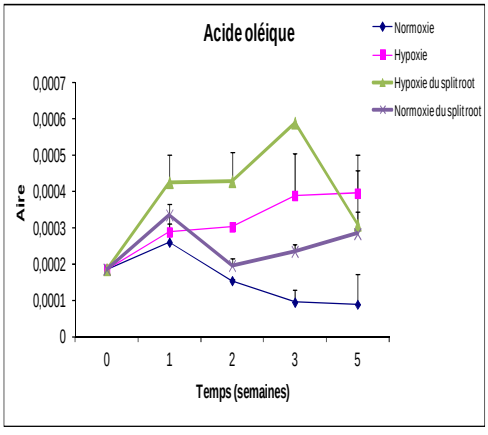

Acide glycolique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

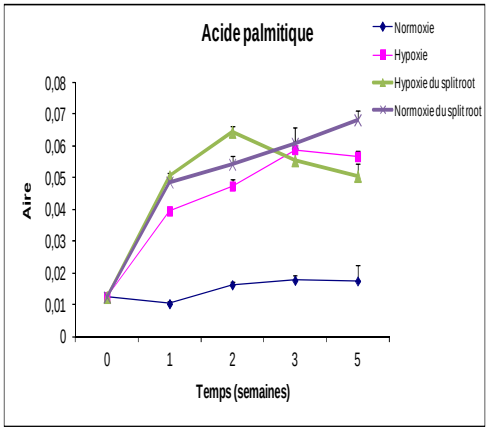

Acide laurique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

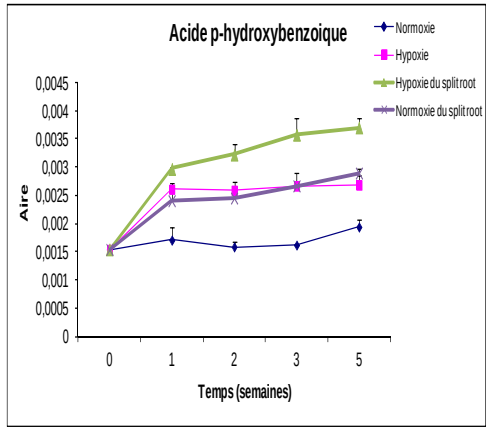

Acide malonique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Acide malonique tris
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Acide nicotinique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Acide oléique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Acide palmitique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Acide p-hydroxybenzoique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

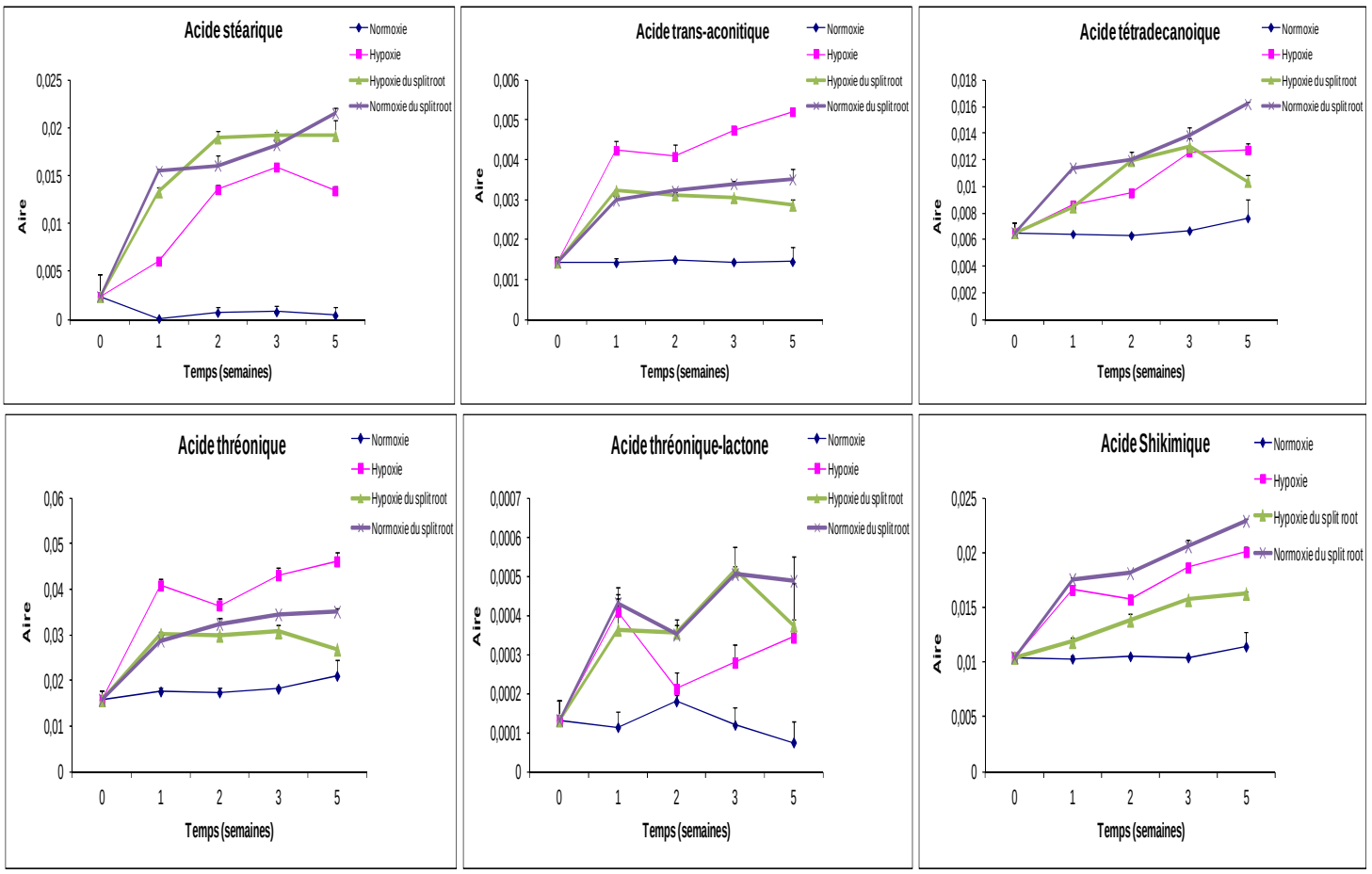


Figure IV.9 : Graphes d'évolution de l'acide butanoïque, l'acide hydroxyglutarique, l'acide benzoïque, l'acide glycérique, l'acide glycolique, l'acide laurique, l'acide malonique, l'acide malonique tris, l'acide nicotinique, l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide P-OH benzoïque, l'acide stéarique, l'acide trans-aconitique, l'acide tétradécanoïque, l'acide thréonique, l'acide thréonique-lactone et l'acide shikimique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

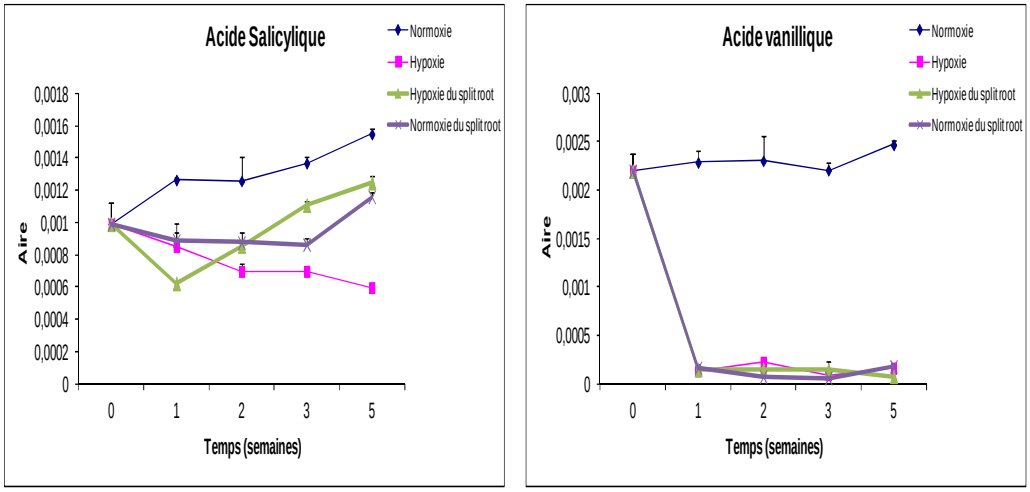
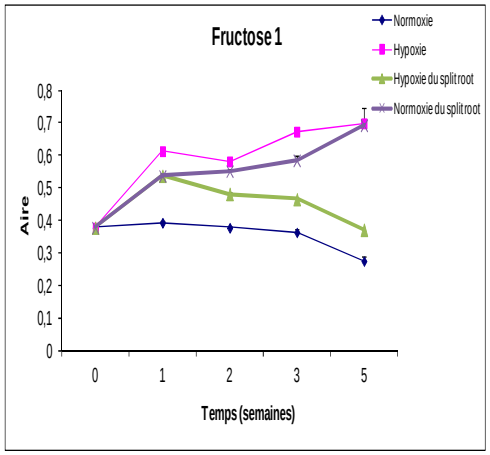
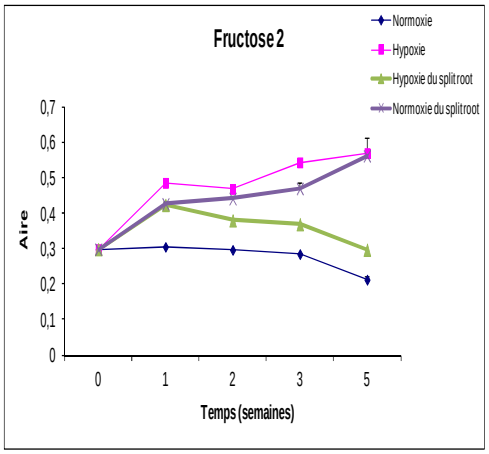
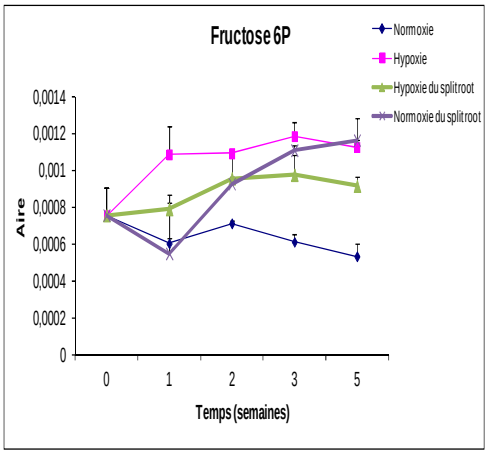
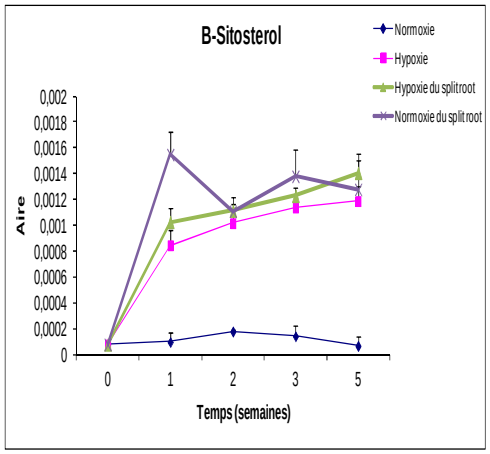


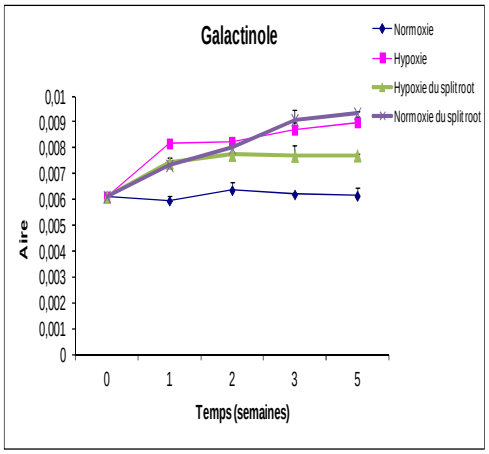
Figure IV.10 : Graphes d'évolution de l'acide vanillique et l'acide salicylique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

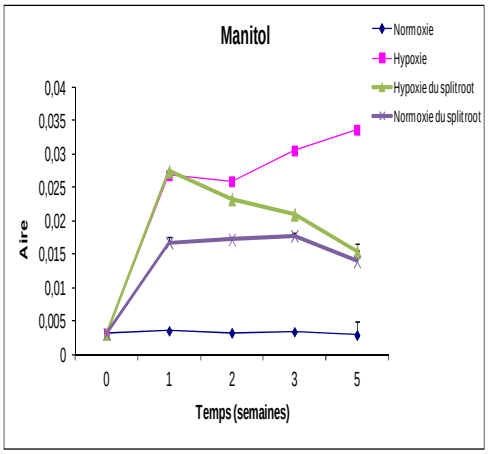

Fructose 1
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

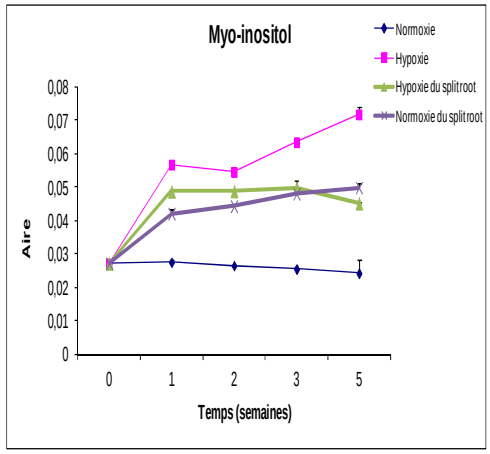

Fructose 2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

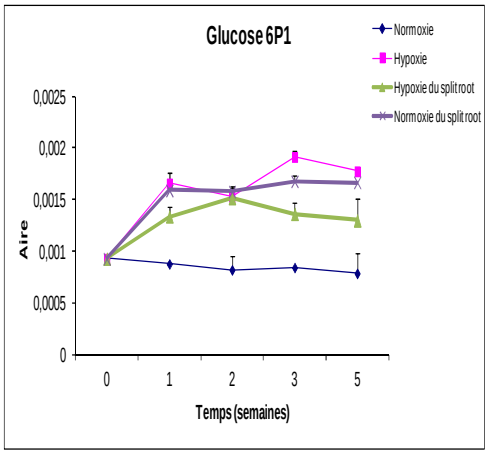

Fructose 6P
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

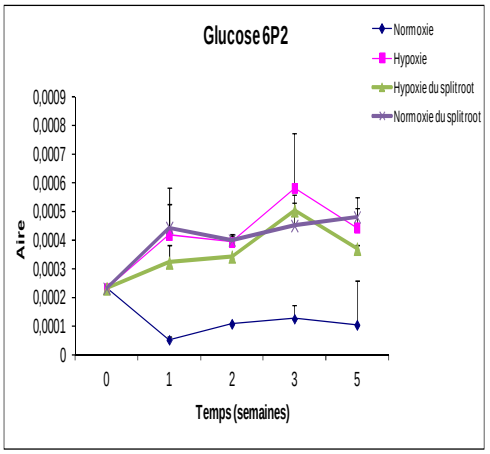

B-Sitosterol
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

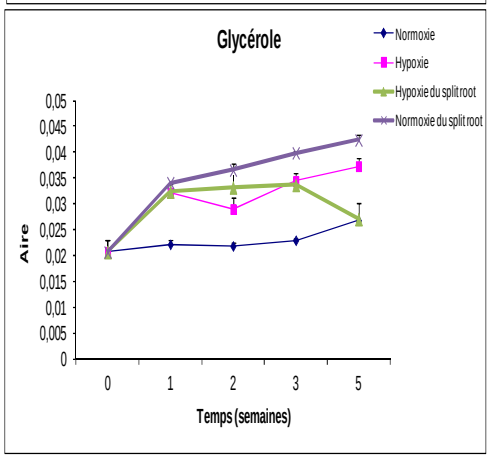

Galactinole
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

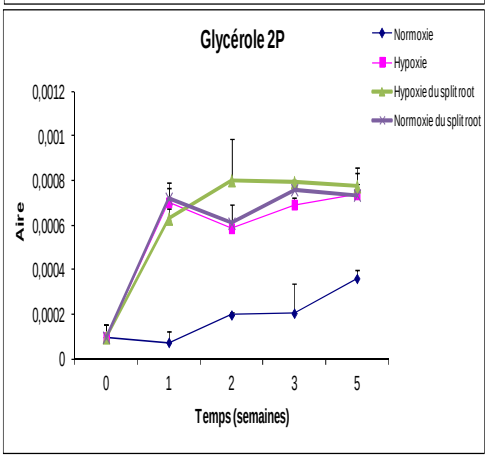

Manitol
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

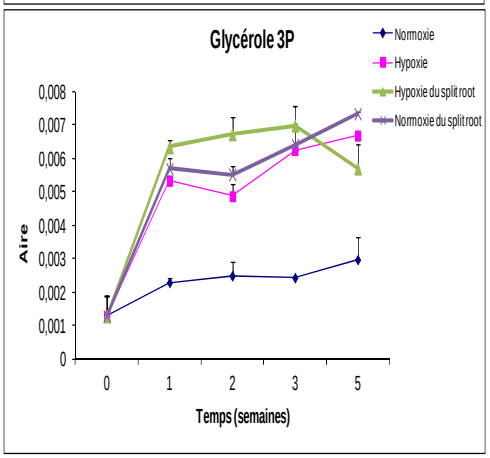

Myo-inositol
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Glucose 6P1
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Glucose 6P2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Glycérole
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Glycérole 2P
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Glycérole 3P
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Normoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

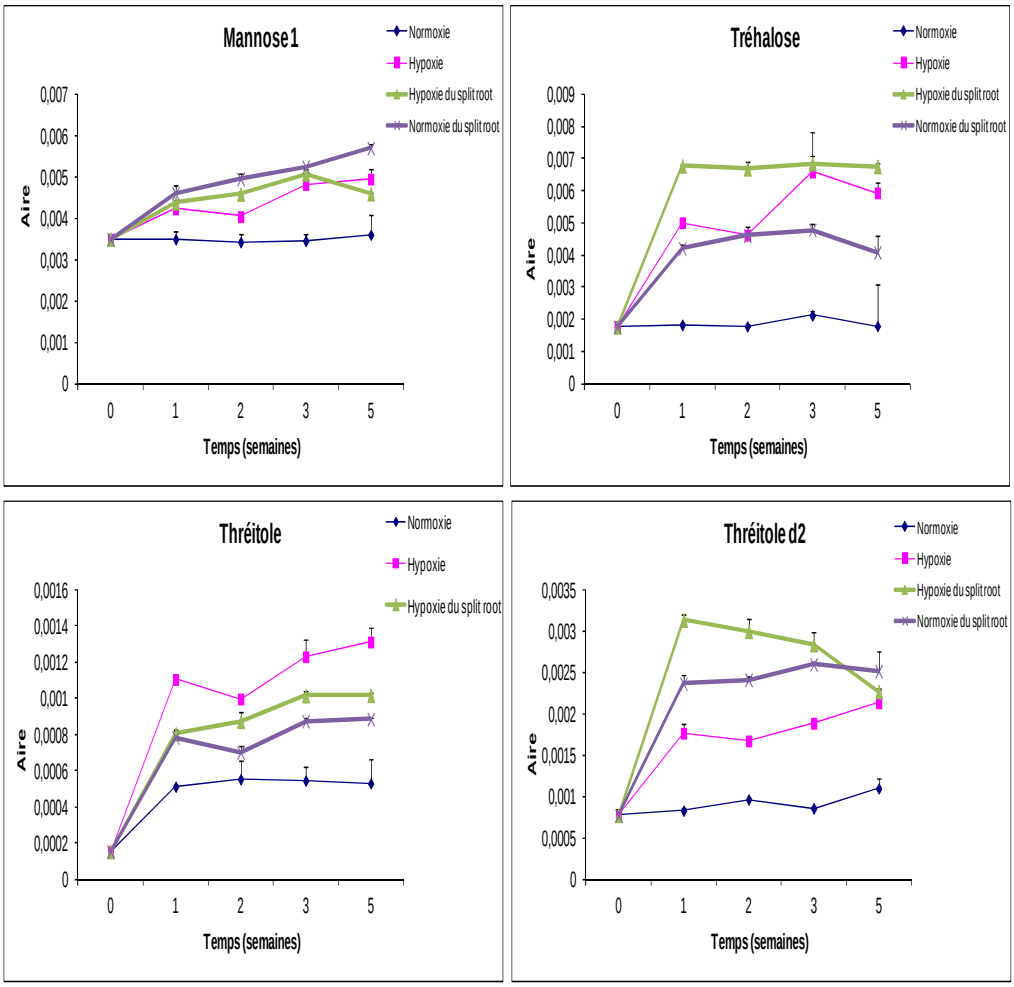


Figure IV.11 : Graphes d'évolution du fructose 1, fructose 2, fructose 6P, B-sitostérol, galactinole, mannitol, myo-inositol, glucose 6P1, glucose 6P2, glycérol, glycérol 2P, glycérol 3P, mannose 1, tréhalose, thréitole et thréitole d2, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

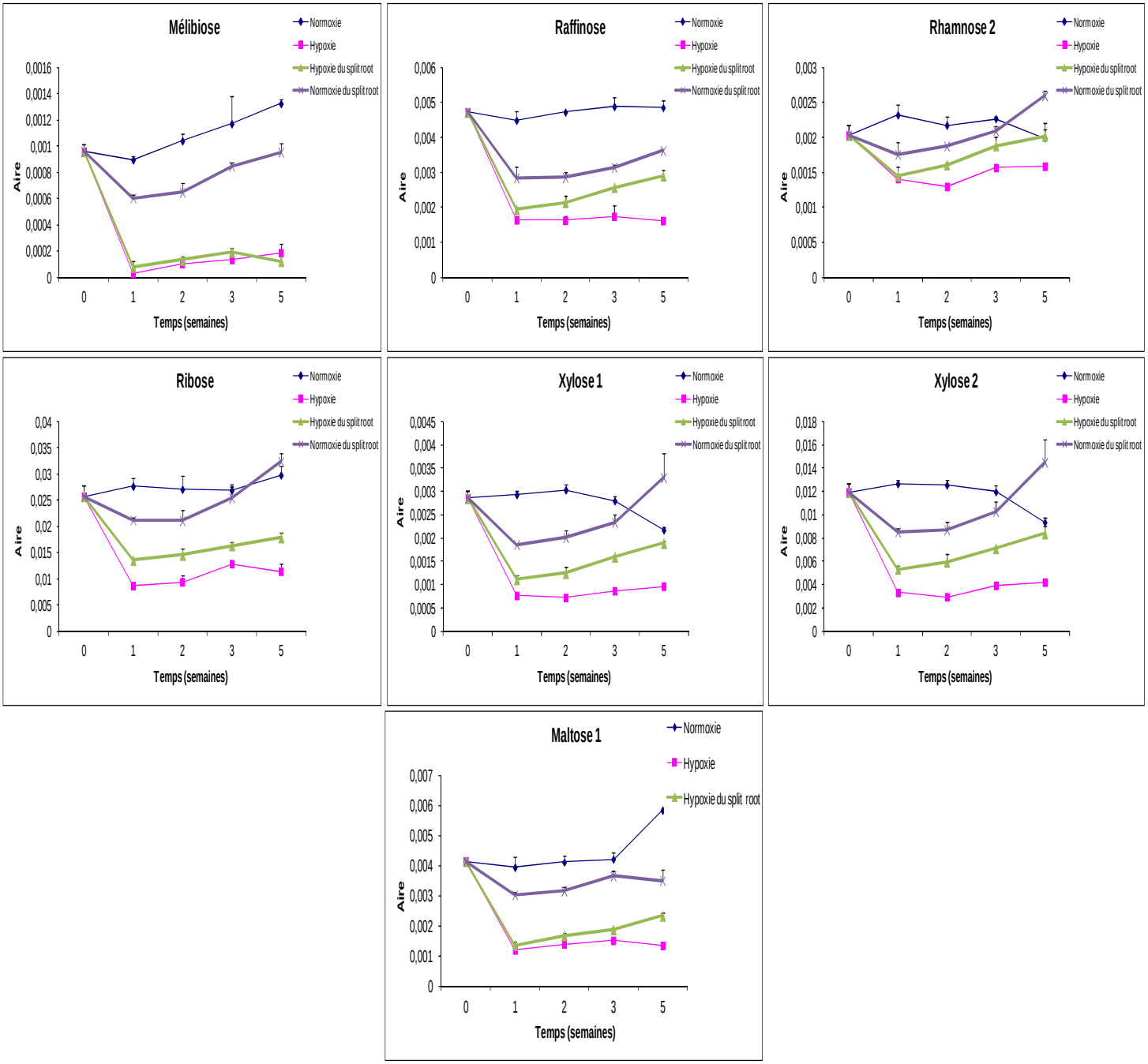


Figure IV.12 : Graphes d'évolution du mélibiose, raffinose, rhamnose, ribose, xylose 1 et 2 et du maltose 1, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

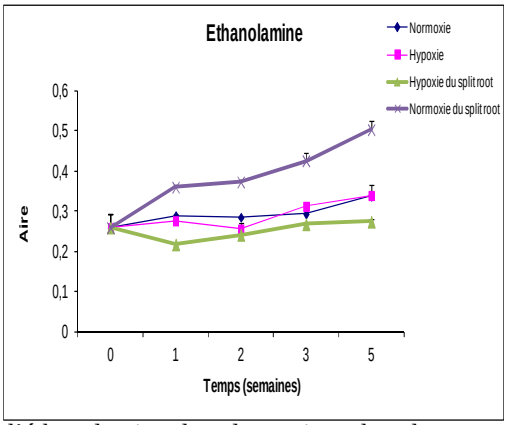


Figure IV.13 : Graphe d'évolution d'éthanolamine dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

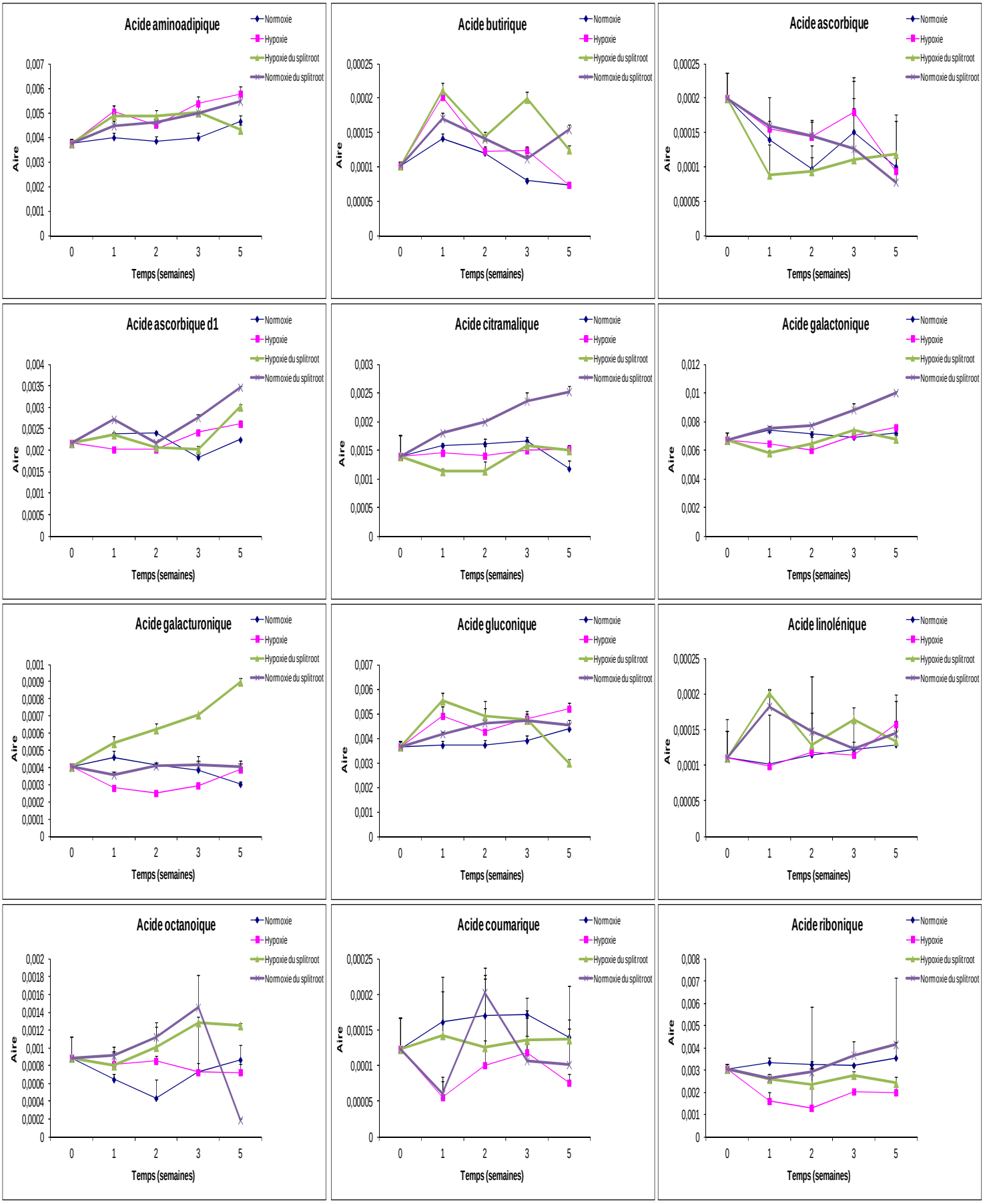


Figure IV.14 : Graphes d'évolution de l'acide aminoadipique, l'acide butirique, l'acide ascorbique, l'acide ascorbique d1, l'acide citramalique, l'acide galactonique, l'acide galacturonique, l'acide gluconique, l'acide linolénique, l'acide octanoïque, l'acide coumarique et l'acide ribonique, dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle ou 10% » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

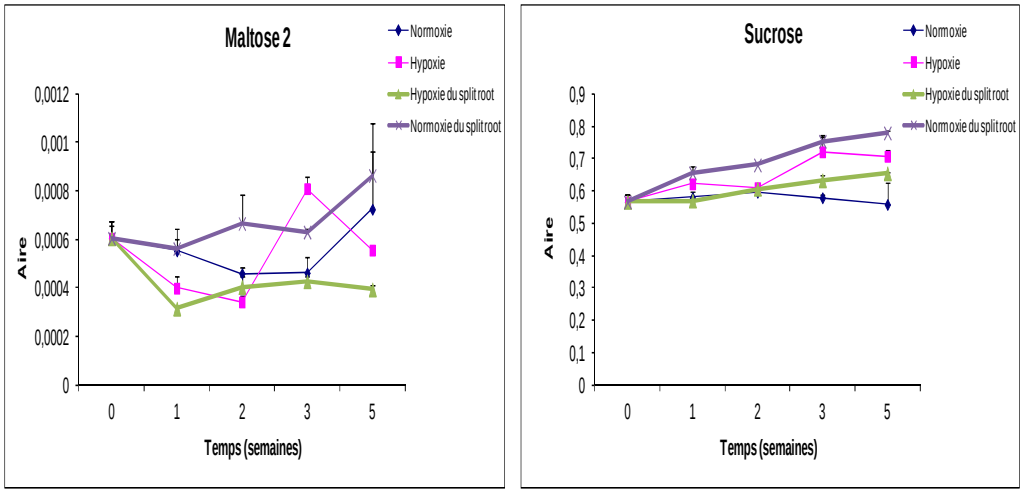


Figure IV.15 : Graphes d'évolution du maltose et du sucrose dans les racines des plantes en « hypoxie totale», « hypoxie partielle ou 10% » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

a) Racines

N°	Nom tube	Condition
1	R1T0	Normoxie
2	R2T0	Normoxie
3	R1T1	Normoxie
4	R2T1	Normoxie
5	R1T2	Normoxie
6	R2T2	Normoxie
7	R1T3	Normoxie
8	R2T3	Normoxie
9	R1T5	Normoxie
10	R2T5	Normoxie
11	R1H1	Hypoxie totale
12	R2H1	Hypoxie totale
13	R1H2	Hypoxie totale
14	R2H2	Hypoxie totale
15	R1H3	Hypoxie totale
16	R2H3	Hypoxie totale
17	R1H5	Hypoxie totale
18	R2H5	Hypoxie totale
19	R1H1H	Hypoxie
20	R2H1H	Hypoxie
21	R1H2H	Hypoxie
22	R2H2H	Hypoxie
23	R1H3H	Hypoxie
24	R2H3H	Hypoxie
25	R1H5H	Hypoxie
26	R2H5H	Hypoxie
27	R1H1N	Normoxie
28	R2H1N	Normoxie
29	R1H2N	Normoxie
30	R2H2N	Normoxie
31	R1H3N	Normoxie
32	R2H3N	Normoxie
33	R1H5N	Normoxie
34	R2H5N	Normoxie

b) Feuilles

N°	Nom tube	Condition
35	F1T0	Normoxie
36	F2T0	Normoxie
37	F1T1	Normoxie
38	F2T1	Normoxie
39	F1T2	Normoxie
40	F2T2	Normoxie
41	F1T3	Normoxie
42	F2T3	Normoxie
43	F1T5	Normoxie
44	F2T5	Normoxie
45	F1H1	Hypoxie totale
46	F2H1	Hypoxie totale
47	F1H2	Hypoxie totale
48	F2H2	Hypoxie totale
49	F1H3	Hypoxie totale
50	F2H3	Hypoxie totale
51	F1H5	Hypoxie totale
52	F2H5	Hypoxie totale
53	F1H1H	Hypoxie
54	F2H1H	Hypoxie
55	F1H2H	Hypoxie
56	F2H2H	Hypoxie
57	F1H3H	Hypoxie
58	F2H3H	Hypoxie
59	F1H5H	Hypoxie
60	F2H5H	Hypoxie

Tableau IV.1 : listes des échantillons (a : racines et b : feuilles) avec le numéro, le nom et la condition expérimentale correspondante.

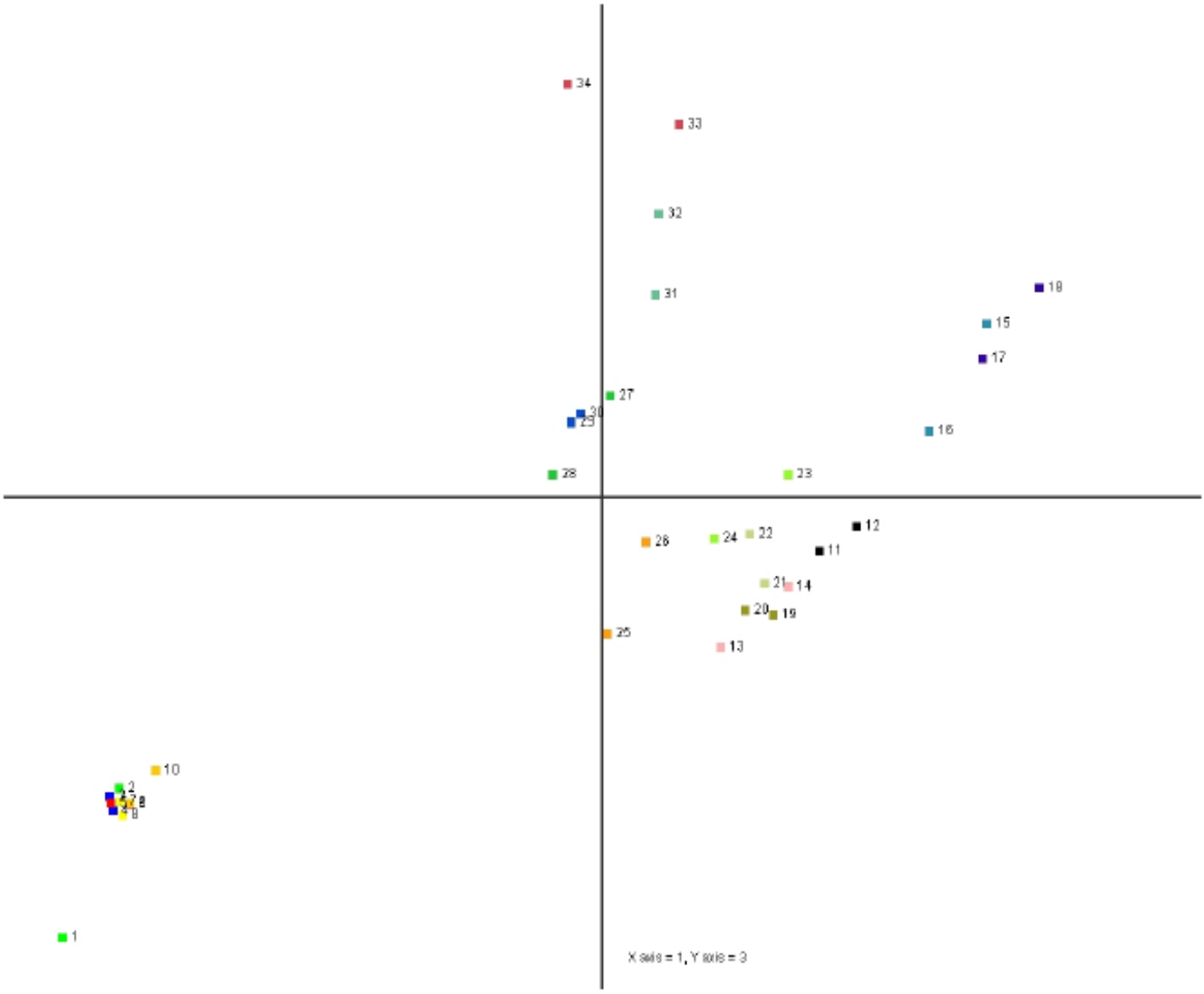


Figure IV.16 : Projection des échantillons des racines des deux groupes, en hypoxie totale et en hypoxie partielle, sur les axes de l'ACP et leur répartition en groupes présentant des similarités et montrant les corrélations entre eux, comparés à ceux du groupe témoin.

Condition / Temps	Témoin Normoxie	Hypoxie totale	Hypoxie partielle	Hypoxie Normoxie
T=1	3-4	11-12	19-20	27-28
T=2	5-6	13-14	21-22	29-30
T=3	7-8	15-16	23-24	31-32
T=5	9-10	17-18	25-26	33-34

Tableau IV.2 : Tableau d'analyses de la variance à deux facteurs présentant les différentes conditions expérimentales étudiées en fonction du temps (semaines) dans les racines. Le temps T=0 semaine n'a pas été défini car, à ce temps, nous ne disposons pas de données pour les conditions « hypoxie ». Les échantillons 1 et 2 (T=0 - témoin) n'ont donc été assignés à aucun groupe.

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	Temps x Condition (p-value)
Shikimic ac	0.000%	0.000%	0.003%
Ethanolamine	0.000%	0.000%	0.141%
Tetradec	0.000%	0.000%	0.001%
Stearic ac	0.000%	0.000%	0.003%
PheAla	0.000%	0.000%	0.734%
Trp	0.000%	0.000%	0.001%
Nicotinic ac	0.000%	0.000%	0.124%
Galactonic ac	0.000%	0.000%	0.023%
Tyr	0.000%	0.000%	0.064%
HSer	0.001%	0.000%	0.100%
Threonic lac2	0.001%	0.000%	0.229%
Maltose 1	0.002%	0.000%	0.170%
Putrescine	0.002%	0.000%	0.043%
Myo-inositol	0.003%	0.000%	0.000%
Decanoic ac	0.003%	0.000%	0.000%
Sucrose	0.006%	0.000%	0.883%
Malic ac	0.009%	0.000%	0.000%
Gln	0.010%	0.000%	0.006%
Gln d1	0.011%	0.000%	0.888%
Digalactosyl	0.014%	0.000%	1.113%
Salicylic ac	0.019%	0.000%	0.030%
Rhamnose 1	0.021%	0.000%	0.681%
Met	0.025%	0.000%	0.256%
Fumaric ac	0.027%	0.000%	0.486%
A-ketoglu2	0.035%	0.000%	2.982%
Melibiose 2	0.035%	0.000%	21.901%
Galactose 1	0.037%	0.000%	0.009%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	Temps x Condition (p-value)
Palmitic ac	0.040%	0.000%	1.932%
Cysteine	0.046%	0.000%	2.249%
Threitol	0.054%	0.000%	13.954%
Mannose 1	0.072%	0.000%	7.351%
Rhamnose 2	0.082%	0.000%	0.423%
Ribose	0.094%	0.000%	11.510%
Lys	0.094%	0.000%	0.644%
Citric ac	0.095%	0.000%	0.001%
Galactinol	0.122%	0.000%	3.298%
Citramalic	0.132%	0.000%	0.077%
Lauric ac	0.135%	0.000%	0.002%
Arabinose	0.166%	0.000%	0.000%
Glycolic ac	0.177%	0.000%	1.099%
Aminoadipic	0.206%	0.001%	0.632%
Threonic ac	0.235%	0.000%	0.313%
His	0.270%	0.000%	0.015%
Pyroglu	0.277%	0.000%	0.009%
Pyruvic ac	0.328%	0.000%	61.865%
Tagatose 1	0.372%	0.000%	0.163%
Glycerol	0.417%	0.000%	0.149%
Raffinose	0.421%	0.000%	31.568%
Glu	0.425%	0.000%	0.001%
Succinic ac	0.518%	0.000%	0.327%
Benzoic ac	0.532%	0.000%	1.162%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	Temps x Condition (p-value)
Maleic ac	0.668%	0.000%	0.000%
Levoglucosan	0.779%	0.000%	0.001%
2-Ohglutar	0.817%	0.000%	7.411%
Urea	0.907%	0.008%	6.361%
Xylose 2	0.925%	0.000%	0.030%
Xylose 1	0.926%	0.000%	0.022%
GalactosylG	0.935%	0.000%	0.329%
p-OHbenzoic	0.977%	0.000%	50.617%
Thr	1.085%	0.000%	0.019%
Glyceric ac	1.097%	0.000%	0.237%
Leu	1.265%	0.000%	0.019%
glycerol 3P	1.275%	0.000%	3.171%
Malonic ac	1.559%	0.000%	0.950%
T-Aconitic	1.835%	0.000%	0.295%
Galacturo 1	1.926%	0.000%	0.074%
Pipecolic ac	1.990%	0.000%	28.552%
Ile	3.053%	0.000%	0.060%
Fucose 2	3.199%	0.050%	39.619%
2,4bis OH-But	3.322%	0.000%	15.415%
Val	3.623%	0.000%	0.028%
Hexanoic ac	3.962%	0.057%	30.281%
Asp	4.008%	0.000%	0.006%
Gly	4.590%	0.000%	0.287%

Tableau IV.3 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «temps» dans les racines. Plus le p-value est faible, plus la variation du métabolite n'est significative. La valeur 0.000% correspond à une valeur inférieure à 0.0005%.

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	Temps x Condition (p-value)
Putrescine	0.002%	0.000%	0.043%
Decanoic ac	0.003%	0.000%	0.000%
Glu	0.425%	0.000%	0.001%
Myo-inositol	0.003%	0.000%	0.000%
Vanillic ac	45.412%	0.000%	71.121%
GABA	19.224%	0.000%	0.186%
Stearic ac	0.000%	0.000%	0.003%
Shikimic ac	0.000%	0.000%	0.003%
Gly	4.590%	0.000%	0.287%
Malic ac	0.009%	0.000%	0.000%
Gln	0.010%	0.000%	0.006%
Asp	4.008%	0.000%	0.006%
Lactic ac	8.010%	0.000%	1.178%
Succinic ac	0.518%	0.000%	0.327%
Ser	17.884%	0.000%	0.054%
Pyroglu	0.277%	0.000%	0.009%
Mannitol	6.570%	0.000%	0.005%
Trp	0.000%	0.000%	0.001%
T-Aconitic	1.835%	0.000%	0.295%
Tyr	0.000%	0.000%	0.064%
Galactose 1	0.037%	0.000%	0.009%
Orn	32.338%	0.000%	0.008%
Thr	1.085%	0.000%	0.019%
Arg	21.829%	0.000%	0.006%
Maltose 1	0.002%	0.000%	0.170%
Gln d1	0.011%	0.000%	0.888%
Threonic ac	0.235%	0.000%	0.313%
Val	3.623%	0.000%	0.028%
Benzoic ac	0.532%	0.000%	1.162%
Threitol d2	95.089%	0.000%	0.069%
Leu	1.265%	0.000%	0.019%
Nicotinic ac	0.000%	0.000%	0.124%
Melibiose 2	0.035%	0.000%	21.901%
Phosphoric	7.966%	0.000%	0.197%
Ethanolamine	0.000%	0.000%	0.141%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	Temps x Condition (p-value)
Tetradec	0.000%	0.000%	0.001%
Raffinose	0.421%	0.000%	31.568%
Pro	50.806%	0.000%	0.884%
Met	0.025%	0.000%	0.256%
Citric ac	0.095%	0.000%	0.001%
Ile	3.053%	0.000%	0.060%
Lauric ac	0.135%	0.000%	0.002%
Malonic ac	1.559%	0.000%	0.950%
Maleic ac	0.668%	0.000%	0.000%
His	0.270%	0.000%	0.015%
Glucaric ac	26.387%	0.000%	0.525%
PheAla	0.000%	0.000%	0.734%
A-ketoglu2	0.035%	0.000%	2.982%
Glyceric ac	1.097%	0.000%	0.237%
HSer	0.001%	0.000%	0.100%
Palmitic ac	0.040%	0.000%	1.932%
Cysteine	0.046%	0.000%	2.249%
Digalactosyl	0.014%	0.000%	1.113%
GalactosylG	0.935%	0.000%	0.329%
Trehalose	7.538%	0.000%	27.443%
Arabinose	0.166%	0.000%	0.000%
Fumaric ac	0.027%	0.000%	0.486%
Fructose 1	47.908%	0.000%	0.009%
Xylose 1	0.926%	0.000%	0.022%
Xylose 2	0.925%	0.000%	0.030%
Threitol	0.054%	0.000%	13.954%
Fructose 2	58.770%	0.000%	0.023%
2-Ohglutar	0.817%	0.000%	7.411%
Ribose	0.094%	0.000%	11.510%
glycerol 3P	1.275%	0.000%	3.171%
Glucose 1	5.771%	0.000%	0.095%
Levoglucosan	0.779%	0.000%	0.001%
Glycerol	0.417%	0.000%	0.149%
A-Ala	21.589%	0.000%	55.021%
Glycolic ac	0.177%	0.000%	1.099%
Galacturo 1	1.926%	0.000%	0.074%
Salicylic ac	0.019%	0.000%	0.030%
p-OHbenzoic	0.977%	0.000%	50.617%
Glucose-6P1	49.493%	0.000%	26.722%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	Temps x Condition (p-value)
Galactinol	0.122%	0.000%	3.298%
B-Sitosterol	39.046%	0.000%	24.878%
Glucose 2	8.295%	0.000%	0.166%
Pyruvic ac	0.328%	0.000%	61.865%
Citramalic	0.132%	0.000%	0.077%
2,4bis OH-But	3.322%	0.000%	15.415%
O-AcetylSer	9.512%	0.000%	5.907%
Tagatose 1	0.372%	0.000%	0.163%
Galactonic ac	0.000%	0.000%	0.023%
Mannose 1	0.072%	0.000%	7.351%
Lys	0.094%	0.000%	0.644%
Phosphoric ac	54.086%	0.000%	1.879%
Asn	19.099%	0.000%	15.077%
Sucrose	0.006%	0.000%	0.883%
Threonic lac2	0.001%	0.000%	0.229%
Uracil	14.929%	0.000%	17.387%
Malonic tris	29.490%	0.000%	12.201%
glycerol 2P	13.911%	0.000%	54.158%
Rhamnose 2	0.082%	0.000%	0.423%
Rhamnose 1	0.021%	0.000%	0.681%
B-Ala	57.472%	0.000%	6.896%
Pipecolic ac	1.990%	0.000%	28.552%
Threonic lac	19.620%	0.000%	11.141%
Aminoadipic	0.206%	0.001%	0.632%
Glucose-6P2	21.664%	0.002%	94.977%
Fructose-6P	5.662%	0.006%	20.139%
Urea	0.907%	0.008%	6.361%
Oleic ac	52.496%	0.045%	31.398%
Fucose 2	3.199%	0.050%	39.619%
Hexanoic ac	3.962%	0.057%	30.281%
Spermidine	6.181%	0.060%	0.224%
Linoleic ac	24.734%	0.131%	10.094%
Gln d2	14.389%	0.162%	42.830%
Sorbitol	8.741%	0.890%	47.157%
Maltose 2	11.727%	1.884%	35.326%
Octanoic ac	18.446%	3.881%	3.609%
Lactose 2	61.152%	4.643%	54.772%

Tableau IV.4 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «condition» dans les racines. Plus le p-value est faible, plus la variation du métabolite n'est significative. La valeur 0.000% correspond à une valeur inférieure à 0.0005%.

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Decanoic ac	0.003%	0.000%	0.000%
Arabinose	0.166%	0.000%	0.000%
Myo-inositol	0.003%	0.000%	0.000%
Malic ac	0.009%	0.000%	0.000%
Maleic ac	0.668%	0.000%	0.000%
Trp	0.000%	0.000%	0.001%
Glu	0.425%	0.000%	0.001%
Citric ac	0.095%	0.000%	0.001%
Tetradec	0.000%	0.000%	0.001%
Levoglucosan	0.779%	0.000%	0.001%
Lauric ac	0.135%	0.000%	0.002%
Shikimic ac	0.000%	0.000%	0.003%
Stearic ac	0.000%	0.000%	0.003%
Mannitol	6.570%	0.000%	0.005%
Gln	0.010%	0.000%	0.006%
Asp	4.008%	0.000%	0.006%
Arg	21.829%	0.000%	0.006%
Orn	32.338%	0.000%	0.008%
Galactose 1	0.037%	0.000%	0.009%
Fructose 1	47.908%	0.000%	0.009%
Pyroglu	0.277%	0.000%	0.009%
His	0.270%	0.000%	0.015%
Leu	1.265%	0.000%	0.019%
Thr	1.085%	0.000%	0.019%
Xylose 1	0.926%	0.000%	0.022%
Galactonic ac	0.000%	0.000%	0.023%
Fructose 2	58.770%	0.000%	0.023%
Val	3.623%	0.000%	0.028%
Xylose 2	0.925%	0.000%	0.030%
Salicylic ac	0.019%	0.000%	0.030%
Putrescine	0.002%	0.000%	0.043%
Ser	17.884%	0.000%	0.054%
Ile	3.053%	0.000%	0.060%
Tyr	0.000%	0.000%	0.064%
Threitol d2	95.089%	0.000%	0.069%
Galacturo 1	1.926%	0.000%	0.074%
Citramalic	0.132%	0.000%	0.077%
Glucose 1	5.771%	0.000%	0.095%
HSer	0.001%	0.000%	0.100%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Nicotinic ac	0.000%	0.000%	0.124%
Ethanolamine	0.000%	0.000%	0.141%
Glycerol	0.417%	0.000%	0.149%
Tagatose 1	0.372%	0.000%	0.163%
Glucose 2	8.295%	0.000%	0.166%
Maltose 1	0.002%	0.000%	0.170%
GABA	19.224%	0.000%	0.186%
Phosphoric	7.966%	0.000%	0.197%
Spermidine	6.181%	0.060%	0.224%
Threonic lac2	0.001%	0.000%	0.229%
Glyceric ac	1.097%	0.000%	0.237%
Met	0.025%	0.000%	0.256%
Gly	4.590%	0.000%	0.287%
T-Aconitic	1.835%	0.000%	0.295%
Threonic ac	0.235%	0.000%	0.313%
Succinic ac	0.518%	0.000%	0.327%
GalactosylG	0.935%	0.000%	0.329%
Rhamnose 2	0.082%	0.000%	0.423%
Fumaric ac	0.027%	0.000%	0.486%
Glucaric ac	26.387%	0.000%	0.525%
Aminoadipic	0.206%	0.001%	0.632%
Lys	0.094%	0.000%	0.644%
Rhamnose 1	0.021%	0.000%	0.681%
PheAla	0.000%	0.000%	0.734%
Sucrose	0.006%	0.000%	0.883%
Pro	50.806%	0.000%	0.884%
Gln d1	0.011%	0.000%	0.888%
Malonic ac	1.559%	0.000%	0.950%
Glycolic ac	0.177%	0.000%	1.099%
Digalactosyl	0.014%	0.000%	1.113%
Benzoic ac	0.532%	0.000%	1.162%
Lactic ac	8.010%	0.000%	1.178%
Phosphoric ac	54.086%	0.000%	1.879%
Palmitic ac	0.040%	0.000%	1.932%
Cysteine	0.046%	0.000%	2.249%
A-ketoglu2	0.035%	0.000%	2.982%
glycerol 3P	1.275%	0.000%	3.171%
Galactinol	0.122%	0.000%	3.298%
Octanoic ac	18.446%	3.881%	3.609%

Tableau IV.5 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur « temps x condition » dans les racines. Plus le p-value est faible, plus la variation du métabolite n'est significative. La valeur 0.000% correspond à une valeur inférieure à 0.0005%.

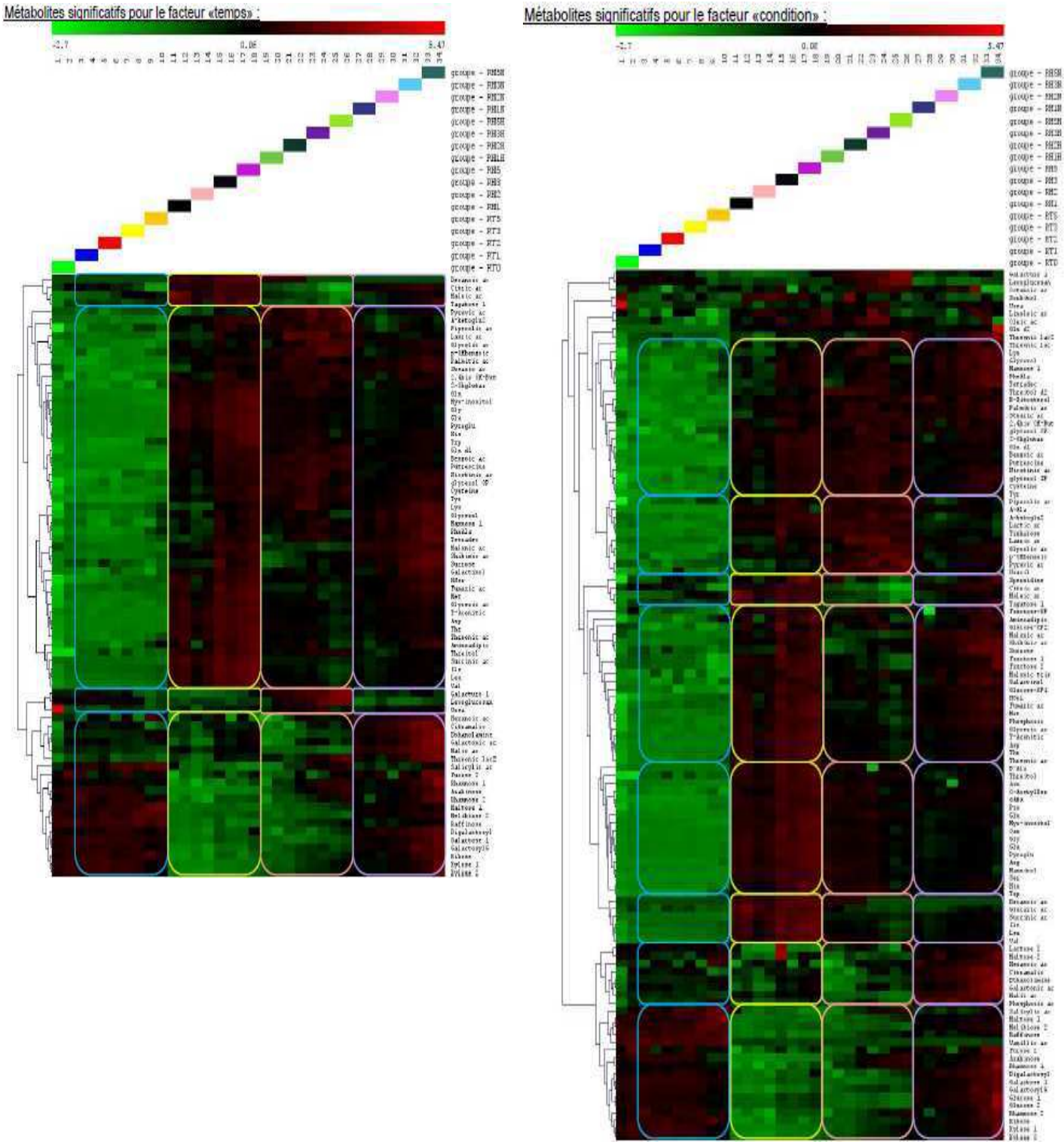


Figure IV.17 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans les racines et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps » (à gauche) et le facteur « condition » (à droite) avec le numéro associé pour chaque échantillon.

Les métabolites rassemblés représentent ceux qui ont la même tendance (détectés par GC / TOFMS) pendant 5 semaines de stress hypoxique racinaire. Chaque valeur représente la moyenne de deux répétitions indépendantes pour chaque temps de traitement. Les couleurs vert et rouge indiquent une diminution ou une augmentation de la concentration de chaque métabolite par rapport au temps T = 0 semaine (début du stress), respectivement et la couleur noire indique l'absence de variation. Le regroupement a été fait avec la méthode de corrélation de Pearson.

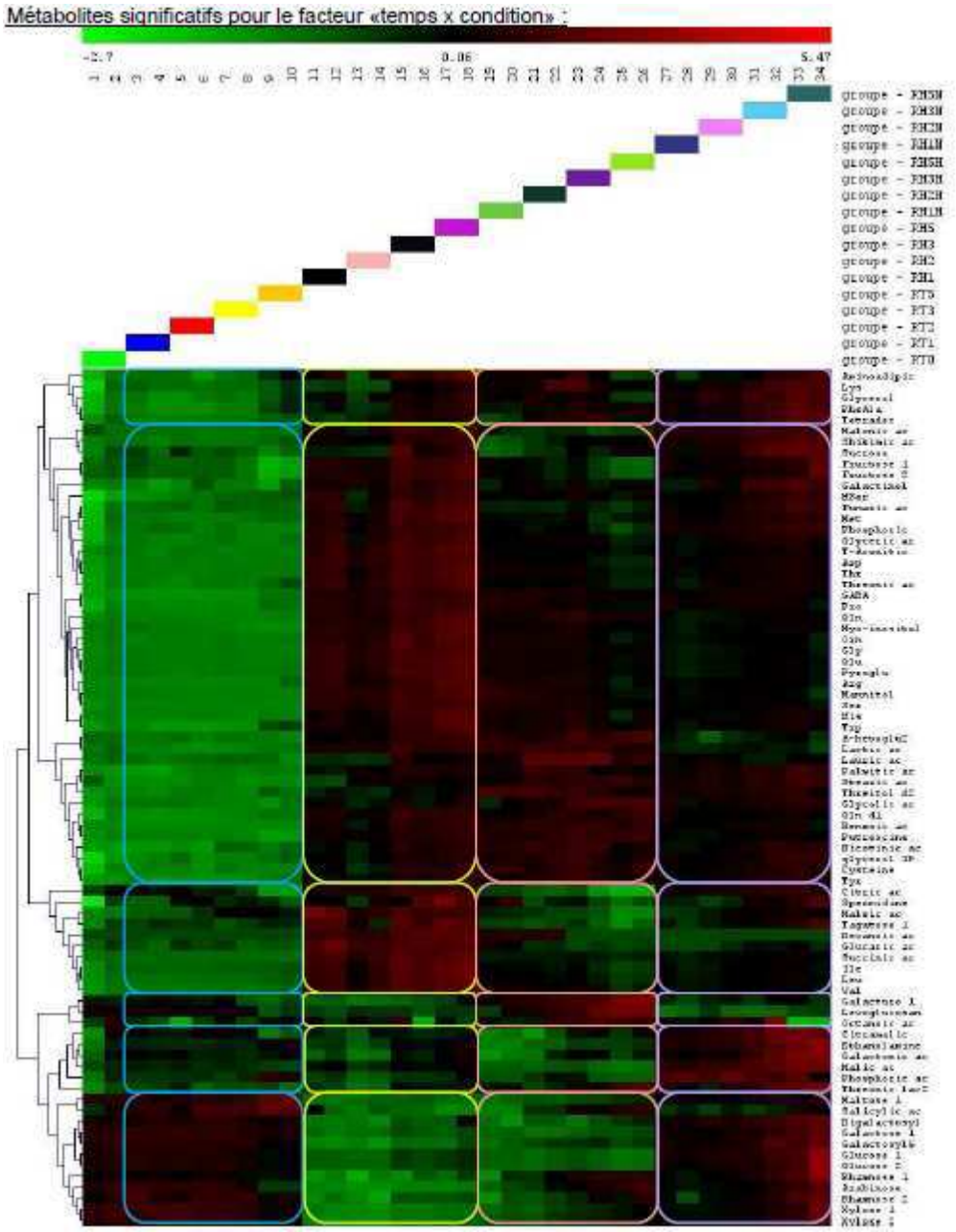


Figure IV.18 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans les racines et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps x condition » avec le numéro associé pour chaque échantillon.

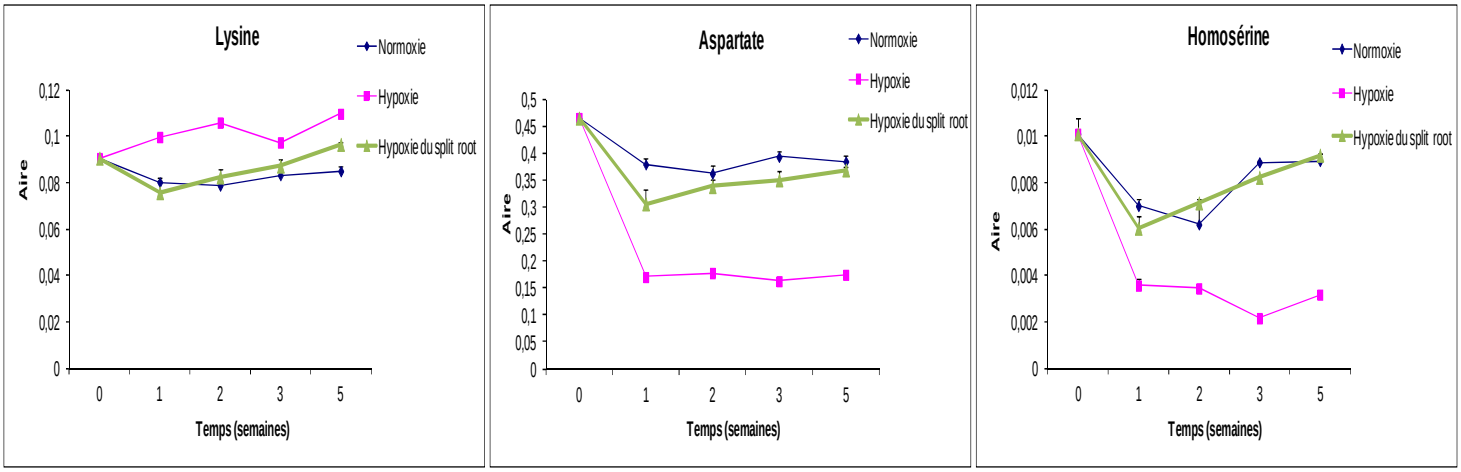


Figure IV.19 : Graphe d'évolution de la lysine, l'aspartate et l'homosérine dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle» et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

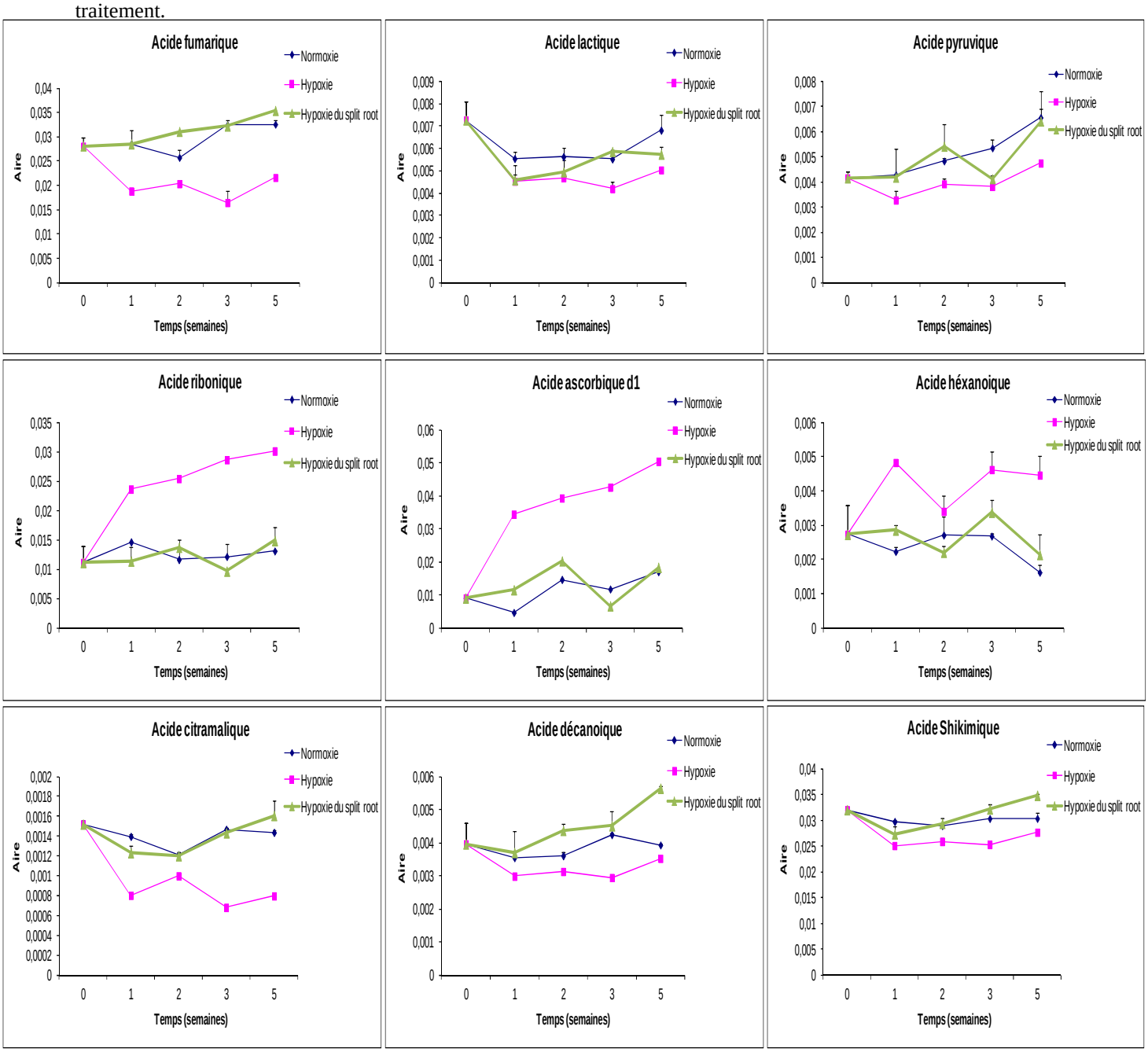


Figure IV.20 : Graphe d'évolution de l'acide fumarique, lactique, pyruvique, ribonique, ascorbique d1, héxanoique, citramalique, décanoique et shikimique, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

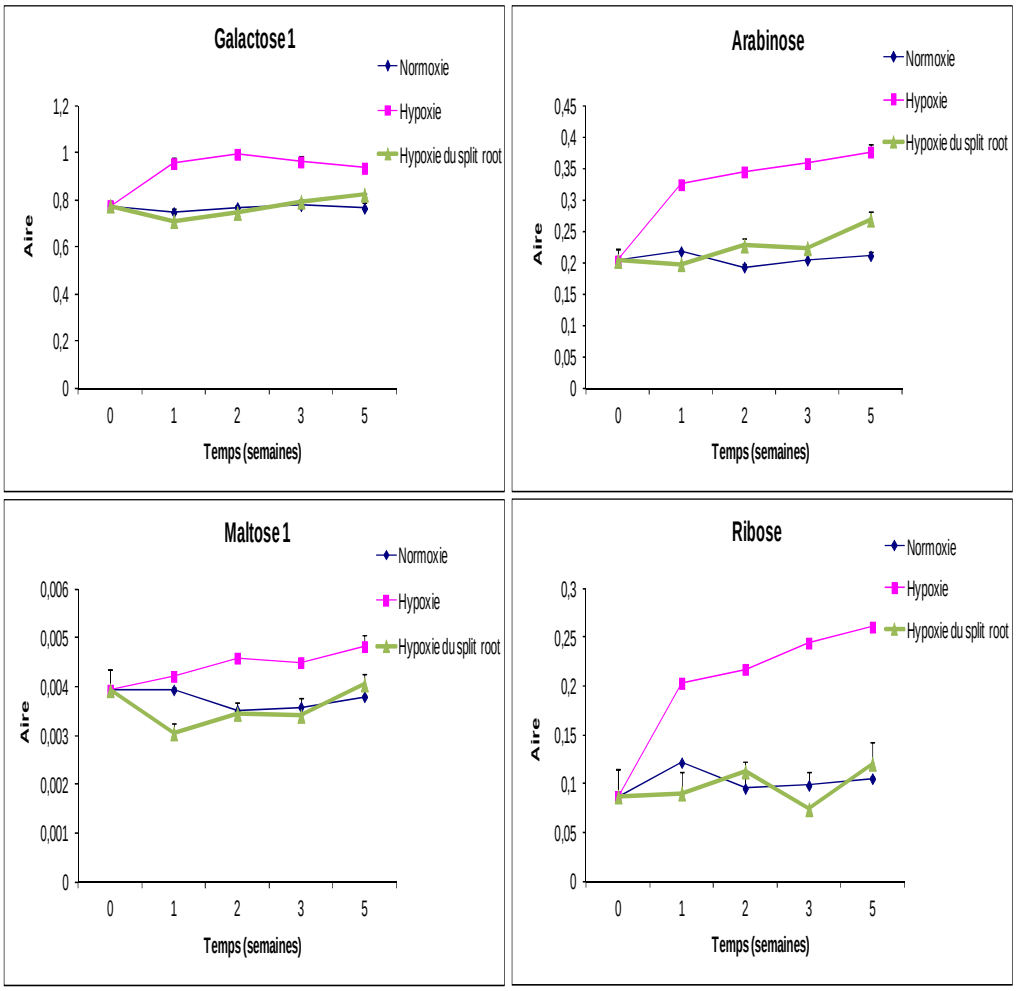
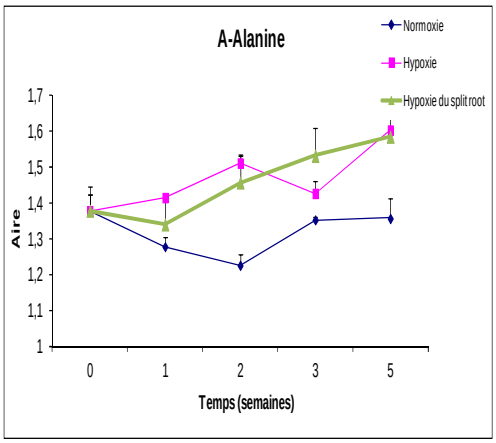
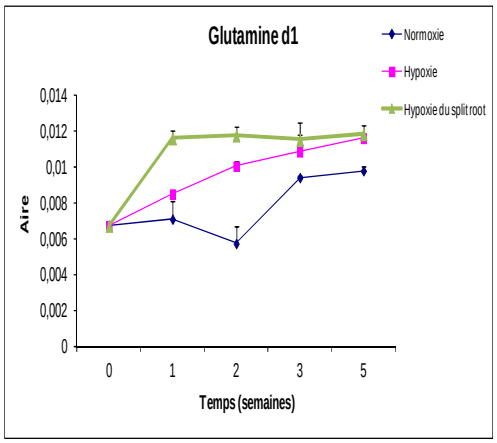
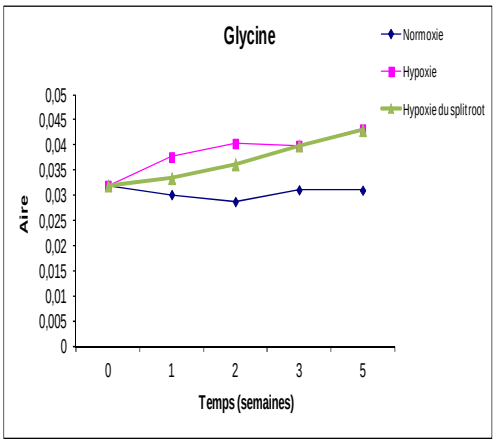
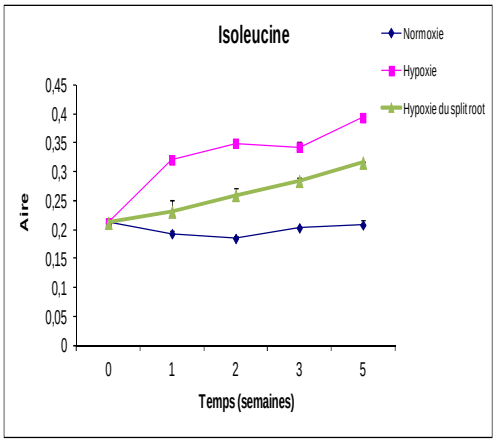


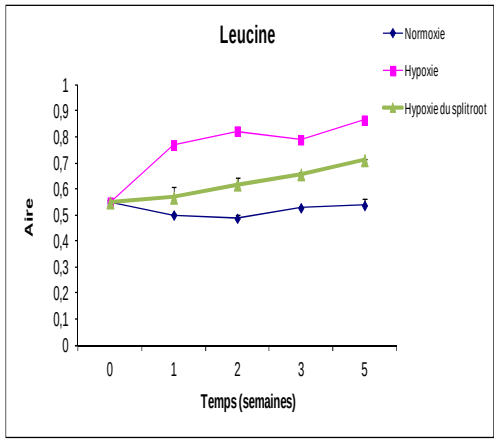
Figure IV.21 : Graphe d'évolution du galactose 1, arabinose, maltose 1 et ribose dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle ou 10% » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

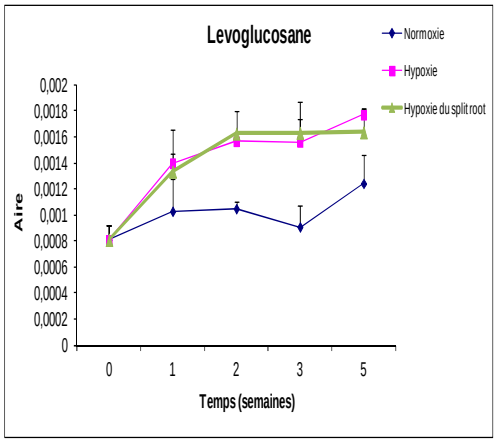

A-Alanine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

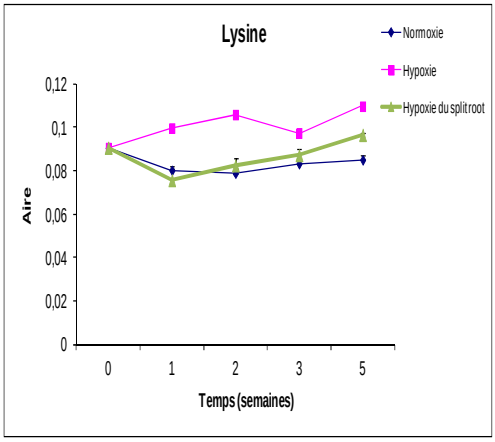

Glutamine d1
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

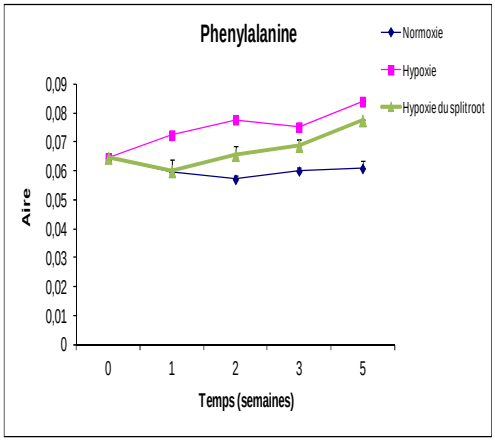

Glycine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

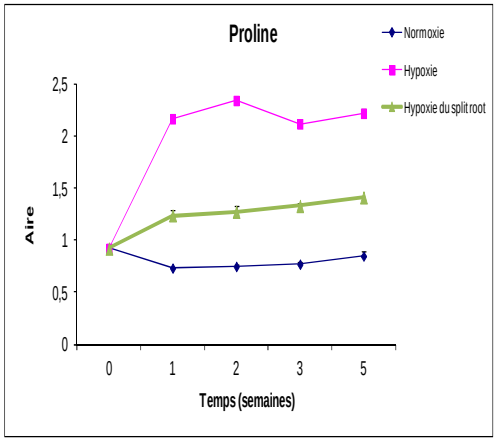

Isoleucine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

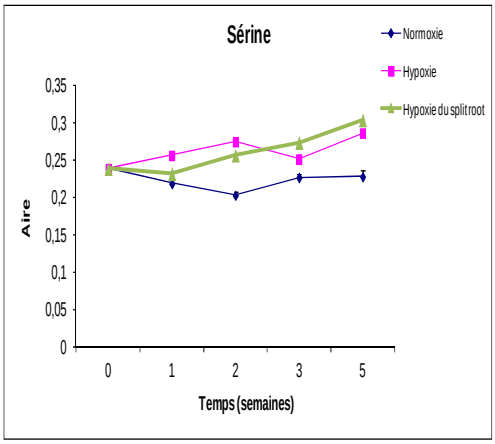

Leucine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

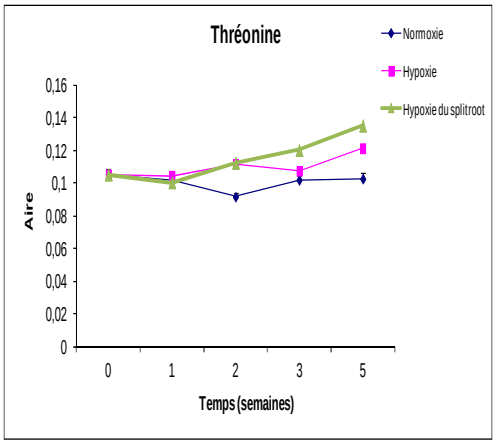

Levoglucosane
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

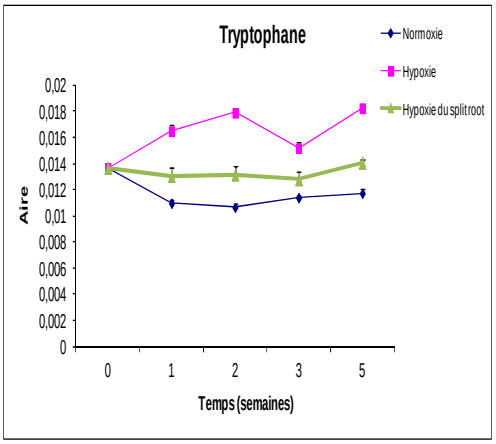

Lysine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Phenylalanine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Proline
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Sérine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Thréonine
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)


Tryptophane
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du splitroot
Aire
Temps (semaines)

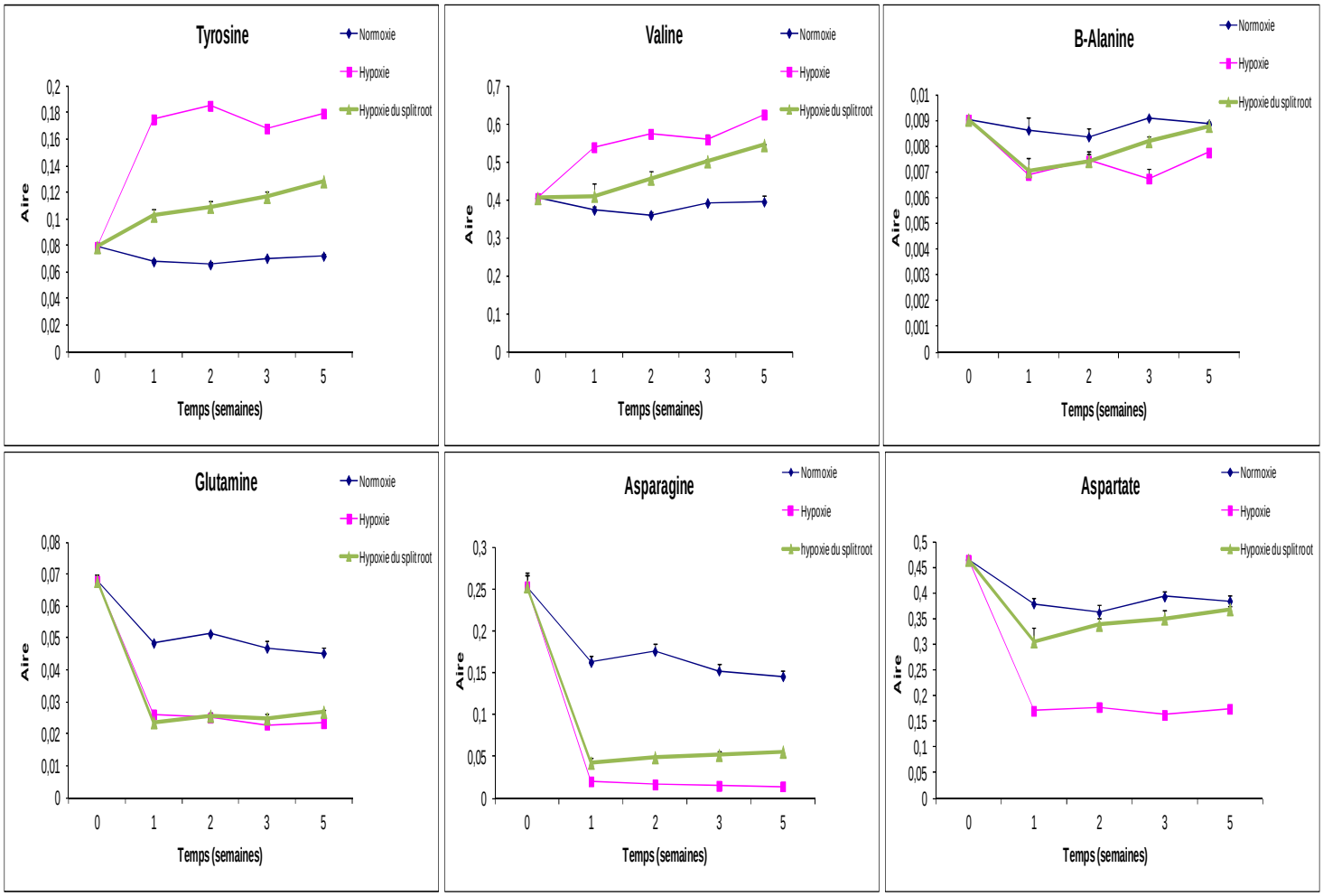


Figure IV.22 : Graphes d'évolution de l'A-alanine, la glutamine d1 (un dérivé de la glutamine), la glycine, l'isoleucine, la leucine, la lévoglucosane, la lysine, la phénylalanine, la proline, la sérine, la thréonine, le tryptophane, la tyrosine, la valine, le B-alanine, la glutamine, l'asparagine et l'aspartate, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle »g et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

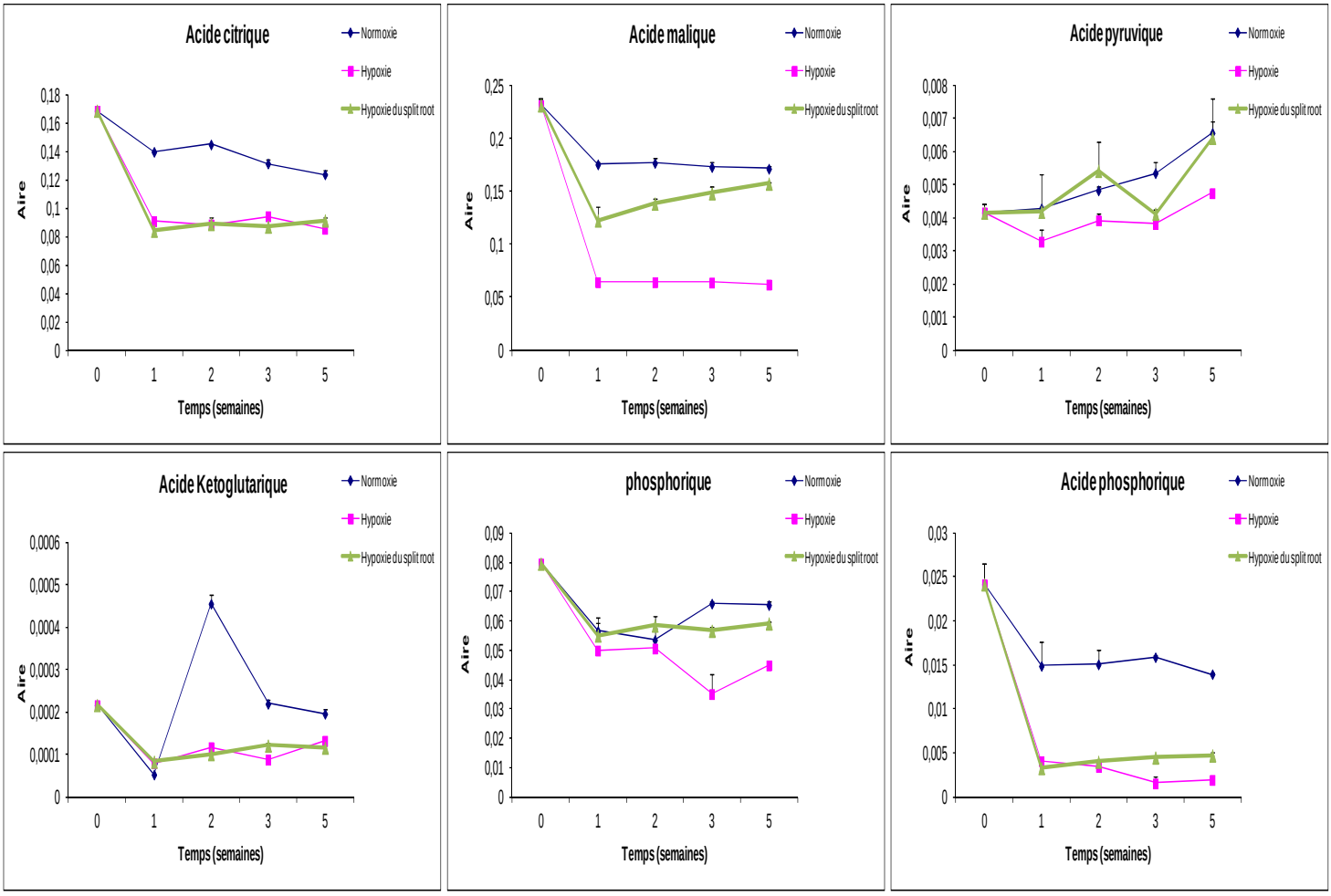


Figure IV.23 : Graphes d'évolution de l'acide citrique, malique, pyruvique, ketoglutarique, phosphorique dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

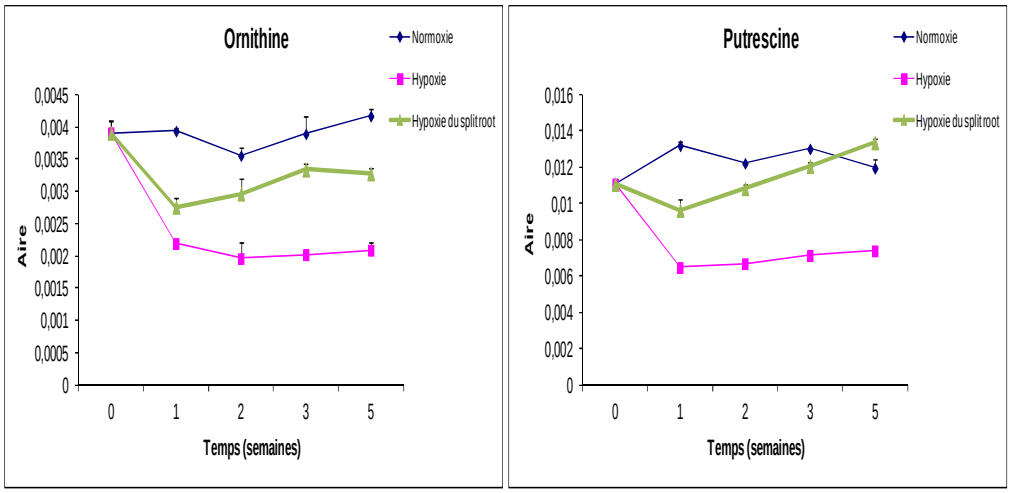
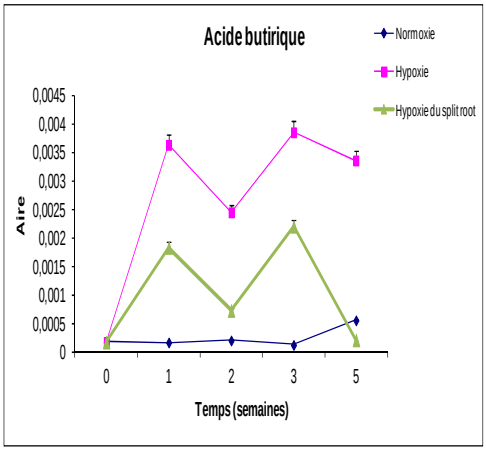
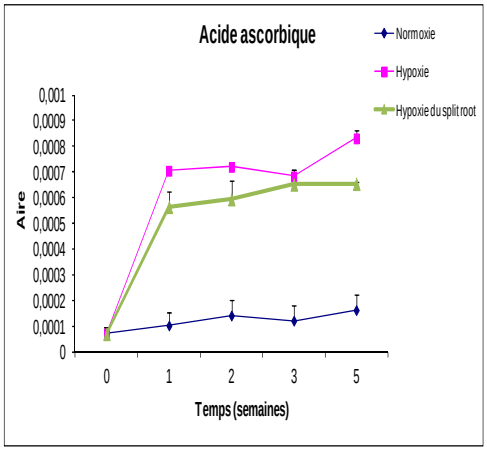
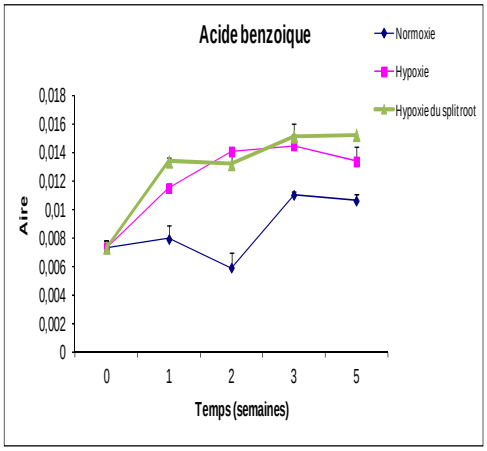
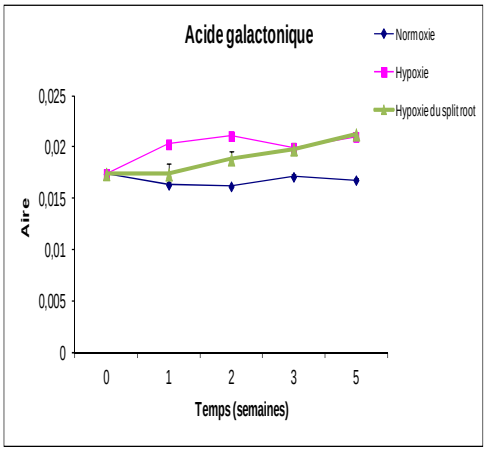


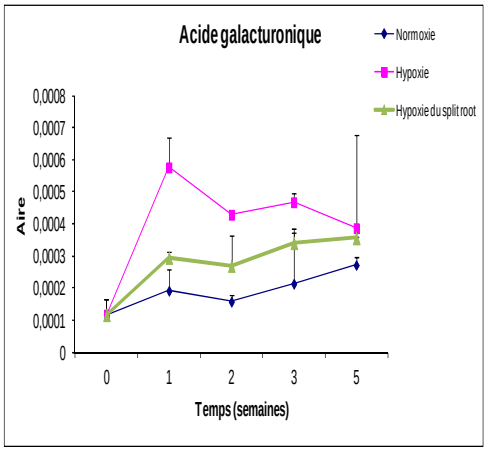
Figure IV.24 : Graphes d'évolution de l'ornithine et de la putrescine dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

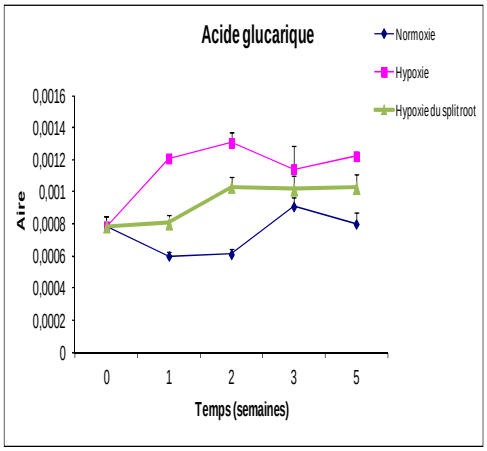

Acide butirique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,0045
0,004
0,0035
0,003
0,0025
0,002
0,0015
0,001
0,0005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

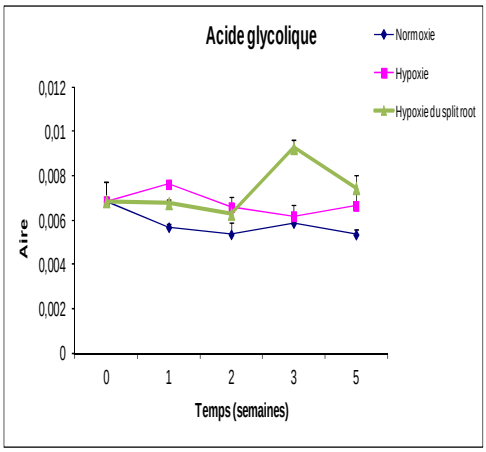

Acide ascorbique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,001
0,0009
0,0008
0,0007
0,0006
0,0005
0,0004
0,0003
0,0002
0,0001
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

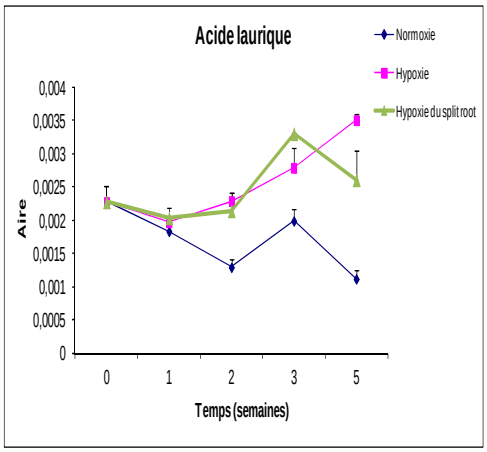

Acide benzoique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,018
0,016
0,014
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

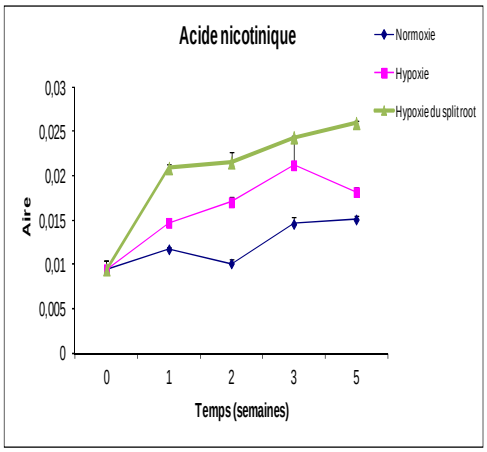

Acide galactonique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

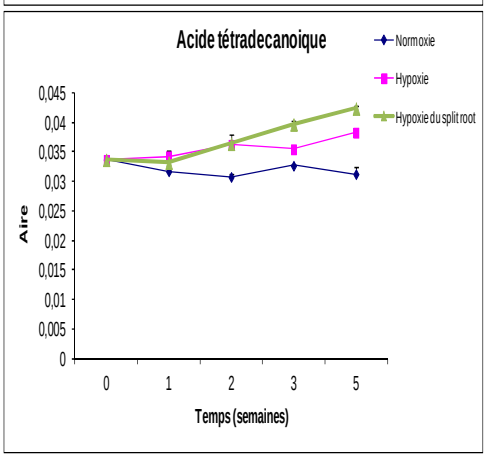

Acide galacturonique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,0008
0,0007
0,0006
0,0005
0,0004
0,0003
0,0002
0,0001
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

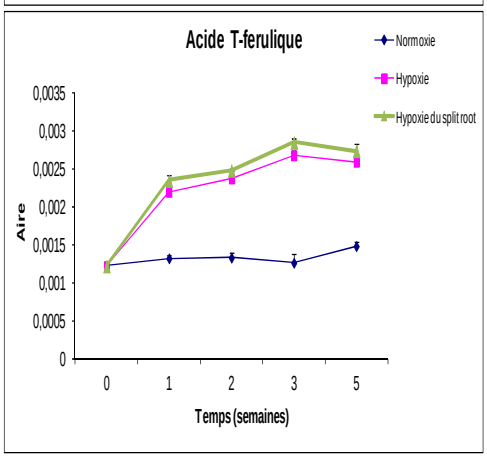

Acide glucarique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,0016
0,0014
0,0012
0,001
0,0008
0,0006
0,0004
0,0002
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

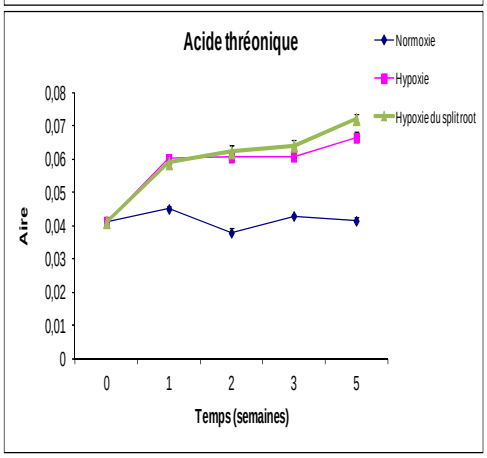

Acide glycolique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Acide laurique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,004
0,0035
0,003
0,0025
0,002
0,0015
0,001
0,0005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Acide nicotinique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Acide tétradecanoique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,045
0,04
0,035
0,03
0,025
0,02
0,015
0,01
0,005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Acide T-ferulique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,0035
0,003
0,0025
0,002
0,0015
0,001
0,0005
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)


Acide thréonique
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
0,08
0,07
0,06
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0
0
1
2
3
5
Temps (semaines)

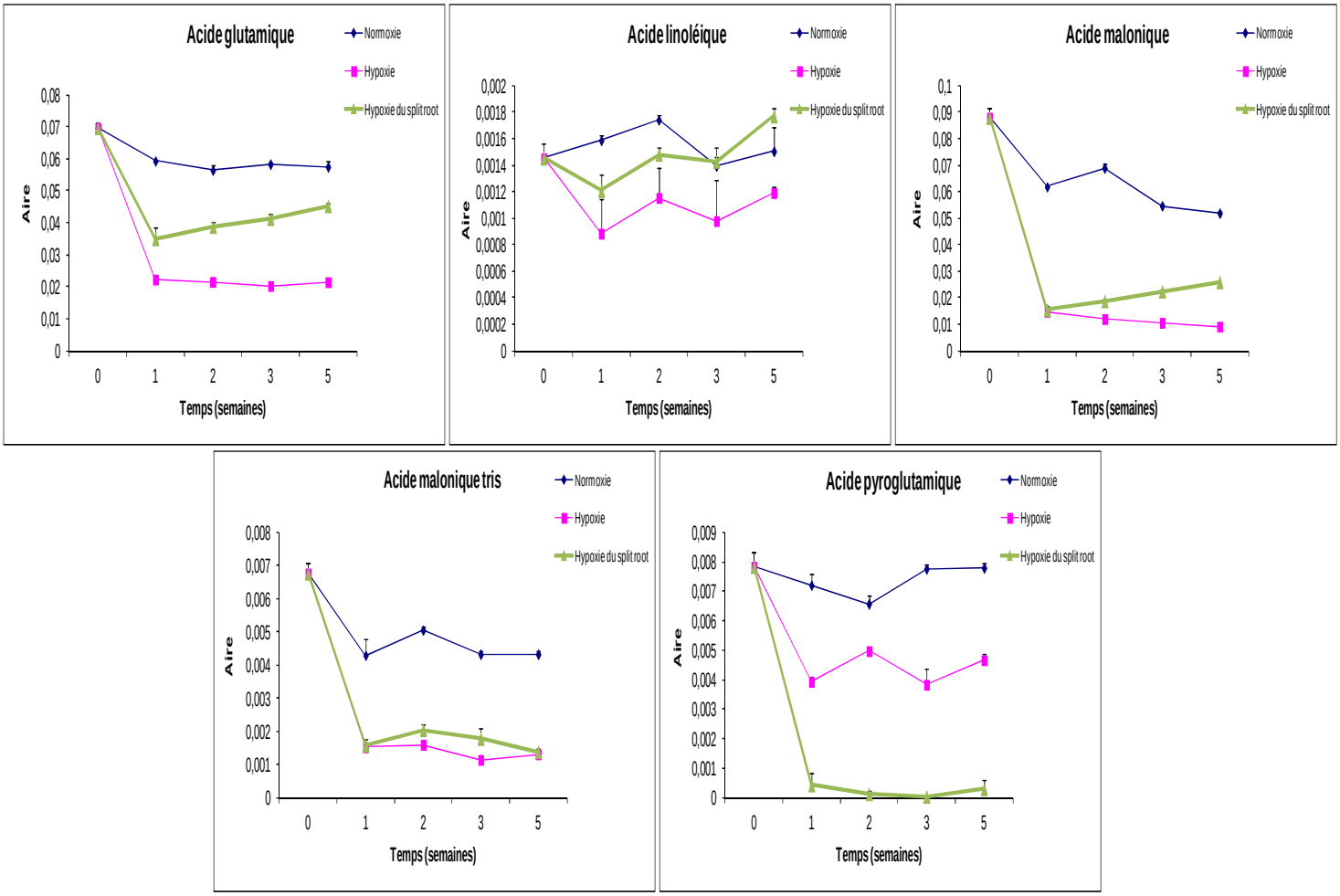
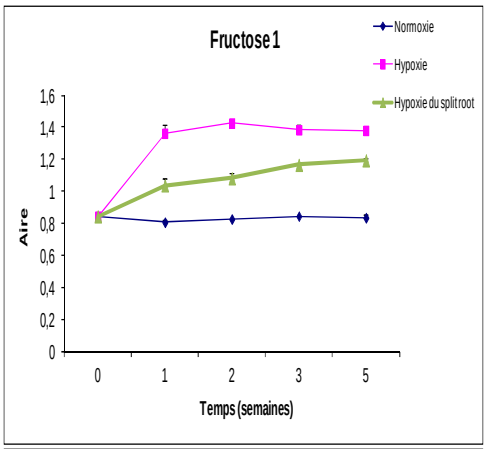
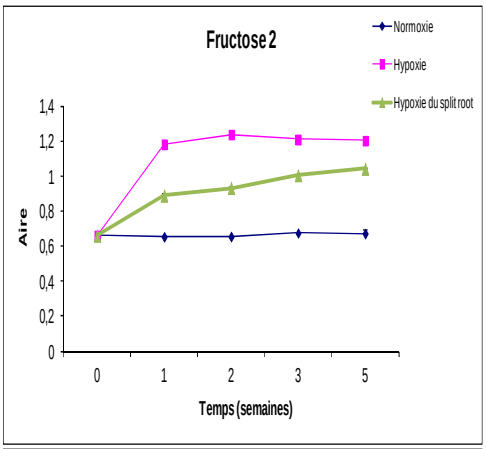
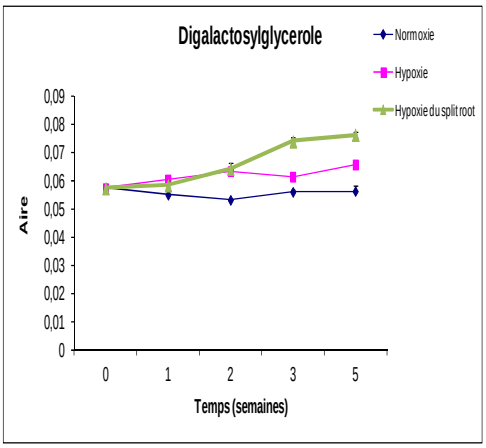
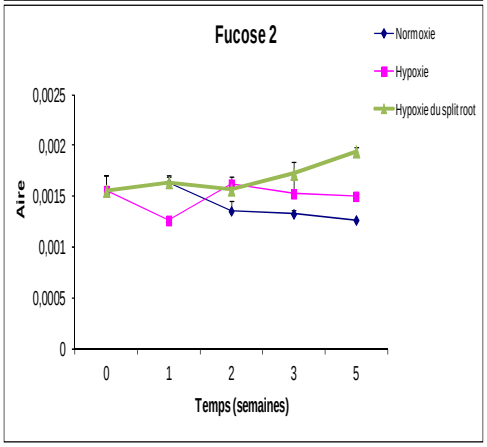


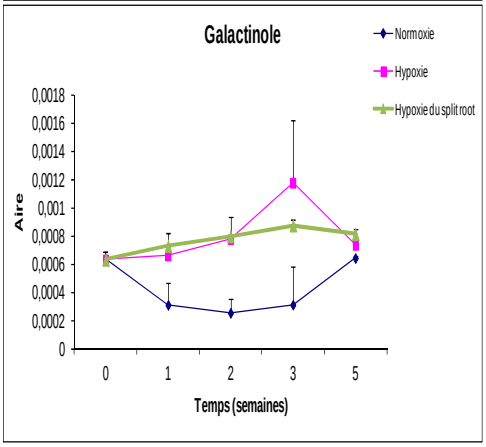
Figure IV.25 : Graphes d'évolution de l'acide butirique, ascorbique, benzoïque, galactonique, galacturonique, glucarique, glycolique, laurique, nicotinique, tétradécanoique, T-ferrulique, thréonique, glutamique, linoléique, malonique, malonique tris et pyroglutamique, la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

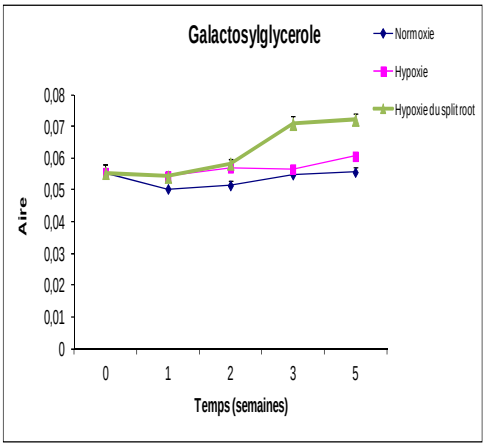

Fructose 1
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)

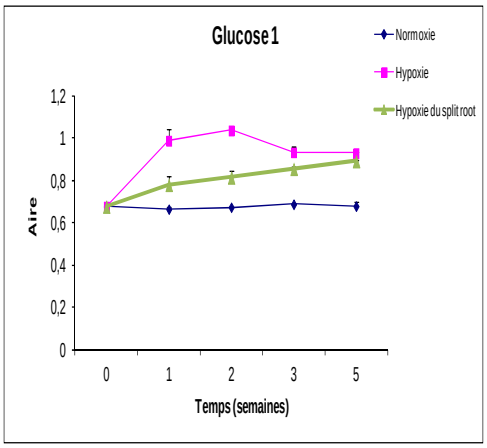

Fructose 2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)

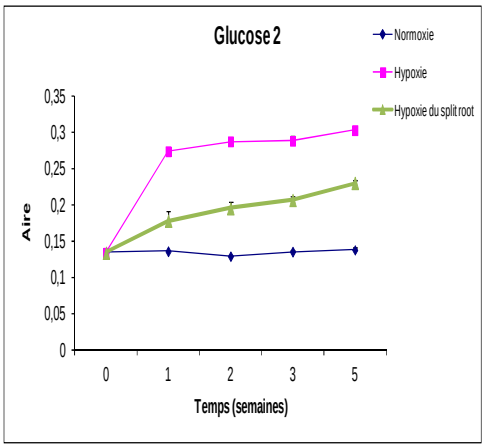

Digalactosylglycerole
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)

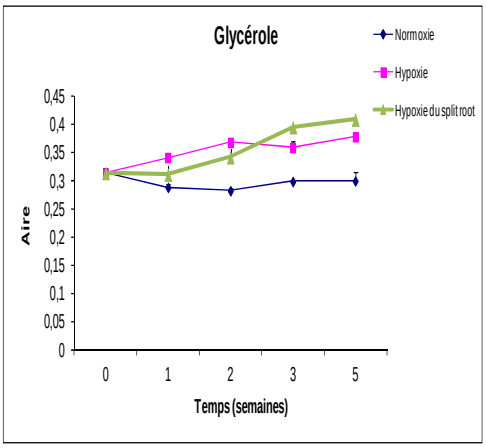

Fucose 2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)

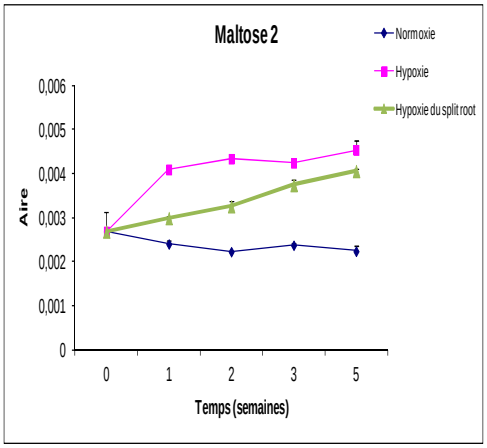

Galactinole
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)

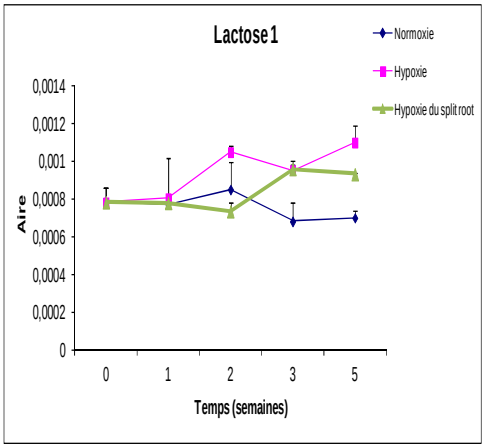

Galactosylglycerole
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)

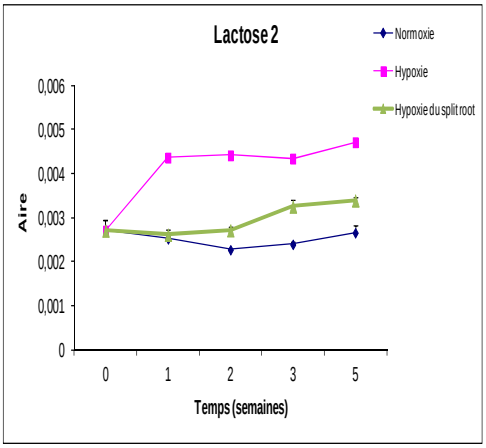

Glucose 1
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)


Glucose 2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)


Glycérole
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)


Maltose 2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)


Lactose 1
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)


Lactose 2
Normoxie
Hypoxie
Hypoxie du split root
Aire
Temps (semaines)

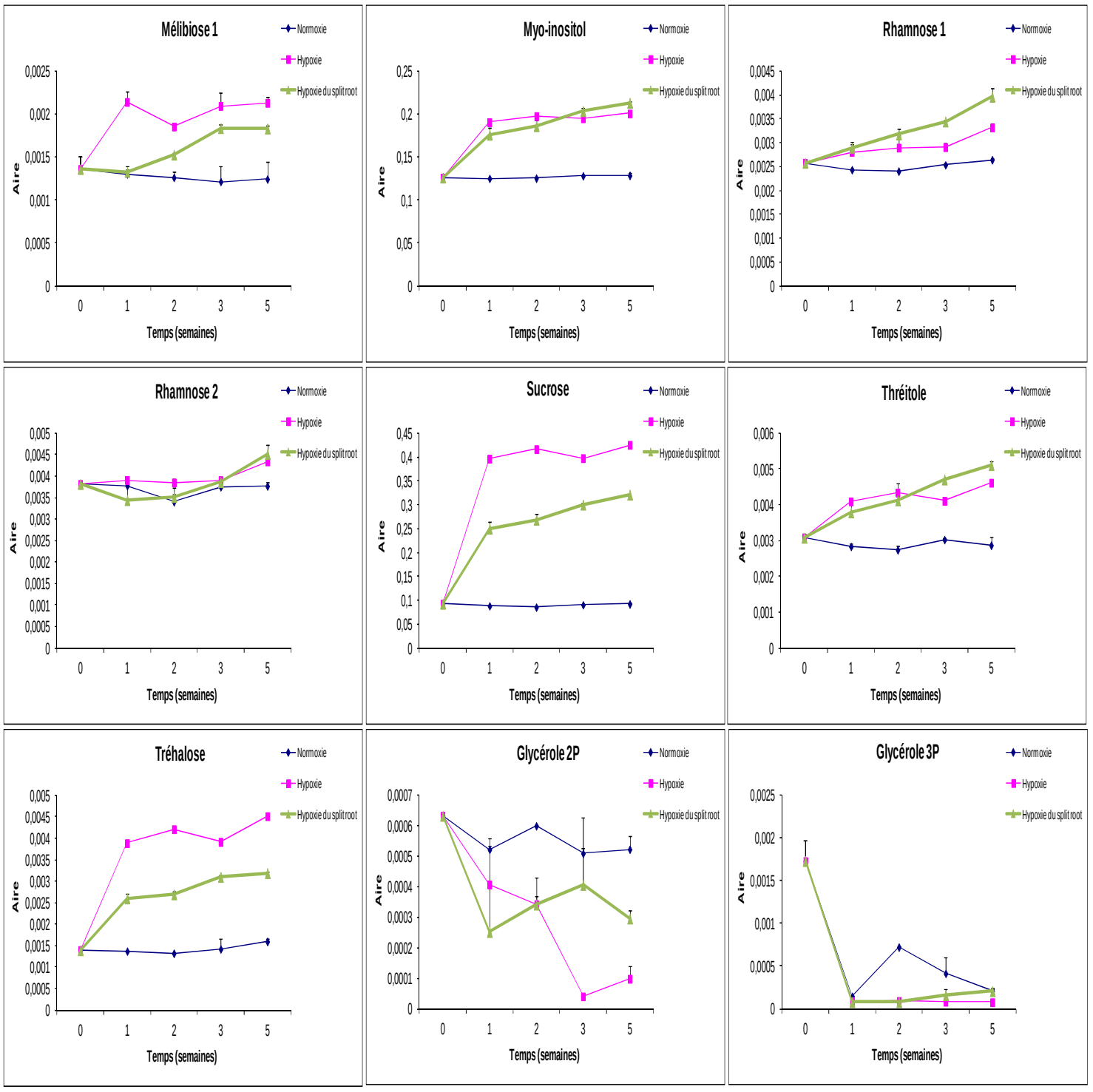


Figure IV.26 : Graphes d'évolution du fructose 1 et 2, digalactosylglycérole, fucose 2, galactinole, galactosylglycérole, glucose 1 et 2, glycérol, maltose 2, lactose1 et 2, mélibiose 1, myo-inositol, rhamnose1 et 2, sucrose, thréitol, tréhalose et glycérol 2P et 3P, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

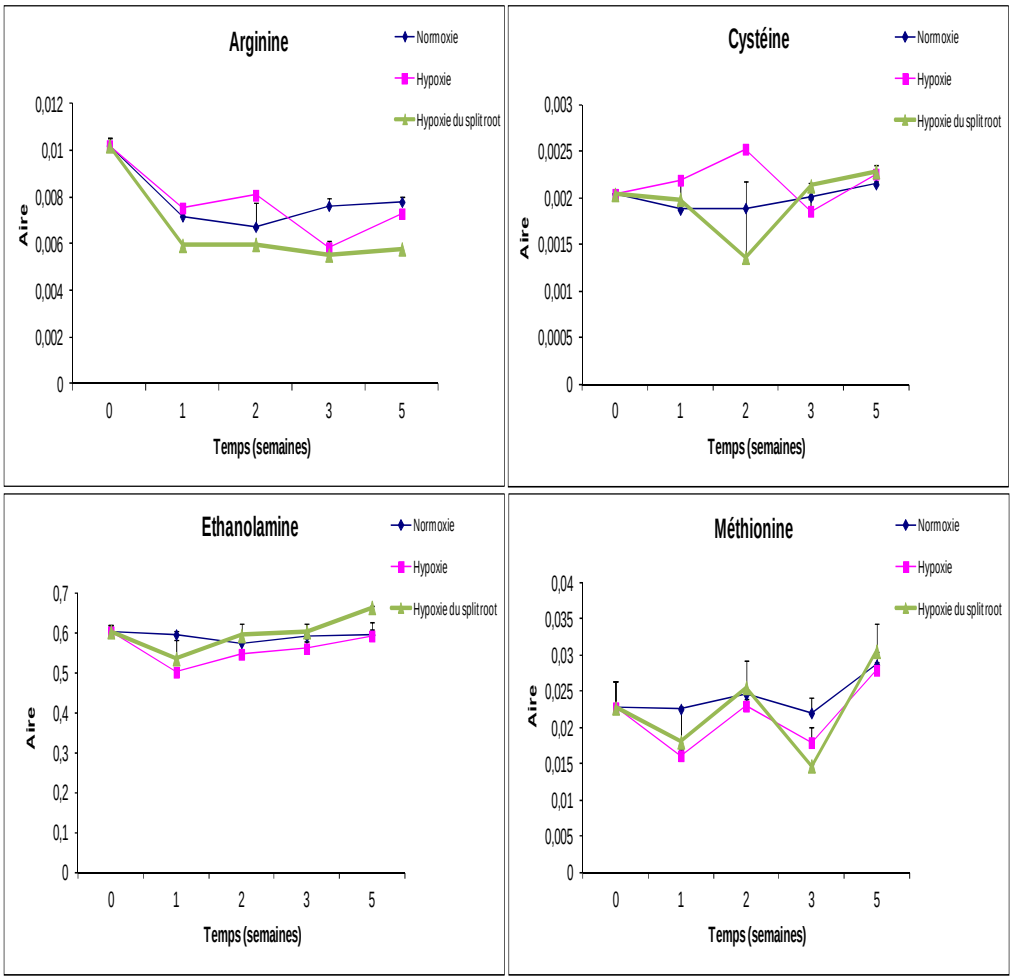


Figure IV.27 : Graphes d'évolution des différents acides aminés non affectés par le stress hypoxique racinaire (l'arginine, cystéine, éthanolamine et méthionine) dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

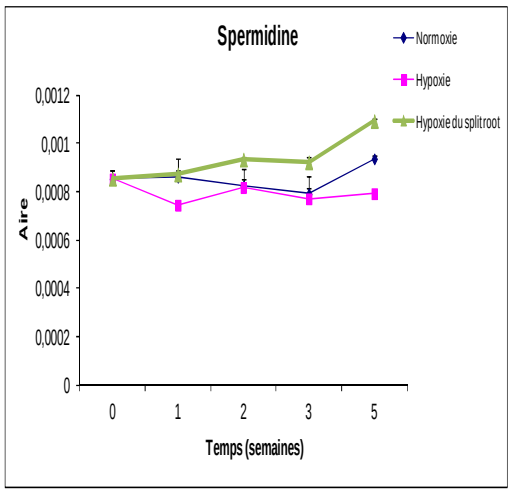


Figure IV.28 : Graphes d'évolution de la spermidine, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

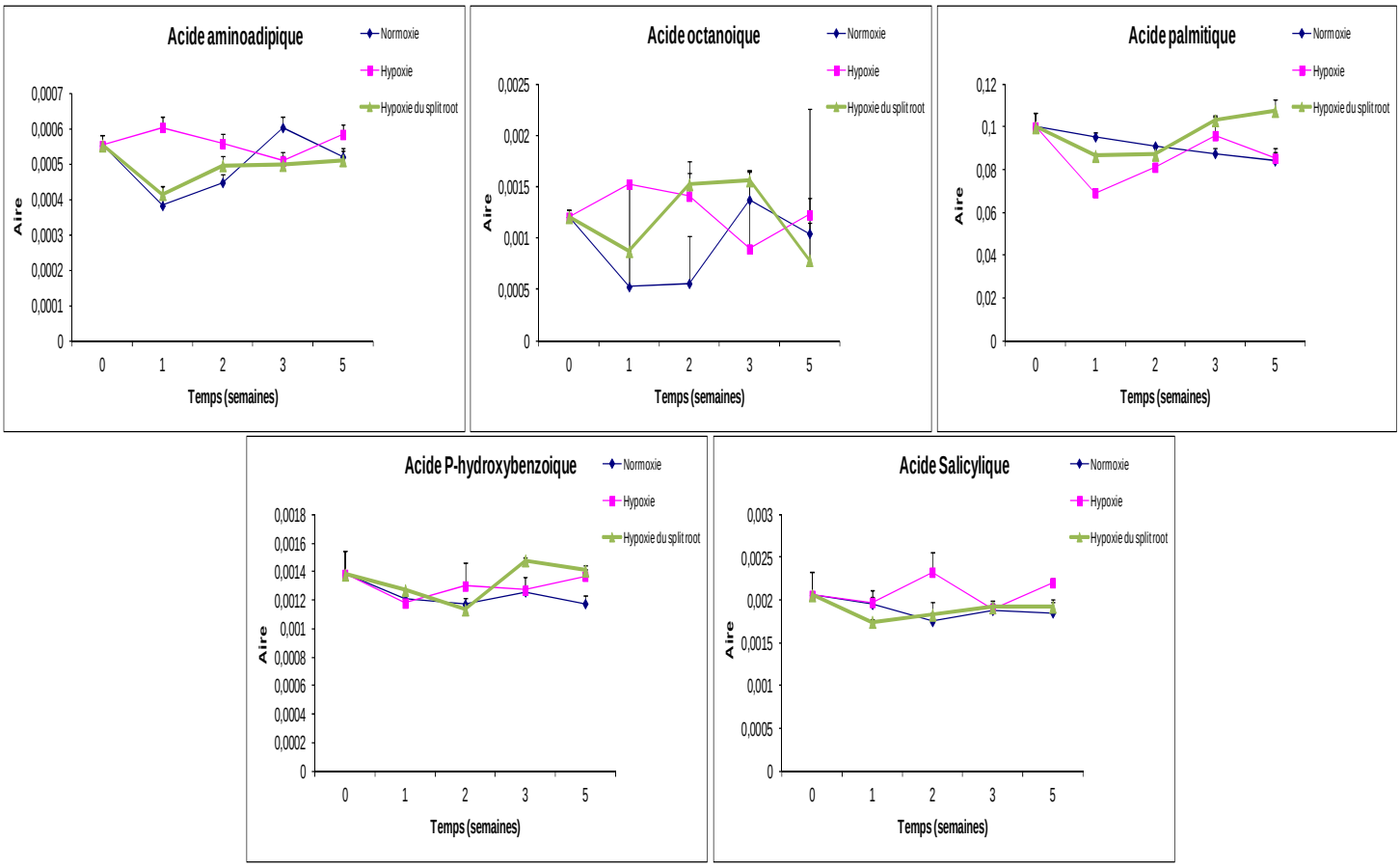


Figure IV.29 : Graphes d'évolution de l'acide aminoadipique, octanoique, palmitique, P-hydroxybenzoique et salicylique, dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

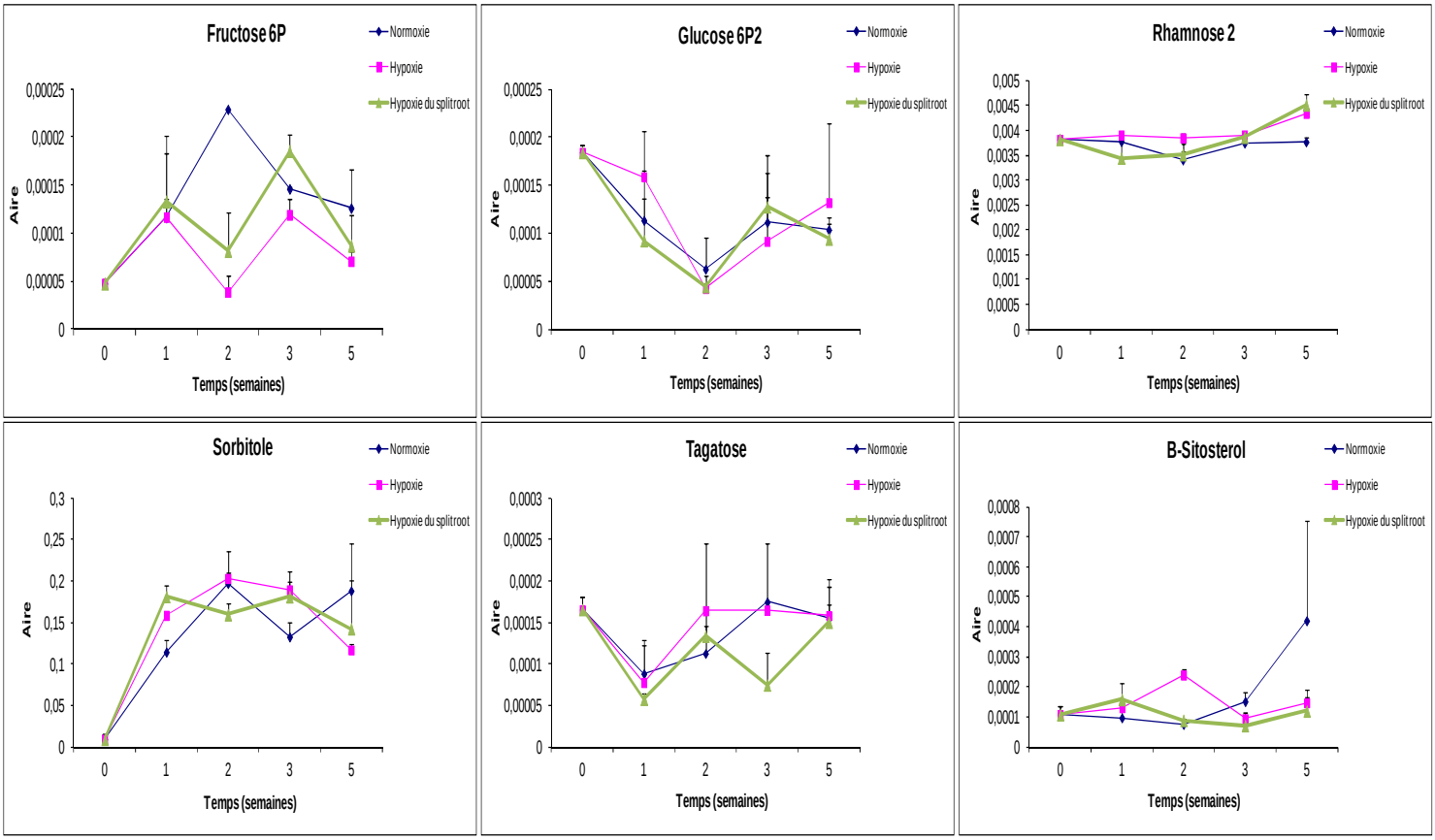


Figure IV.30 : Graphes d'évolution des sucres non affectés par le stress hypoxique racinaire (fructose 6P, glucose 6P2, rhamnose 2, sorbitol, tagatose et B-sitostérol), dans la partie aérienne des plantes en « hypoxie racinaire totale», « hypoxie racinaire partielle » et « témoins » en fonction du temps (en semaines) de traitement.

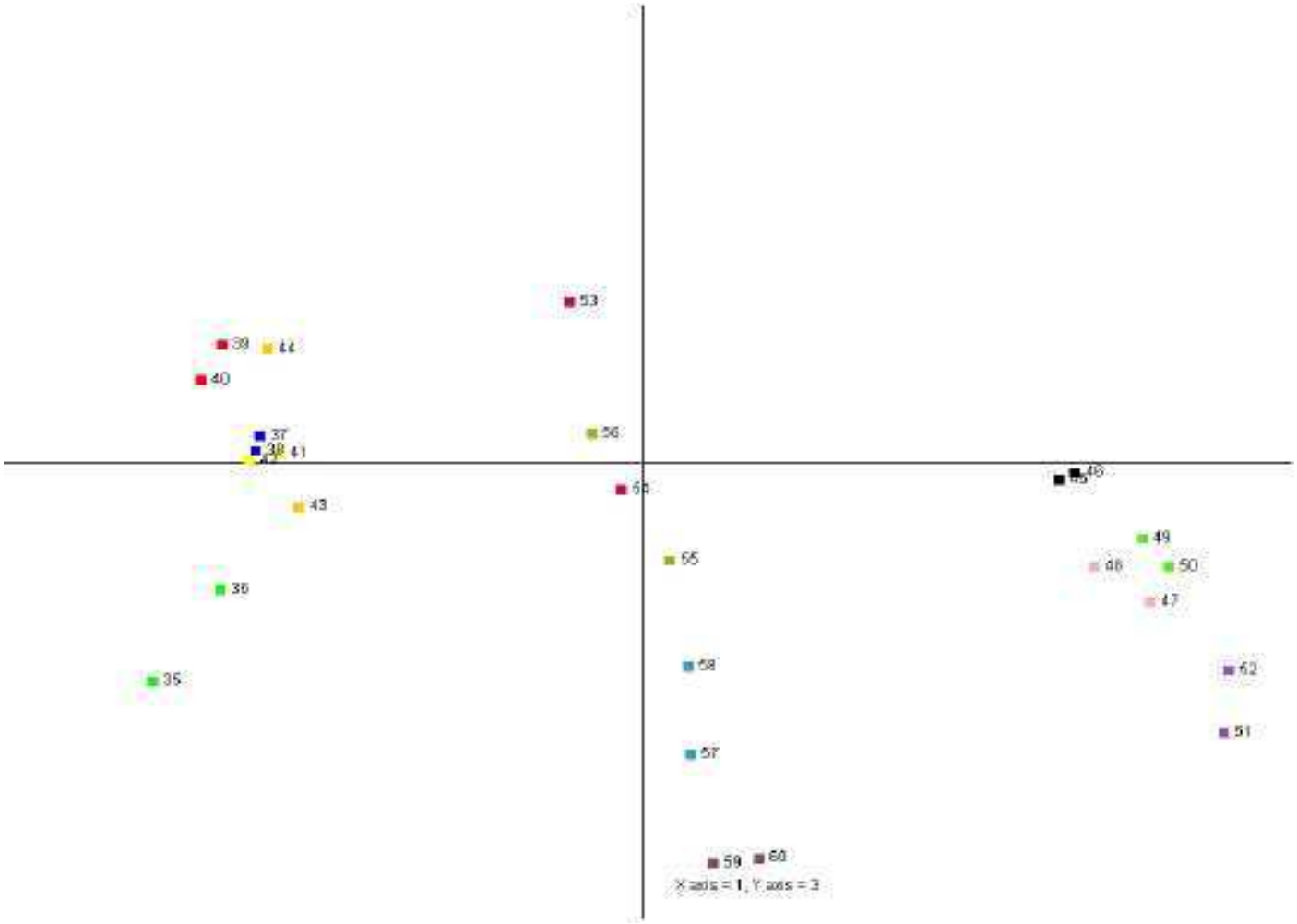


Figure IV.31 : Projection des échantillons des parties aériennes des deux groupes, en hypoxie totale et en hypoxie partielle, sur les axes de l'ACP et leur répartition en groupes présentant des similarités et montrant les corrélations entre eux, comparés à ceux du groupe témoin.

Condition / Temps	Témoin Normoxie	Hypoxie totale	Hypoxie partielle
T=1	37-38	45-46	53-54
T=2	39-40	47-48	55-56
T=3	41-42	49-50	57-58
T=5	43-44	51-52	59-60

Tableau IV.6 : Tableau d'analyses de la variance à deux facteurs présentant les différentes conditions expérimentales étudiées en fonction du temps (semaines) dans la partie aérienne. Le temps T=0 semaine n'a pas été défini car, à ce temps, nous ne disposons pas de données pour les conditions « hypoxie ». Les échantillons 1 et 2 (T=0 - témoin) n'ont donc été assignés à aucun groupe.

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
GalactosylG	0.001%	0.000%	0.157%
Ile	0.001%	0.000%	1.280%
Mannose 1	0.001%	0.000%	0.096%
Maltose 2	0.004%	0.000%	0.009%
Val	0.006%	0.000%	1.976%
Digalactosyl	0.009%	0.000%	0.086%
Lactose 2	0.011%	0.000%	0.734%
HSer	0.012%	0.000%	0.014%
T-Ferulic ac	0.012%	0.000%	1.530%
Sucrose	0.012%	0.000%	0.114%
Trehalose	0.014%	0.000%	1.751%
Glycerol	0.014%	0.000%	0.432%
Uracil	0.016%	0.000%	5.707%
PheAla	0.019%	0.000%	2.253%
Shikimic ac	0.019%	0.000%	0.588%
Nicotinic ac	0.021%	0.000%	22.708%
Thr	0.024%	0.003%	0.853%
Gly	0.025%	0.000%	2.893%
Rhamnose 1	0.025%	0.000%	7.755%
Leu	0.031%	0.000%	8.312%
Succinic ac	0.031%	0.000%	0.386%
Putrescine	0.038%	0.000%	0.007%
Met	0.038%	19.328%	48.089%
Glucose 2	0.039%	0.000%	2.613%
Malonic ac	0.045%	0.000%	0.000%
Tetradec	0.047%	0.000%	0.448%
Lys	0.073%	0.000%	3.827%
Threitol d2	0.096%	0.000%	0.397%
Myo-inositol	0.100%	0.000%	1.059%
Threitol	0.102%	0.000%	0.918%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Ascorbic d1	0.112%	0.000%	9.993%
Tyr	0.120%	0.000%	0.097%
Lauric ac	0.125%	0.001%	0.363%
Arabinose	0.132%	0.000%	2.362%
Ser	0.138%	0.000%	2.384%
Threonic ac	0.164%	0.000%	0.792%
Threonic lac	0.178%	0.000%	0.826%
Rhamnose 2	0.183%	3.128%	9.735%
Xylose 1	0.279%	0.000%	4.687%
Xylose 2	0.318%	0.000%	3.248%
Maleic ac	0.323%	0.000%	0.740%
Pro	0.335%	0.000%	0.761%
Decanoic ac	0.346%	0.001%	5.962%
Trp	0.378%	0.000%	3.409%
Maltose 1	0.437%	0.000%	2.875%
Pyroglu	0.492%	0.000%	1.399%
Linoleic ac	0.552%	0.001%	5.640%
Benzoic ac	0.568%	0.000%	0.364%
Galactonic ac	0.577%	0.000%	1.894%
Urea	0.590%	0.000%	4.332%
Pyruvic ac	0.668%	1.436%	73.411%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Ethanolamine	0.698%	1.275%	17.885%
B-Ala	0.908%	0.003%	7.309%
GABA	0.910%	0.745%	26.176%
Fumaric ac	1.008%	0.000%	7.274%
A-Ala	1.169%	0.041%	30.459%
Palmitic ac	1.196%	0.187%	0.544%
glycerol 3P	1.277%	0.004%	0.216%
Fructose 2	1.383%	0.000%	3.714%
Pipecolic ac	1.508%	0.006%	5.043%
Glyceric ac	1.662%	0.000%	0.515%
P-Coumaric	1.754%	0.002%	3.880%
Fructose 1	1.949%	0.000%	5.257%
2,4bis OH-But	2.018%	0.056%	7.510%
Spermidine	2.082%	0.034%	26.607%
Gln d1	2.179%	0.002%	0.500%
Malonic tris	2.261%	0.000%	55.175%
Citramalic	2.318%	0.000%	0.062%
A-ketoglu2	2.364%	0.559%	3.685%
Hexanoic ac	2.622%	0.000%	10.094%
Linolenic ac	3.193%	0.001%	0.266%
Glycolic ac	3.697%	0.004%	0.541%

Tableau IV.7 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «temps» dans la partie aérienne. Plus le p-value est faible, plus la variation du métabolite n'est significative. La valeur 0.000% correspond à une valeur inférieure à 0.0005%.

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Mannitol	7.603%	0.000%	0.843%
Malonic ac	0.045%	0.000%	0.000%
Sucrose	0.012%	0.000%	0.114%
Pro	0.335%	0.000%	0.761%
Tyr	0.120%	0.000%	0.097%
Asn	6.893%	0.000%	0.438%
Trehalose	0.014%	0.000%	1.751%
Glucose 2	0.039%	0.000%	2.613%
Maltose 2	0.004%	0.000%	0.009%
Glu	13.979%	0.000%	1.578%
Fructose 2	1.383%	0.000%	3.714%
Xylose 1	0.279%	0.000%	4.687%
Xylose 2	0.318%	0.000%	3.248%
Lactose 2	0.011%	0.000%	0.734%
Malic ac	15.253%	0.000%	2.545%
Gln	8.971%	0.000%	6.915%
Fructose 1	1.949%	0.000%	5.257%
Putrescine	0.038%	0.000%	0.007%
T-Ferulic ac	0.012%	0.000%	1.530%
Myo-inositol	0.100%	0.000%	1.059%
Ile	0.001%	0.000%	1.280%
Citric ac	5.361%	0.000%	0.831%
Asp	14.026%	0.000%	15.810%
HSer	0.012%	0.000%	0.014%
Arabinose	0.132%	0.000%	2.362%
Malonic tris	2.261%	0.000%	55.175%
Leu	0.031%	0.000%	8.312%
Threonic ac	0.164%	0.000%	0.792%
Threitol d2	0.096%	0.000%	0.397%
Val	0.006%	0.000%	1.976%
Trp	0.378%	0.000%	3.409%
Ribose	6.402%	0.000%	2.883%
Ascorbic ac	16.530%	0.000%	76.995%
Pyroglu	0.492%	0.000%	1.399%
Phosphoric ac	87.535%	0.000%	41.205%
Ribonic ac	7.489%	0.000%	4.431%
Ascorbic d1	0.112%	0.000%	9.993%
Threitol	0.102%	0.000%	0.918%
Orn	7.021%	0.000%	20.877%
Citramalic	2.318%	0.000%	0.062%
Glucose 1	50.719%	0.000%	2.860%
Galactose 1	9.192%	0.000%	4.750%
Threonic lac	0.178%	0.000%	0.826%
Urea	0.590%	0.000%	4.332%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Mannose 1	0.001%	0.000%	0.096%
Succinic ac	0.031%	0.000%	0.386%
Nicotinic ac	0.021%	0.000%	22.708%
Gly	0.025%	0.000%	2.893%
Maleic ac	0.323%	0.000%	0.740%
PheAla	0.019%	0.000%	2.253%
Uracil	0.016%	0.000%	5.707%
Fumaric ac	1.008%	0.000%	7.274%
Lys	0.073%	0.000%	3.827%
Glycerol	0.014%	0.000%	0.432%
Digalactosyl	0.009%	0.000%	0.086%
Galactonic ac	0.577%	0.000%	1.894%
Maltose 1	0.437%	0.000%	2.875%
Shikimic ac	0.019%	0.000%	0.588%
GalactosylG	0.001%	0.000%	0.157%
Melibiose 1	13.663%	0.000%	8.593%
Rhamnose 1	0.025%	0.000%	7.755%
Tetradec	0.047%	0.000%	0.448%
Benzoic ac	0.568%	0.000%	0.364%
Glucaric ac	6.482%	0.000%	7.302%
Threonic lac2	29.460%	0.000%	24.693%
A-OHButyric	8.366%	0.000%	17.824%
Glyceric ac	1.662%	0.000%	0.515%
Hexanoic ac	2.622%	0.000%	10.094%
Ser	0.138%	0.000%	2.384%
Linoleic ac	0.552%	0.001%	5.640%
Stearic ac	19.175%	0.001%	11.824%
Lauric ac	0.125%	0.001%	0.363%
Linolenic ac	3.193%	0.001%	0.266%
Decanoic ac	0.346%	0.001%	5.962%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Gln d1	2.179%	0.002%	0.500%
P-Coumaric	1.754%	0.002%	3.880%
B-Ala	0.908%	0.003%	7.309%
Thr	0.024%	0.003%	0.853%
glycerol 3P	1.277%	0.004%	0.216%
Glycolic ac	3.697%	0.004%	0.541%
Phosphoric	51.994%	0.004%	1.566%
Pipecolic ac	1.508%	0.006%	5.043%
Fucose 2	73.276%	0.010%	0.203%
Gluconic ac	6.110%	0.026%	3.102%
Spermidine	2.082%	0.034%	26.607%
Arg	24.754%	0.035%	6.795%
A-Ala	1.169%	0.041%	30.459%
glycerol 2P	26.342%	0.053%	14.047%
2,4bis OH-But	2.018%	0.056%	7.510%
2-Ohglutar	20.288%	0.089%	15.341%
T-Aconitic	85.730%	0.105%	56.749%
Palmitic ac	1.196%	0.187%	0.544%
Lactic ac	5.508%	0.267%	40.670%
Levoglucosan	32.651%	0.301%	93.776%
Galactinol	37.995%	0.373%	46.592%
A-ketoglu2	2.364%	0.559%	3.685%
GABA	0.910%	0.745%	26.176%
Ethanolamine	0.698%	1.275%	17.885%
Lactose 1	40.412%	1.278%	21.175%
Salicylic ac	62.598%	1.350%	18.872%
Pyruvic ac	0.668%	1.436%	73.411%
Galacturo 1	86.659%	1.782%	90.502%
Rhamnose 2	0.183%	3.128%	9.735%

Tableau IV.8 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «condition» dans la partie aérienne. Plus le p-value est faible, plus la variation du métabolite n'est significative. La valeur 0.000% correspond à une valeur inférieure à 0.0005%.

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Malonic ac	0.045%	0.000%	0.000%
Putrescine	0.038%	0.000%	0.007%
Maltose 2	0.004%	0.000%	0.009%
HSer	0.012%	0.000%	0.014%
Citramalic	2.318%	0.000%	0.062%
Digalactosyl	0.009%	0.000%	0.086%
Mannose 1	0.001%	0.000%	0.096%
Tyr	0.120%	0.000%	0.097%
Sucrose	0.012%	0.000%	0.114%
GalactosylG	0.001%	0.000%	0.157%
Fucose 2	73.276%	0.010%	0.203%
glycerol 3P	1.277%	0.004%	0.216%
Linolenic ac	3.193%	0.001%	0.266%
Lauric ac	0.125%	0.001%	0.363%
Benzoic ac	0.568%	0.000%	0.364%
Succinic ac	0.031%	0.000%	0.386%
Threitol d2	0.096%	0.000%	0.397%
Glycerol	0.014%	0.000%	0.432%
Asn	6.893%	0.000%	0.438%
Tetradec	0.047%	0.000%	0.448%
Gln d1	2.179%	0.002%	0.500%
Glyceric ac	1.662%	0.000%	0.515%
Glycolic ac	3.697%	0.004%	0.541%
Palmitic ac	1.196%	0.187%	0.544%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Shikimic ac	0.019%	0.000%	0.588%
Lactose 2	0.011%	0.000%	0.734%
Maleic ac	0.323%	0.000%	0.740%
Pro	0.335%	0.000%	0.761%
Threonic ac	0.164%	0.000%	0.792%
Threonic lac	0.178%	0.000%	0.826%
Citric ac	5.361%	0.000%	0.831%
Mannitol	7.603%	0.000%	0.843%
Thr	0.024%	0.003%	0.853%
Threitol	0.102%	0.000%	0.918%
Myo-inositol	0.100%	0.000%	1.059%
Ile	0.001%	0.000%	1.280%
Pyroglu	0.492%	0.000%	1.399%
T-Ferulic ac	0.012%	0.000%	1.530%
Phosphoric	51.994%	0.004%	1.566%
Glu	13.979%	0.000%	1.578%
Trehalose	0.014%	0.000%	1.751%
Galactonic ac	0.577%	0.000%	1.894%
Val	0.006%	0.000%	1.976%
PheAla	0.019%	0.000%	2.253%

Métabolite	Temps (p-value)	Condition (p-value)	TempsxCondition (p-value)
Arabinose	0.132%	0.000%	2.362%
Ser	0.138%	0.000%	2.384%
Malic ac	15.253%	0.000%	2.545%
Glucose 2	0.039%	0.000%	2.613%
Glucose 1	50.719%	0.000%	2.860%
Maltose 1	0.437%	0.000%	2.875%
Ribose	6.402%	0.000%	2.883%
Gly	0.025%	0.000%	2.893%
Melibiose 2	61.499%	29.182%	3.101%
Gluconic ac	6.110%	0.026%	3.102%
Xylose 2	0.318%	0.000%	3.248%
Trp	0.378%	0.000%	3.409%
A-ketoglu2	2.364%	0.559%	3.685%
Fructose 2	1.383%	0.000%	3.714%
Lys	0.073%	0.000%	3.827%
P-Coumaric	1.754%	0.002%	3.880%
Urea	0.590%	0.000%	4.332%
Ribonic ac	7.489%	0.000%	4.431%
Xylose 1	0.279%	0.000%	4.687%
Galactose 1	9.192%	0.000%	4.750%

Tableau IV.9 : Tableaux des valeurs de la « p-value », obtenues par analyse de la variance à deux facteurs, présentant les différents métabolites significatifs pour le facteur «temps x condition» dans la partie aérienne. Plus le p-value est faible, plus la variation du métabolite n'est significative. La valeur 0.000% correspond à une valeur inférieure à 0.0005%.

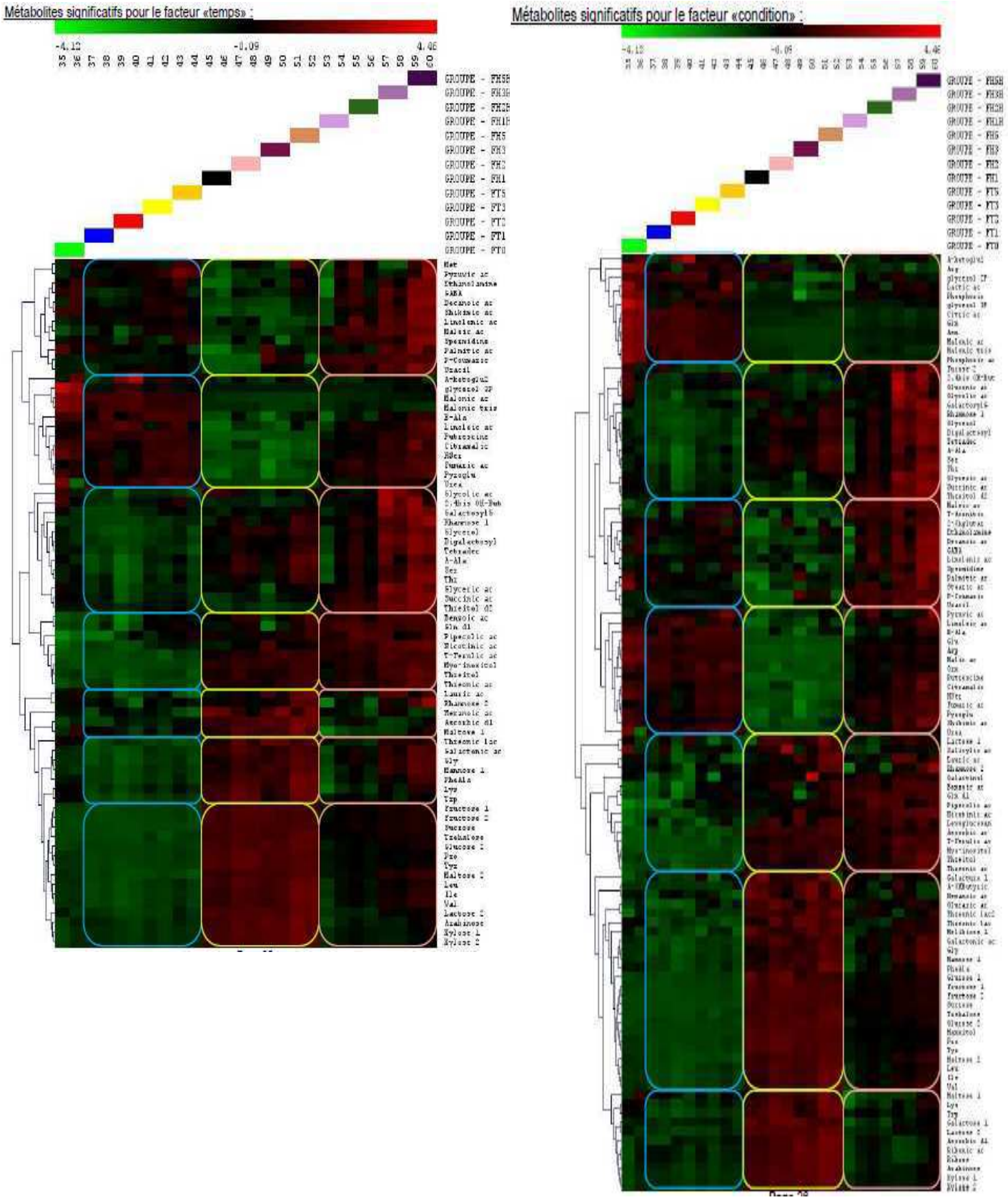


Figure IV.32 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans la partie aérienne et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps » (à gauche) et le facteur « condition » (à droite) avec le numéro associé pour chaque échantillon.

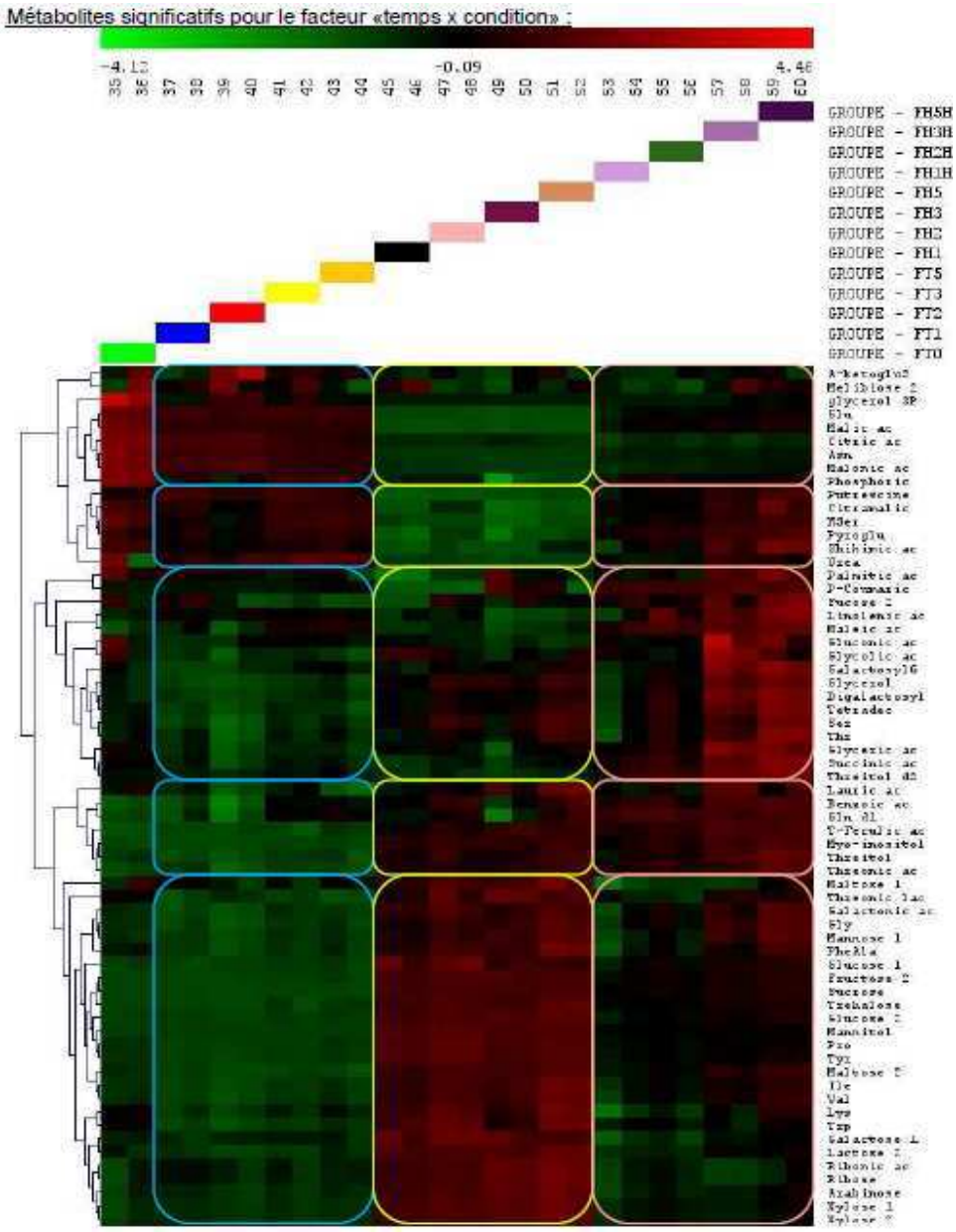


Figure IV.33 : Classification hiérarchique sous forme d'arbre (Clusterisation), des différents métabolites qui varient significativement dans la partie aérienne et qui suivent la même tendance selon le facteur « temps x condition » (à gauche) et le facteur « condition » (à droite) avec le numéro associé pour chaque échantillon.

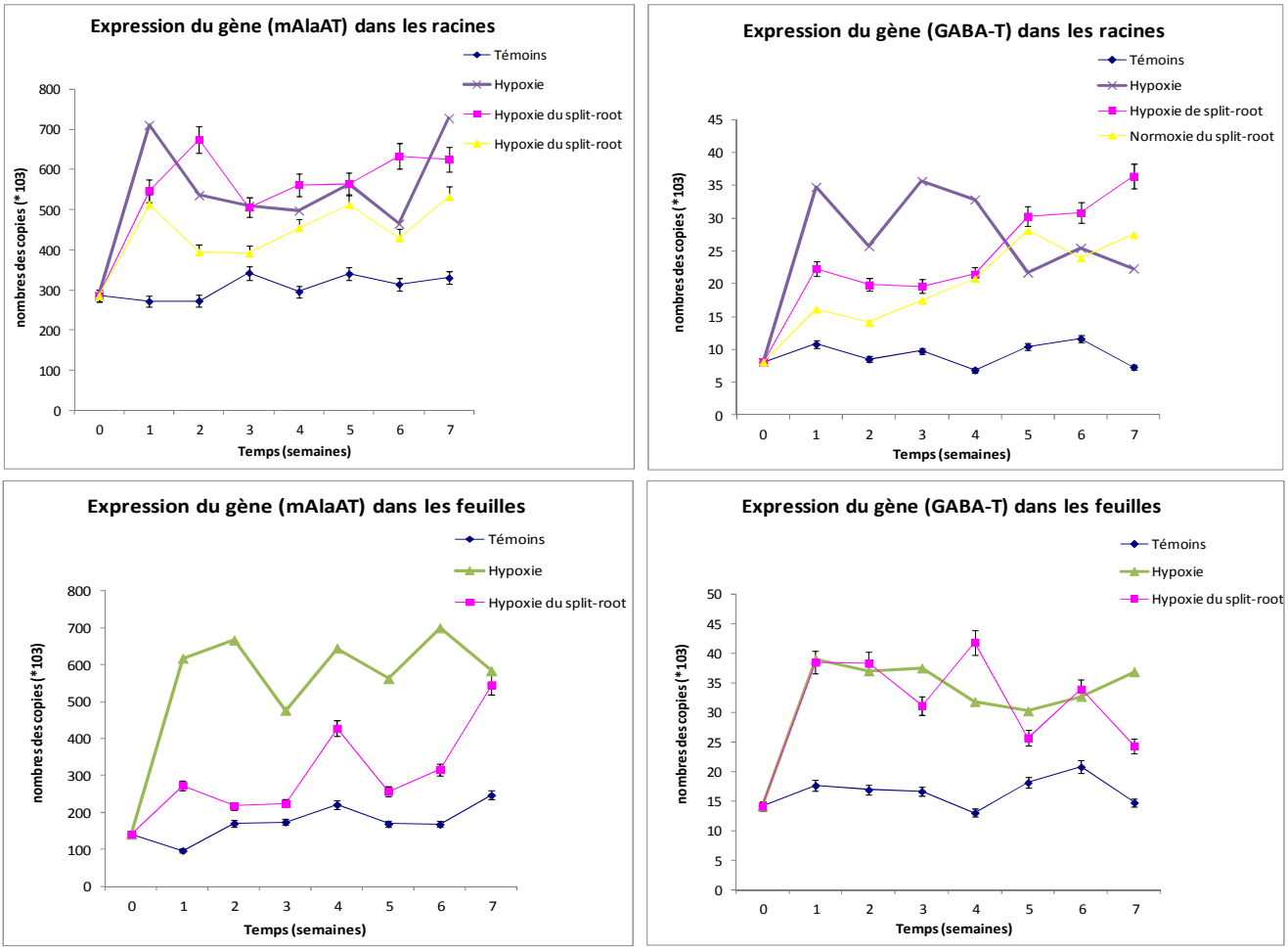


Figure IV.34 : Graphes d'évolution de l'expression des gènes « mAlaAT » (à gauche) et « GABA-T » (à droite) dans les racines et la partie aérienne des plantes sous stress hypoxique racinaire totale et partielle (split-root) en fonction du temps (en semaines) de traitement.

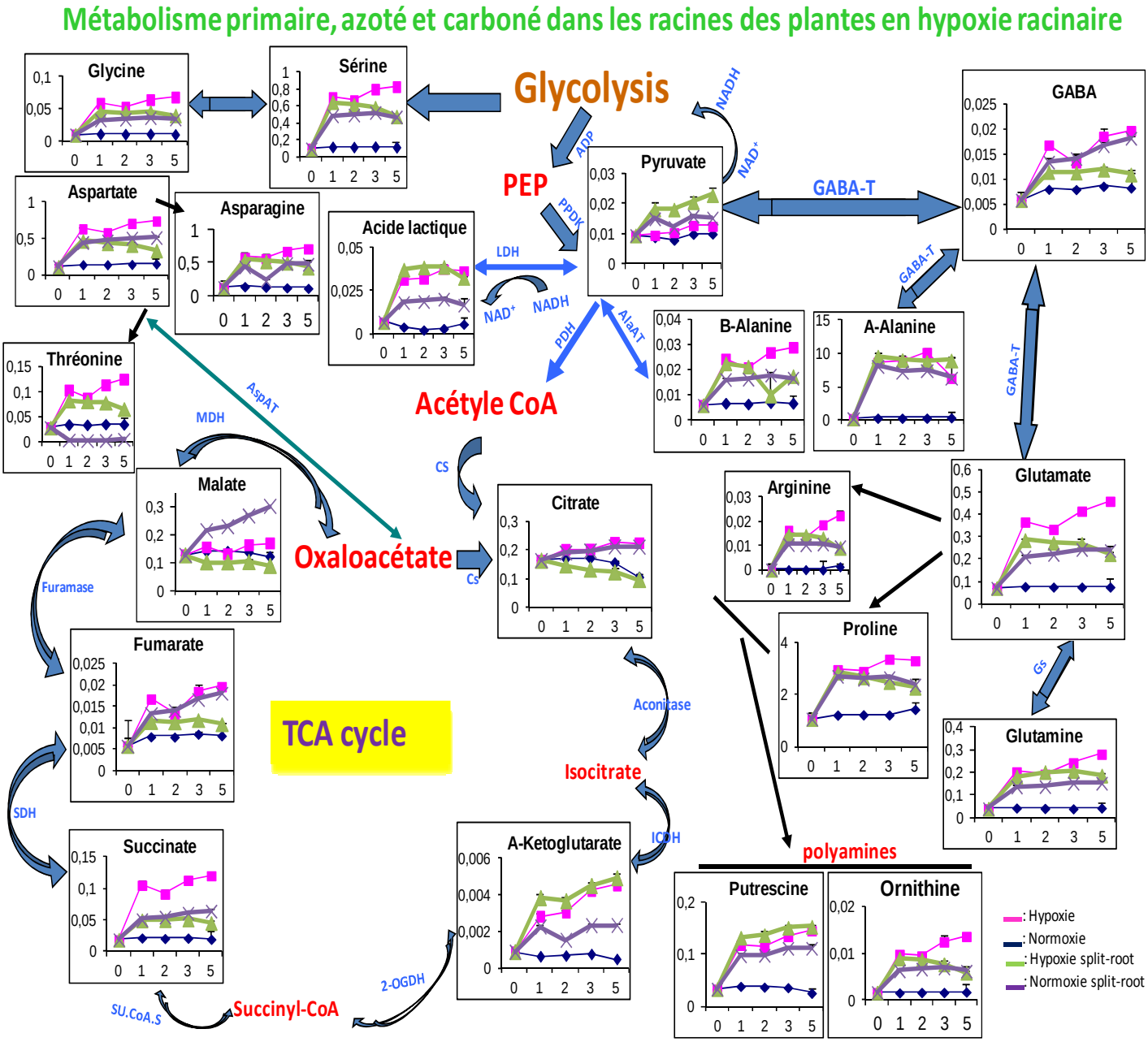


Figure IV.35 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme primaire, azoté et carboné dans les racines des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 2).

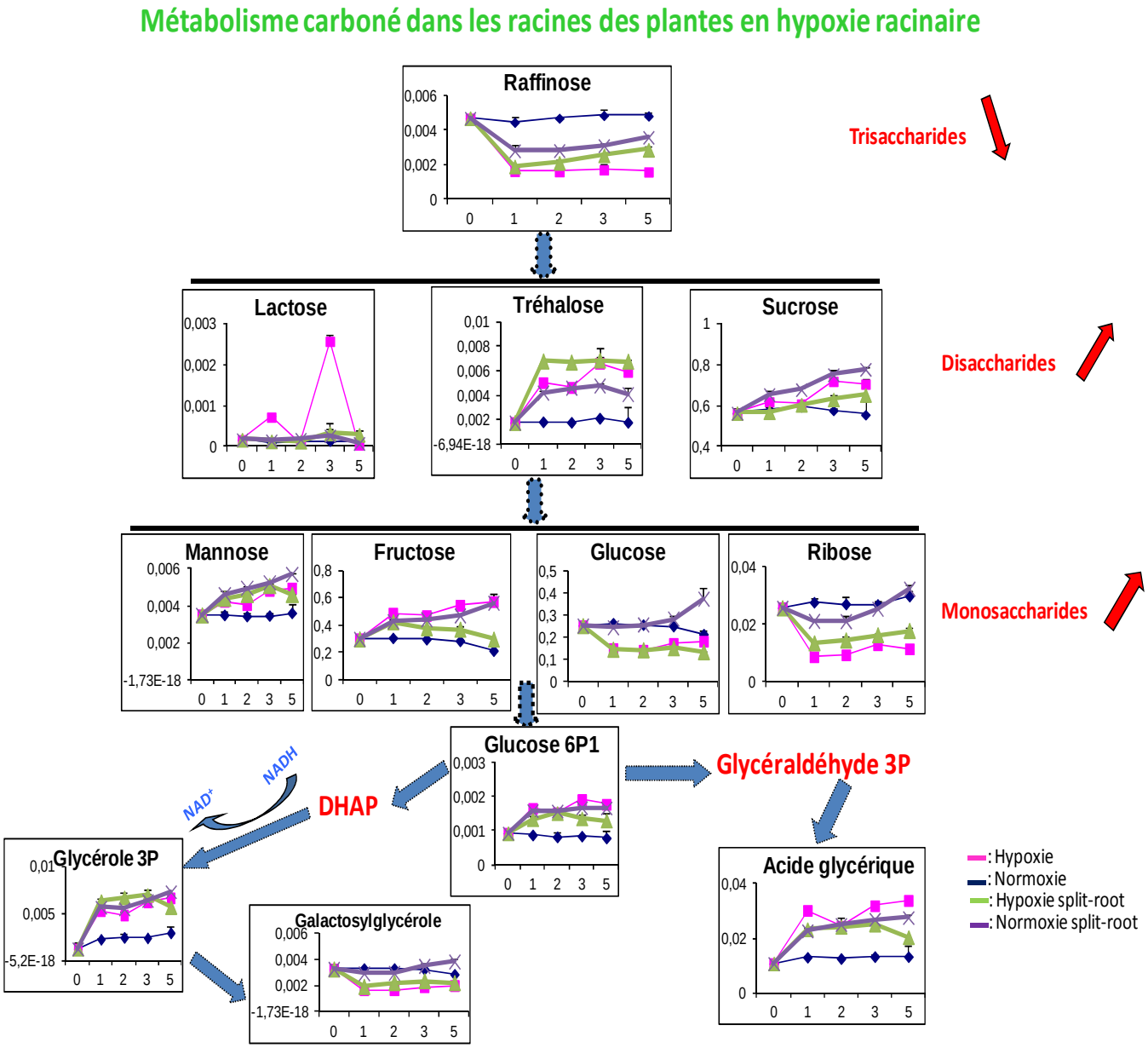


Figure IV.36 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme carboné dans les racines des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 2).

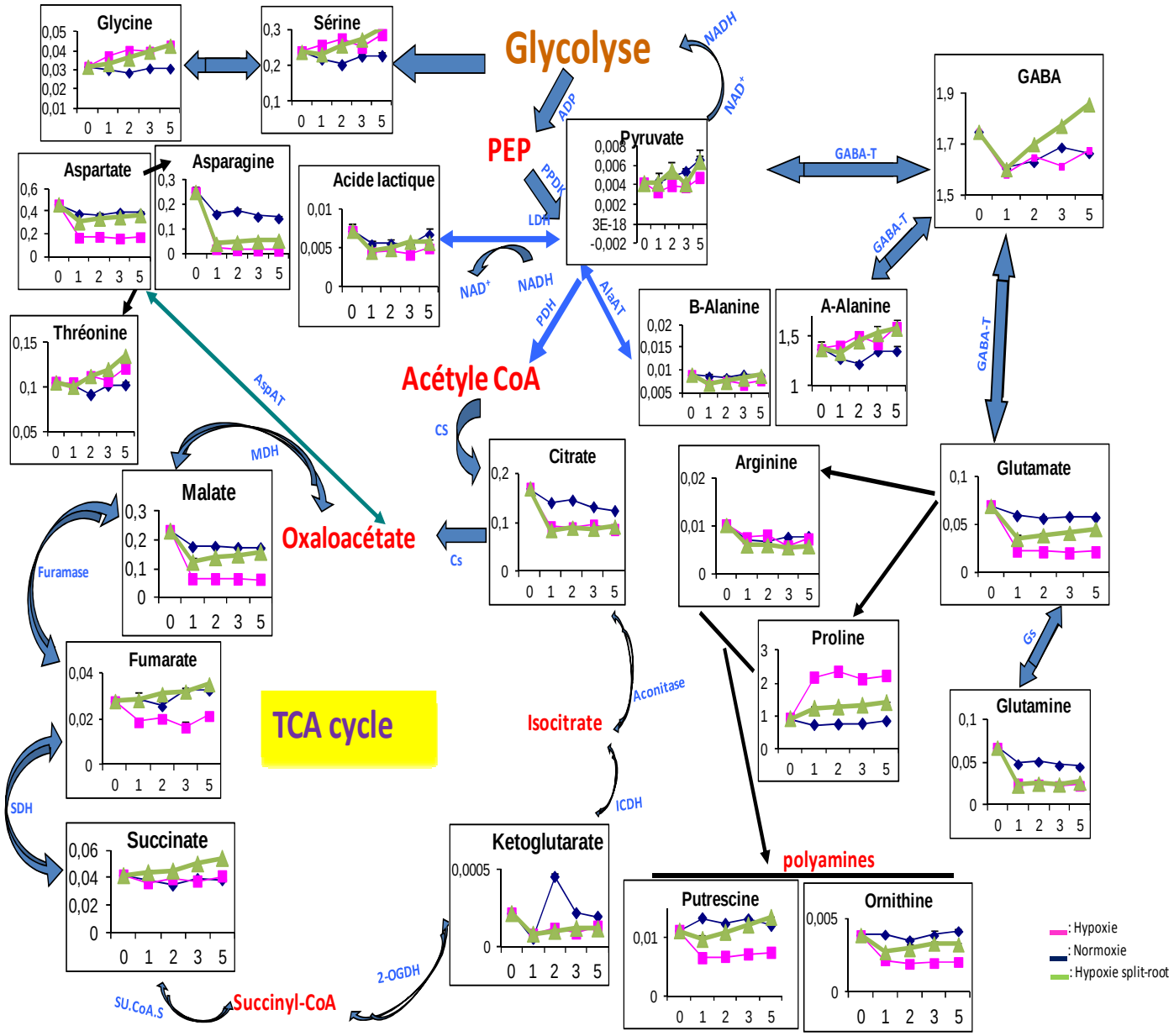


Figure IV.37 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme azoté et carboné dans la partie aérienne des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 2).

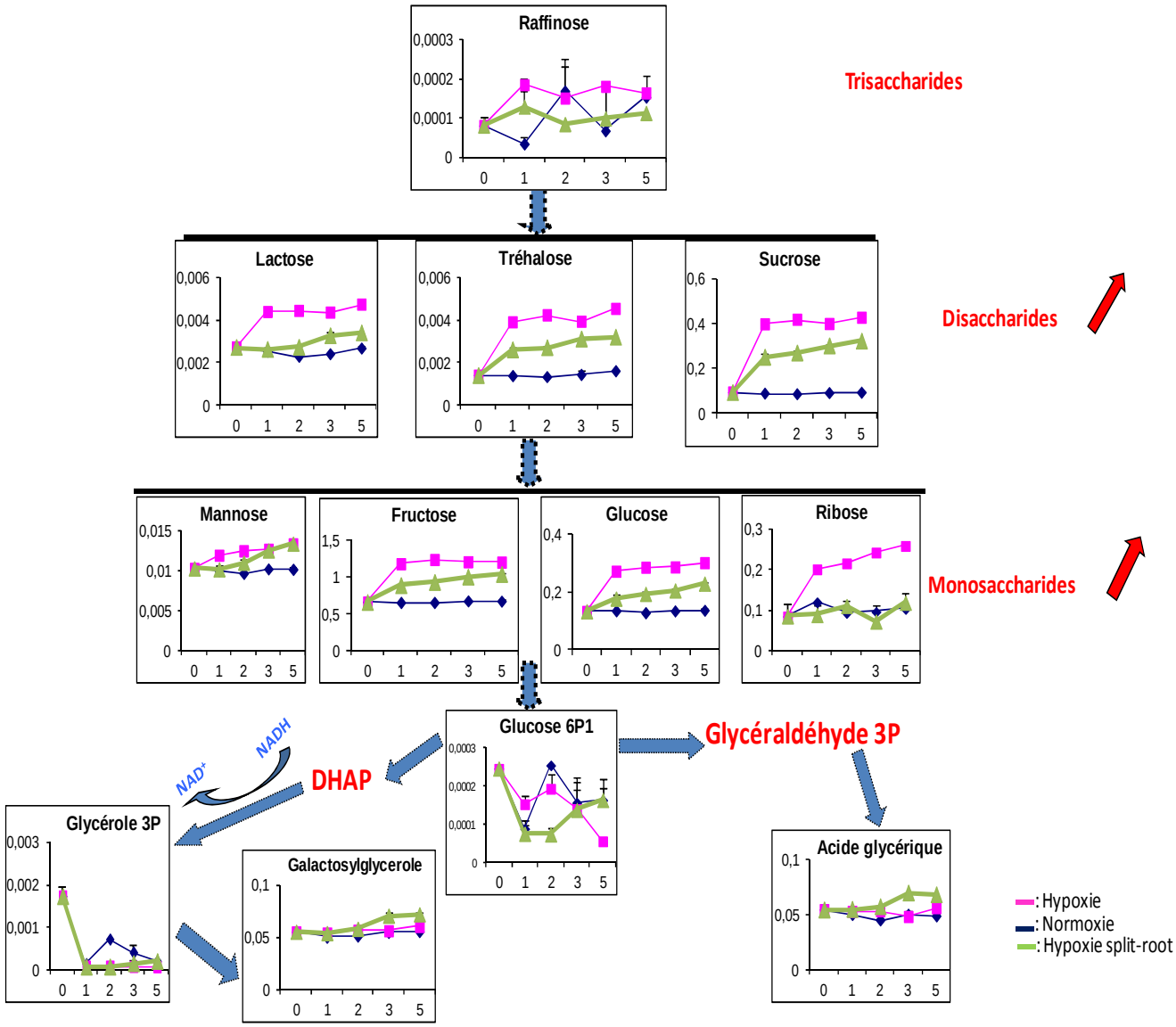


Figure IV.38 : Visualisation des changements des métabolites du métabolisme carboné dans la partie aérienne des plantes en hypoxie racinaire comparés aux plantes témoins en fonction du temps (en semaines) de traitement. Les valeurs sont présentées sous la forme de « moyenne ± erreur standard » (nb de répétition = 2).

Chapitre V : Conclusions et perspectives

Dans ce travail, nous avons étudié l'aspect physiologique de la plante et l'aspect métabolomique sous stress hypoxique racinaire.

Le stress hypoxique racinaire est un stress abiotique qui est connu pour affecter le rendement des plantes (Horchani et al., 2008), et notre objectif était d'examiner dans quelle mesure le développement et le métabolisme des plantes pourraient être affectée.

Dans nos expériences, l'application du stress hypoxique racinaire était très efficace et notre modèle d'étude est valide. Grâce à des approches interdisciplinaires de physiologie moléculaire et cellulaire, ce travail a recherché des bases métabolomiques et des caractéristiques moléculaires qui permettent aux plantes de *« Medicago trucatula »* de répondre à des conditions de stress d'hypoxie racinaire.

L'ensemble des changements par réponse à l'hypoxie racinaire : affectation considérable du développement des plantes, accumulation des acides aminés essentiels, stimulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme azoté, fonctionnement accélérée de la respiration et de la photosynthèse, accélération de la vitesse d'incorporation d'azote dans la plante, montrent les effets directs du stress hypoxique racinaire et la manière d'adaptation et d'acclimatation des plantes face à ce stress.

La réponse des plantes au stress hypoxique racinaire a été observée dans les racines (soumises en hypoxie) mais aussi bien dans la partie aérienne ; pour cela, nous nous sommes intéressés à mieux comprendre cette relation entre les deux parties de la plante par réponse à ce stress.

L'étude de la transmission du signal entre les deux parties (split-root), aérienne et racinaire, des plantes a montré que la partie aérienne et la partie racinaire (en normoxie) des plantes (en hypoxie partielle) ont aussi répondu au stress hypoxique racinaire et que cette réponse est systémique car même en mettant une petite partie des racines de la plante en hypoxie, la réponse à été détectée dans la partie aérienne et dans l'autre partie des racines en normoxie.

En général, la survie des plantes sous stress hypoxique racinaire comprend plusieurs réponses biologiques ; le contrôle du métabolisme énergétique, la disponibilité des sources d'énergie, la fourniture des produits génétiques essentiels, la synthèse des macromolécules et la protection contre l'effet post-hypoxique, représentent les principales réponses. Ces stratégies ont été étudiées depuis longtemps et les adaptations cellulaires et moléculaires, conduisant à la tolérance à l'hypoxie, sont de plus en plus évidentes. Malheureusement, les détecteurs concernés et les voies de transduction de signaux impliqués ne sont pas encore très bien

connus. Il est cependant de plus en plus évident que l'induction des réponses adaptatives dépend plus de l'efficacité de ces signaux plutôt que de leur nature.

Ce travail offre des perspectives afin d'une meilleure compréhension des aspects métabolomiques et de la communication entre la partie racinaire et aérienne des plantes par réponse au stress hypoxique racinaire. Pour aller plus loin, il serait intéressant de récupérer la sève des plantes pour y effectuer une analyse métabolomique, dans le but d'identifier les métabolites qui pourraient se transmettre depuis et vers la partie aérienne et racinaires des plantes.

D'autre part, l'étude pourrait être complétée en déterminant l'implication de chaque molécule de signalisation selon l'hypothèse suivante : plusieurs molécules interviennent dans la transmission du signal, étant qu'une voie de signalisation pourrait être commune à des stress différents (Pastori et Foyer, 2002). Par conséquent, cette hypothèse laisse supposer que la perception ou la réponse au stress hypoxique passe par des molécules intermédiaires connues en tant que des molécules signales.

La suite évidente de ce travail est l'étude de la nouvelle génération des plantes transgéniques de Medicago qui seront obtenues (travail en cours). Des tests de germinations et des études de phénotypage devraient être effectués sous stress hypoxique et ensuite en impliquant le système de split-root. En fin, l'étude du glutamate déshydrogénase (GDH) sera très intérréssant à réaliser vue son rôle important et qui pourrait être prépondérant dans la réponse à l'hypoxie racinaire.

En fin, dans ce travail, nous avons étudié l'aspect physiologique et métabolomique de la plante sous stress hypoxique racinaire. La conclusion et les perspectives de ce travail ont fait l'objet d'un article soumis au journal « Molecular Plant » et qui montre le rôle majeur de l'alanine amino transférase (AlaAT) dans la réponse de la plante au stress hypoxique racinaire et durant la phase de récupération post-hypoxie, en collaboration avec les autres enzymes du métabolisme azoté primaire, glutamate déshydrogénase, glutamine synthétase et glutamate synthase.

Running title: Reconfiguration of N metabolism upon hypoxia stress

The Versatile Role of Alanine Aminotransferase (AlaAT) in Cellular Acclimation to Hypoxia Stress and Post-Stress Recovery in Plants

Houssein Diab[1,2] and Anis M. Limami[1,2,*]

[1]University of Angers, UMR 1345 IRHS, SFR 4207 QUASAV, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers – France

[2]INRA, UMR 1345 IRHS, 2 Bd Lavoisier, F-49045 Angers - France

[*]Corresponding author: anis.limami@univ-angers.fr; phone: +33 241735446; fax: +33 241735456

The absence of a tissue or a system dedicated to oxygen uptake and delivery to the organs in plants may create localized hypoxic environments when oxygen diffusion is hindered by the anatomy and the structure of the tissue *e.g.* dense cell packing. Developing and germinating seeds, tubers, bulky fruits, meristems, germinating pollen, and the phloem are the organs the most likely to lack oxygen even when the whole plant is growing in aerobic conditions. Environmental conditions like flooding or soil waterlogging are the other major cause of more or less prolonged periods of hypoxia / anoxia due to the slow diffusion of oxygen in water and competition of the roots with respiring microorganisms. In the context of climatic change arable farmland productivity is threatened by more heavy precipitation and more frequent flooding and waterlogging events because crops were not selected to cope with oxygen limitation (Bailey-Serres et al., 2012; Bailey-Serres and Voesenek, 2008; Licausi, 2013). Consequently, like adaptation of plants to drought and saline stress, low oxygen stress deserves more interest from the scientific community and more financial support from stakeholders. Low oxygen sensing, signaling and adaptation of plants to its limitation at both cellular and whole plant levels should be investigated more thoroughly, and derived knowledge should be taken into account in breeding programs and agronomical practices for saving plant fitness, growth and development even when oxygen availability is low (Licausi, 2013).

THE ROLE OF METABOLIC ADJUSTMENT IN CELLULAR ACCLIMATION TO LOW OXYGEN STRESS

Hypoxia-induced inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation results in an energy crisis due to the reduction in ATP production that becomes insufficient to meet the needs of

energy demanding processes (Greenway and Gibbs, 2003). The increase in the rate of glycolysis and subsequent increase in substrate level ATP production tends to ameliorate the energy crisis. In plants ethanol rather than lactate fermentation regenerates NAD^+; this regeneration is crucial to maintain higher rates of glycolysis. Efficiency of this strategy for ATP production is very low, it is carbohydrates costly and it drains very quickly the carbon store of the cell leading to carbon starvation and cellular death. Therefore it appears that management of carbon reserves is crucial for survival upon hypoxia (Albrecht et al., 2004). The ability to supply the roots with carbohydrates, the substrate of alcohol fermentation during prolonged periods of soil anoxia appeared as determinant in waterlogging tolerance of the common ash (*Fraxinus excelsior*) (Jaeger et al., 2009). Similarly hypoxia/anoxia-sensitive seeds of wheat and barley do not induce amylases under hypoxic / anoxic conditions of germination in contrast to anaerobic germination-competent rice seeds (Guglielminetti et al., 1995). Comparison of microarray data of 21 organisms representing plants, animals (including *Homo sapiens*), fungi and bacteria submitted to varying degrees of oxygen deficiency showed that reconfiguration of central carbon metabolism was generally conserved across organisms (Mustroph et al., 2010). By contrast reconfiguration of nitrogen metabolism in particular amino acids metabolism via alanine fermentative pathway was activated only in plants. Alanine fermentative pathway does not regenerate NAD^+ and unlike several metabolites known for their either signaling or protective role upon stress conditions, alanine intrinsically may not play a protective role in hypoxic stress, therefore the question is how the alanine fermentative pathway provides plants with a mechanism to tolerate hypoxic stress.

ALANINE AMINOTRANSFERASE SAFEGUARD CARBON IN A NITROGEN STORE UPON HYPOXIA

Primary amino acids metabolism upon hypoxia was investigated *in vivo* through a blend of experiments using ^{15}N and ^{13}C isotope labeling and metabolomics approach (Limami et al., 2008; Oliveira and Sodek, 2013; Rocha et al., 2010). The ATP consuming enzymes glutamine synthetase (GS) and asparagine synthetase (AS) were significantly inhibited probably as part of cellular strategy to mitigate damaging effect of energy crisis. Activities of NADH-GOGAT and AlaAT increased and GABA shunt was activated. AlaAT activity was directed towards alanine synthesis using glutamate as amino donor while the reverse reaction of glutamate synthesis using alanine as amino donor was inhibited (Ricoult et al., 2006). Synthesis of alanine generates 2-oxoglutarate which can be metabolized to succinate by succinate CoA ligase in the TCA cycle, thus providing additional ATP per molecule of sucrose metabolized (Rocha et al., 2010). The reductive amination of 2-oxoglutarate by GOGAT during hypoxic stress appears however as crucial, the inhibition of GOGAT with azaserine disturbed alanine accumulation and blocked germination and seedling establishment of *Medicago truncatula* under hypoxia/anoxia (Ricoult et al., 2005). Upon hypoxic stress GOGAT may fulfill two major roles, regeneration of glutamate, the substrate of AlaAT and the second is the oxidation of NADH, thus making NAD^+ available to enable glycolysis to proceed (Limami et al., 2008). In total it appears as if the decrease in glutamate utilization by GS and AS was compensated for by increased NADH-GOGAT and AlaAT leading to alanine synthesis and accumulation as a carbon and nitrogen store readily utilizable during post-stress recovery. Alanine may accumulate upon hypoxia via GABA-Transaminase that can use pyruvate as amino acceptor for succinic semialdehyde synthesis. However *Arabidopsis thaliana* GABA- Transaminase null mutants accumulated only slightly less alanine upon hypoxia compared with wild-type indicating that AlaAT pathway might be the major route for alanine accumulation upon hypoxia (Miyashita et al., 2007; Miyashita and Good, 2007).

ALANINE AMINOTRANSFERASE / GLUTAMTE DEHYDROGENASE CYCLE MOBILIZES CARBON FROM THE NITROGEN STORE

In plants GDH was shown to be induced and to operate in the direction of glutamate deamination to provide carbon skeletons and reducing equivalents by several abiotic stresses leading to carbon shortage and C / N ratio imbalance (Fontaine et al., 2012; Glevarec et al., 2004). The role of GDH under oxygen limitation received little attention compared to other stresses. However available data showed unequivocally that the expression of the gene encoding GDH is upregulated by waterlogging-induced hypoxia like in *Medicago truncatula* roots. Depletion of sugar stores upon hypoxia as a consequence of increased glycolysis is favorable for increasing the expression of GDH encoding gene. This observation poses the question whether GDH by operating exceptionally in the direction of glutamate synthesis (Skopelitis et al., 2006) would participate to the regeneration of NAD^+ that is crucial for keeping glycolysis operational upon hypoxic conditions and glutamate the substrate of AlaAT. This question was answered, first *in vitro* and native PAGE staining showed that GDH activity was significantly decreased upon waterlogging-induced hypoxia and second *in vivo* $^{15}NH_4^+$ labeling in the presence and absence of the GS-inhibitor methionine sulfoximine (MSX) in combination with GC-MS amino acids analyses indicated that the residual GDH activity was not operating in the direction of glutamate synthesis (Limami et al., 2008). Therefore, according to a concept developed by Drew (Drew, 1997) that the return to aerobic conditions is anticipated in plants subjected to hypoxic stress by expressing genes whose products have functions during the subsequent recovery period, the induction of the gene encoding GDH upon hypoxia was interpreted as anticipation on the return to aerobic conditions. The enzyme would regenerate 2-oxoglutarate by deaminating glutamate during the post-stress recovery period (Limami et al., 2008). The post-translational regulation of GDH from tail muscle of the freshwater crayfish *Orconectes virilis* (Dawson and Storey, 2012)

supports this hypothesis. The authors presented evidences that GDH was phosphorylated under oxygen limitation and the physiological consequence of this was the reduction of its activity in order to shut off the bridge point between C and N pathways until the return to normoxia. The hypoxia inducible isoform AlaAT1 in *Arabidopsis thaliana* showed a similar pattern of regulation (Miyashita et al., 2007). Expression of the gene encoding AlaAT1 was up-regulated by hypoxic stress while the activity of the enzyme was shown to be the conversion of alanine into pyruvate and glutamate during the post-hypoxic period. Post-translational regulation of AlaAT1 was not studied however.

CONCLUSION

Altogether these results allow suggesting a model of storage and mobilization of carbon during the transition from hypoxia to post-hypoxia stress (Figure 1). During hypoxia stress pyruvate as a byproduct of glycolysis is competitively used through an AlaAT / GOGAT cycle leading to the storage of carbon in alanine. Alanine is synthesized by AlaAT using glutamate as amino donor while GOGAT uses 2-oxoglutarate to regenerate glutamate and NAD^+. During post-hypoxia recovery period carbon is mobilized through an AlaAT / GDH cycle. Alanine is deaminated by the reverse reaction of AlaAT to produce pyruvate and glutamate. Carbon is funneled to TCA cycle as pyruvate while GDH by deaminating glutamate generates 2-oxoglutarate to maintain the cycle functioning and produce reducing equivalent (NADH).

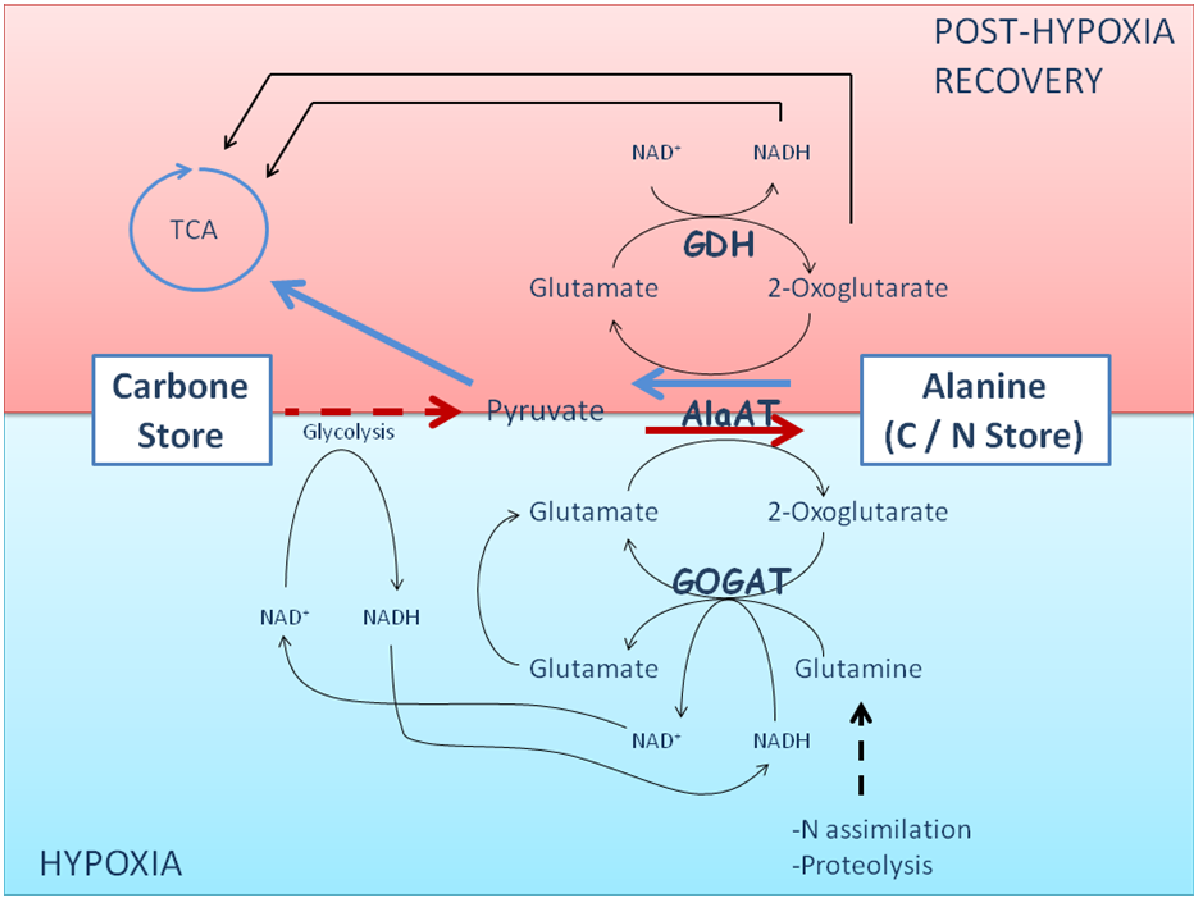


Figure 1: Schematic representation of the central role of alanine during hypoxia and post-hypoxia recovery periods. (HYPOXIA) Visualization of carbon flux from carbon storage compounds to alanine. (POST-HYPOXIA) Visualization of alanine mobilization through AlaAT/GDH cycle and carbon flux towards TCA cycle. Scheme drawn by integrating data from studies combining ^{15}N and ^{13}C labeling and metabolomic profiling in various species such as *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana* (Limami et al. 2008, Miyashita et al. 2007, Rocha et al. 2010 and unpublished data).

References

Albrecht, G., Mustroph, A., and Theodore, C. (2004). Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots. Physiologia Plantarum 120:93-104.

Bailey-Serres, J., et al. (2012). Making sense of low oxygen sensing. Trends Plant Sci 17:129-138.

Bailey-Serres, J., and Voesenek, L.A. (2008). Flooding stress: acclimations and genetic diversity. Annu Rev Plant Biol 59:313-339.

Dawson, N.J., and Storey, K.B. (2012). An enzymatic bridge between carbohydrate and amino acid metabolism: regulation of glutamate dehydrogenase by reversible phosphorylation in a severe hypoxia-tolerant crayfish. J Comp Physiol B 182:331-340.

Drew, M.C. (1997). OXYGEN DEFICIENCY AND ROOT METABOLISM: Injury and Acclimation Under Hypoxia and Anoxia doi:10.1146/annurev.arplant.48.1.223. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48:223-250.

Fontaine, J.X., et al. (2012). Characterization of a NADH-dependent glutamate dehydrogenase mutant of Arabidopsis demonstrates the key role of this enzyme in root carbon and nitrogen metabolism. Plant Cell 24:4044-4065.

Glevarec, G., et al. (2004). Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume Medicago truncatula. Planta 219:286-297.

Greenway, H., and Gibbs, J. (2003). Mecahnisms of anoxia tolerance in plants. II. Energy requirements for maintainance and energy distribution to essential processes. Functional Plant Biology 30:37.

Guglielminetti, L., Perata, P., and Alpi, A. (1995). Effect of Anoxia on Carbohydrate Metabolism in Rice Seedlings. Plant Physiol 108:735-741.

Jaeger, C., Gessler, A., Biller, S., Rennenberg, H., and Kreuzwieser, J. (2009). Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging 10.1093/jxb/erp268. J. Exp. Bot. 60:4335-4345.

Licausi, F. (2013). Molecular elements of low-oxygen signaling in plants. Physiol Plant 148:1-8.

Limami, A.M., Glevarec, G., Ricoult, C., Cliquet, J.-B., and Planchet, E. (2008). Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young Medicago truncatula seedlings under hypoxic stress 10.1093/jxb/ern102. J. Exp. Bot. 59:2325-2335.

Miyashita, Y., Dolferus, R., Ismond, K.P., and Good, A.G. (2007). Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in Arabidopsis thaliana. Plant J 49:1108-1121.

Miyashita, Y., and Good, A.G. (2007). Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol.

Mustroph, A., et al. (2010). Cross-Kingdom Comparison of Transcriptomic Adjustments to Low-Oxygen Stress Highlights Conserved and Plant-Specific Responses 10.1104/pp.109.151845. Plant Physiol. 152:1484-1500.

Oliveira, H.C., and Sodek, L. (2013). Effect of oxygen deficiency on nitrogen assimilation and amino acid metabolism of soybean root segments. Amino Acids 44:743-755.

Ricoult, C., Cliquet, J.-B., and Limami, A.M. (2005). Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume Medicago truncatula contribute to anoxia stress tolerance. Physiologia Plantarum 123:30-39.

Ricoult, C., Echeverria, L.O., Cliquet, J.B., and Limami, A.M. (2006). Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume Medicago truncatula. J Exp Bot 57:3079-3089.

Rocha, M., et al. (2010). Glycolysis and the Tricarboxylic Acid Cycle Are Linked by Alanine Aminotransferase during Hypoxia Induced by Waterlogging of Lotus japonicus 10.1104/pp.109.150045. Plant Physiol. 152:1501-1513.

Skopelitis, D.S., et al. (2006). Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. Plant Cell 18:2767-2781.

Références bibliographiques

- **Albrecht G, Mustroph A** (2003) Localization of sucrose synthase in wheat roots: increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia. Planta **217**: 252-60

- **Allègre A, Silvestre J, Morard P, Kallerhoff J, Pinelli E** (2004) Nitrate reductase regulation in tomato roots by exogenous nitrate: a possible role in tolerance to long-term root anoxia. J Exp Bot **408**: 2625-34

- **Andrews DL, MacAlpine DM, Johnson JR, Kelley PM, Cobb BG, Drew MC** (1994) Differential induction of mRNAs for the glycolytic and ethanolic fermentative pathways by hypoxia and anoxia in maize seedlings. Plant Physiol **106**:1575-82

- **Andurand J, Coulmier D, Despres JL, Rambourg JC** (2010) Extraction industrielle de protéines et de pigments chez la luzerne : état des lieux et perspectives. Innovations Agronomiques **11** : 147-156

- **Ané JM, Zhu H, Frugoli J** (2008) Recent Advances in Medicago truncatula Genomics. Int J Plant Genomics 2008, 256597

- **Arbona V, Gomez-Cadenas A** (2008) Hormonal modulation of citrus responses to flooding. J Plant Growth Regul, **27**: 241–250

- **Armstrong W** (1979) Aeration in higher plants. Adv Bot Res **7**: 225 – 332

- **Armstrong W, Brändle R, Jackson MB** (1994) Mechanisms of flood tolerance in plants. Acta Bot Neerl **43**: 307-358

- **Arndt W** (1965a) The nature of the mechanical impedance to seedlings by soil surface seals. Australian Journal of Soil Research **3**: 45-54

- **Arndt W** (1965b) The impedance of soil seals and the forces of emerging seedlings. Australian. Journal of Soil Research **3**: 55-68

- **Aubert G, Morin J, Jacquin F, Loridon K, Quillet MC, Petit A, Rameau C, Lejeune-Hénaut I, Huguet T, Burstin J** (2006) Functional mapping in pea, as an aid to the candidate gene selection and for investigating synteny with the model legume Medicago truncatula. Theor Appl Genet, **112**: 1024-1041

- **Aubert S, Bligny R, Douce R, Gout E, Ratcliffe RG, Roberts JK** (2001) Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial glutamate metabolism studied by (13)C and (31)P nuclear magnetic resonance. J Exp Bot **52**: 37-45

- **Awadhwal NK, Thierstein GE** (1985) Soil crust and its impact on crop establishment: a review. Soil and Tillage Research **5**: 289-302

- **Azuma T, Hirano T, Deki Y, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T** (1995) Involvement of the decrease in levels of abscisic acid in the internodal elongation of submerged floating rice. J. Plant Physiol, **146**: 323–328

- **Bailey-Serres J and Voesenek L** (2008) Flooding stress: acclimations and genetic diversity. Ann Rev Plant Biol, **59**: 313–339

- **Baranger A, Hanocq E, Lecomte C, Moussart A, Pilet-Nayel ML, Lejeune-Hénaut I** (2010) Quel impact des innovations génétiques pour lever les facteurs limitant la production du pois protéagineux ? Innovations Agronomiques **11**: 59-78

- **Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Genier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T** (1990) Medicago truncatula, a model for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. Plant Mol Biol Rep, **8**: 40-49

- **Barrett-Lennard EG, Leighton P, Buwalda F, Gibbs J, Armstrong W, Thomson CJ, Greenway H** (1988) Effects of growing wheat in hypoxic nutrient solutions and of subsequent transfer to aerated solutions I. Growth and carbohydrate status of shoots and roots. Aust J Plant Physiol **15**: 585- 598

- **Belford RK** (1981) Response of winter wheat to prolonged waterlogging under outdoor conditions. J Agric Sci Camb **97**: 557- 568

- **Benjamin LR** (1990) Variation in time of seedling emergence within populations: a feature that determines individual growth and development. Advances in Agronomy **44**: 1-25

- **Benson DR, Silvester WB** (1993) Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. Microbiol Rev **57**: 293-319

- **Bewley JD** (1997) Seed Germination and Dormancy. Plant Cell **9**: 1055-1066

- **Bewley JD, Black M** (1994) Seeds: Physiology of development and germination, Plenum Press, New York

- **Biais B, Beauvoit B, William Allwood J, Deborde C, Maucourt M, Goodacre R, Rolin D, Moing A** (2010) Metabolic acclimation to hypoxia revealed by metabolite gradients in melon fruit.J Plant Physiol **167**: 242-5

- **Bierhuizen JF, Wagenvoort** (1974) Some aspects of seed germination in vegetales. I. The determination and application of heat sums and minimum temperature for germination. Scientia Horticulturae **2**: 213-219

- **Blom CW, Voesenek LA** (1996) Flooding: the survival strategies of plants. Trends Ecol Evol **11** : 290-5

- **Blondon F, Marie D, Brown S, Kondorosi A** (1994) Genome size and base composition in Medicago truncatula species. Genome **37**: 224-227

- **Bloom AJ, Caldwell RM, Finazzo J, Warner RL, Weissbart J** (1998) Oxygen and carbon dioxide fluxes from barley shoots depend on nitrate assimilation. Plant Physiol **91**: 352-6

- **Bloom AJ, Sukrapanna SS** (1990) Effects of exposure to ammonium and transplant shock upon the induction of nitrate absorption. Plant Physiol **94**: 85-90

- **Boiffin J, Durr C, Fleury A, Marin-Laflèche A, Maillet I** (1992) Analysis of the variability of sugar beet (Beta vulgaris L.) growth during the early stages. I - Influence of various conditions of crop establishment. Agronomie **12**: 515-525

- **Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Becard G, Rosenberg C, Barker D** (2001) Agrobacterium rhizogenes-transformed roots of Medicago truncatula for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. Mol Plant Microbe Interact **14**: 695–700

- **Bouaziz A, Bruckler L** (1989a) Modelling of wheat imbibition and germination as influenced by soil physical properties. Soil Science Society of America Journal **53**: 219-227

- **Bouaziz A, Bruckler L** (1989b) Modelling wheat seedling growth and emergence: I. Seedling growth affected by soil water potential. Soil Science Society of America Journal **53**: 1831-1838

- **Bouaziz A, Bruckler L** (1989c) Modelling wheat seedling growth and emergence: II. Comparison with field experiments. Soil Science Society of America Journal **53**: 1838-1846

- **Bradford KJND, Yang SF** (1980) Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. Plant Physiol **65**: 322- 326

- **Branco-Price C, Kaiser KA, Jang CJH, Larive CK, Bailey-Serres J** (2008) Selective mRNA translation coordinates energetic and metabolic adjustments to cellular oxygen deprivation and reoxygenation in Arabidopsis thaliana. Plant J **56**: 743–755

- **Brandle R, Crawford RMM** (1987) Rhizome anoxia tolerance and habitat specialisation in wetland plants. In: Crawford RMM (ed) Plant life in aquatic and amphibious habitats. Blackwell, Oxford pp 397- 410

- **Brandle RA** (1991) Flooding resistance of rhizomatous amphibious plants. In: Jackson MD, Davies DD, Lambers H (eds) Plant life under oxygen deprivation. Academic Publisher, The Hague 35-46

- **Breitkreuz KE, Allan WL, Van Cauwenberghe OR, Jakobs C, Talibi D, Andre B, Shelp BJ** (2003) A novel gamma-hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an Arabidopsis cDNA and potential role under oxygen deficiency. J Biol Chem **278**: 41552-6

- **Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J** (2003) Beans (Phaseolus spp.) . model food legumes. Plant and Soil **252**: 55–128

- **Burrows WJ and Carr DJ** (1969) Effects of flooding the root system of sunflower plants on the cytokinin content of the xylem sap. Physiol. Plantarum, **22**: 1105–1112

- **Busch KB, Fromm H** (1999) Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. Plant Physiol **121**: 589-97

- **Carroll AD, Fox GG, Laurie S, Phillips R, Ratcliffe RG, Stewart GR** (1994) Ammonium Assimilation and the Role of gamma-Aminobutyric Acid in pH Homeostasis in Carrot Cell Suspensions. Plant Physiol **106** : 513-520

- **Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, and Youngs VL** (1975) Rapid Colorimetric Determination of Nitrate in Plant-Tissue by Nitration of Salicylic-Acid. Commun. Soil Sci. Plant Anal **6**: 71-80

- **Chang WW, Huang L, Shen M, Webster C, Burlingame AL, Roberts JK** (2000) Patterns of protein synthesis and tolerance of anoxia in root tips of maize seedlings acclimated to a low-oxygen environment, and identification of proteins by mass spectrometry. Plant Physiol **122**: 295–318

- **Choi HK, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun JH, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR** (2004) A Sequence-Based Genetic Map of Medicago truncatula and Comparison of Marker Colinearity with M. sativa. Genetics, **166**: 1463-1502

- **Christianson JA, Llewellyn DJ, Dennis ES, Wilson IW** (2010) Global gene expression responses to waterlogging in roots and leaves of cotton (Gossypium hirsutum L.) Plant Cell Physiol **51**: 21-37

- **Cohen E, Kende H** (1987) In vivo 1-aminocy- clopropane- 1- carboxylate synthase activity in internodes of deep water rice: Enhancement by submergence and low oxygen levels. Plant Physiol **84**: 282- 286

- **Colmer TD, Voesenek L** (2009) Flooding tolerance: suites of plant traits in variable environments. Funct Plant Biol, **36**: 665–681

- **Côme D** (1975) Rôle de l'eau, de l'oxygène et de la température dans la germination. In : Chaussat R, Le Deunff Y. (eds). La germination des semences Gauthier-Villars, Paris, 27-44

- **Comstock JP** (2002) Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. J Exp Bot, **53**: 195–200

- **Cook DR** (1999) Medicago truncatula – a model in the making! Current Opinion in Plant Biology **2**: 301-304

- **Cook DR, Kim DJ, Zhu HY, Uribe P** (2000) Plant-pathogen interactions in Medicago truncatula. Grain Legumes, **28**: 20

- **Cooper CS** (1977) Growth of the legume seedling. Advances in Agronomy **29**:119-139

- **Coruzzi GM** (2003) Primary N-assimilation into Amino Acids in Arabidopsis. In The Arabidopsis Book. Edited by Meyerowitz E, Somerville C, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, **31**: 1-17

- **Covell S, Ellis RH, Roberts EH, Summerfield RJ** (1986) The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes. Journal of Experimental Botany **37**: 707-715

- **Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. Plant Cell **7**: 859-68

- **Crawford NM, Forde BG** (2002) Molecular and Developmental Biology of Inorganic Nitrogen Nutrition. In The Arabidopsis Book. Edited by **Meyerowitz E, Somerville C**, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0011, 1–25

- **Davies DD** (1980) Anaerobic metabolism and the production of organic acids. In: Davies DD (ed) The biochemistry of plants, Vol. 2. Academic Press, NY, USA 581-611

- **De Bruxelles GL, Peacock WJ, Dennis ES, Dolferus R** (1996) Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis Plant Physiol **111**: 381–391

- **De Faria S.M., Lewis G.P., Sprent JI, Sutherl JM** (1989) Occurrence of nodulation in the leguminosae. New Phytologist **111**: 607–619

- **Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L** (1996) Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants. 4. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. J Exp Bot **47**: 893-900

- **Delhon P, Gojon A, Tillard P, Passama L** (1996) Diurnal regulation of NO_3^- uptake in soybean plants. 4. Dependence on current photosynthesis and sugar availability to the roots. J Exp Bot **47**: 893-900

- **Dennis ES, Dolferus R, Ellis M, Rahman M, Wu Y, Hoeren FU, Grover A, Ismond KP, Good AG, Peacock WJ** (2000) Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. J Exp Bot **51**: 89-97

- **Doyle JJ, Luckow MA** (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant Physiology **131**: 900–910

- **Drew MC** (1983) Plant injury and adaptation to oxygen deficiency in the root environment: a review. Plant Soil **75**: 179- 199

- **Drew MC** (1990) Sensing soil oxygen. Plant Cell Environ **13**: 681- 693

- **Drew MC** (1991) Oxygen deficiency in the root environment and plant mineral nutrition. In: **Jackson MB, Davies DD, Lambers H** (eds) Plant life under oxygen deprivation. Academic Publisher, The Hague, The Netherlands 303-316

- **Drew MC** (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Bio **48**: 223- 250

- **Drew MC, Jackson MB, Giffard S** (1979) Ethylene-promoted adventitious rooting and development of cortical air spaces (aerenchyma) in roots may be adaptive responses to flooding in Zea mays. L Planta, **147**: 83–88

- **Duc G, Mignolet C, Carrouée B, Huyghe C** (2010) Importance économique passée et présente des légumineuses : Rôle historique dans les assolements et facteurs d'évolution. Innovations Agronomiques **11**: 1-24

- **Duke JA** (1992) Handbook of legumes of economic importance, Plenum Press, New York

- **Dure L 3rd, Greenway SC, Galau GA** (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. Biochemistry **20**: 4162-8

- **Dürr C, Boiffin J, Fleury A, Coulomb I** (1992). Analysis of the variability of sugar beet (Beta vulgaris L.) growth during the early stages. II - Factors influencing seedling size in field conditions. Agronomie **12**: 527-235

- **Durrant MJ, Dunning RA, Jaggard K, Bugg RB, Scott RK** (1988) A census of seedling establishment in sugar-beet crops. Annals of Applied Biology **113**: 327-345

- **Durrant MJ, Mash SJ** (1989) Stimulation of sugarbeet hypocotyl extension with potassium nitrate. Annals of Applied Biology **115**: 367-374

- **Evans DE** (2003) Aerenchyma formation. New Phytol **161**: 35- 49

- **Fan TW, Lane AN, Pedler J, Crowley D, Higashi RM** (1997) Comprehensive analysis of organic ligands in whole root exudates using nuclear magnetic resonance and gas chromatography-mass spectrometry. Anal Biochem **251**: 57-68

- **Flores HE, Galston AW** (1984) Osmotic stress-induced polyamine accumulation in cereal leaves: I. Physiological parameters of the response. Plant Physiol **75**: 102-9

- **Forde BG** (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. Biochim Biophys Acta **1465**: 219-235

- **Fukao T, Bailey-Serres J** (2006) Plant responses to hypoxia--is survival a balancing act? Trends Plant Sci **9**: 449-56

- **Fyfield TP, Gregory PJ** (1989) Effects of temperature and water potential on germination, radical elongation and emergence of Mungbean. Journal of Experimental Botany **40**: 667-674

- **Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A** (2001) Differential regulation of the NO_3^- and NH_4^+ transporter genes AtNRT2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. Plant J **26**: 143-155

- **Gao HB, Guo SR** (2004) Effects of exogenous gamma-aminobutyric acid on antioxidant enzyme activity and reactive oxygen content in muskmelon seedlings under nutrient solution hypoxia stress. Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao **30**: 651-9

- **Garcia-Mata C and Lamattina L** (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. Plant Physiol, **128**: 790–792

- **Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N** (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium in Arabidopsis roots. Plant Cell **11**: 937-948

- **Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N** (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium in Arabidopsis roots. Plant Cell **11**: 937-948

- **Geigenberger P** (2003) Response of plant metabolism to too little oxygen. Curr Opin Plant Biol **6**: 247-56

- **Geigenberger P, Fernie AR, Gibon Y, Christ M, Stitt M** (2000) Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. Biol Chem **381**: 723-40

- **Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND** (2005) Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. Plant Physiology **137**: 1228–1235

- **Gibbs J, Morrell S, Valdez A, Setter TL, Greenway H** (2000) Regulation of alcoholic fermentation in coleoptiles of two rice cultivars differing in tolerance to anoxia. J Exp Bot **51**: 785-96

- **Gintzburger, G** (1984) Annual Medicago spp. for the Mediterranean semi-arid and arid rangelands. Proceeding, Ifd International Rangeland Congress, Adelaide **3**: 19-20

- **Glass ADM, Siddiqi MY** (1995) Nitrogen absorption by plants roots. In Nitrogen Nutrition In Higher Plants. Edited by H.S.Srivastava and R.P.Singh., Associated Pub.Co. New Delhi 21-56

- **Goggin DE, Colmer TD** (2007) Wheat genotypes show contrasting abilities to recover from anoxia in spite of similar anoxic carbohydrate metabolism. Plant Physiol **164**: 1605-11

- **Gomes AR, Kozlowski TT** (1980) Growth Responses and Adaptations of Fraxinus pennsylvanica Seedlings to Flooding. Plant Physiol **66**: 267-71

- **Good AG, Crosby WL** (1989) Anaerobic induction of alanine aminotransferase in barley root tissue. Plant Physiol **90**: 1305-9

- **Good AG, Muench DG** (1992) Purification and characterization of an anaerobically induced alanine aminotransferase from barley roots. Plant Physiol **99**: 1520-5

- **Good AG, Muench DG** (1993) Long-Term Anaerobic Metabolism in Root Tissue (Metabolic Products of Pyruvate Metabolism). Plant Physiol **101**: 1163-1168

- **Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhaes ACN, Martins IS** (1997) NO releasing substances that induce growth elongation in maize segments. Plant Growth Regul **21**: 183–187

- **Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiol **131**: 872–877

- **He CJ, Morgan JW, Drew MC** (1996) Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. Plant Physiol, **112**: 463–472

- **Hill RD** (1998) what are hemoglobins doing in plants? Can. J. Bot **76**: 707–712

- **Hirel B, Lea PJ** (2001) Ammonia assimilation. In Plant Nitrogen. Edited by Lea PJ, Morot-Gaudry JF: Springer 79-99

- **Hoffmann-Benning S, Kende H** (1992) On the role of abscisic acid and gibberellin in the regulation of growth of rice. Plant Physiol **99**: 1156–1161

- **Huang B, Johnson JW, Box JE, Nesmith S** (1997) Root characteristics and physiological activities of wheat in response to hypoxia and ethylene. Crop Sci **37**: 812- 818

- **Huang B, Johnson JW, Nesmith DS, Bridges DC** (1994a) Root and shoot growth of wheat genotypes in response to hypoxia and subsequent resumption of aeration. Crop Sci **34**: 1538-1544

- **Huang B, Johnson JW, Nesmith S, Bridges DC** (1994b) Growth, physiological and anatomical responses of two wheat genotypes to waterlogging and nutrient supply. J Exp Bot **45**: 193- 202

- **Huang S, Greenway H, Colmer TD** (2003) Anoxia tolerance in rice seedlings: exogenous glucose improves growth of an anoxia-'intolerant', but not of a 'tolerant' genotype. J Exp Bot **54**: 2363-73

- **Huber H, Jacobs E, Visser EJ** (2009) Variation in flooding-induced morphological traits in natural populations of white clover (Trifolium repens) and their effects on plant performance during soil flooding. Ann Bot **103**: 377-86

- **Huguet T, Prosperi JM** (1996) Medicago truncatula: a legume model-plant. Cahiers Options méditerranéennes **18**: 171-175

- **Igamberdiev AU, Hill RD** (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. J Exp Bot **55**: 2473-82

- **Igamberdiev AU, Hill RD** (2009) Plant mitochondrial function during anaerobiosis. Ann Bot **103**: 259-68

- **Igarashi D, Miwa T, Seki M, Kobayashi M, Kato T, Tabata S, Shinozaki K, Ohsumi C** (2003) Identification of photorespiratory glutamate:glyoxylate aminotransferase (GGAT) gene in Arabidopsis. Plant J **33** : 975-87

- **Iglesias DJ, Cercós M, Colmenero-Flores JM, Naranjo MA, Ríos G, M.A, Naranjo MA** (2007) Physiology of citrus fruiting Brazil. J Plant Phys, **19**: 333–362

- **Ismail AM, Ella ES, Vergara GV, Mackill DJ** (2009) Mechanisms associated with tolerance to flooding during germination and early seedling growth in rice (Oryza sativa) **103**: 197-209

- **Ismond KP, Dolferus R, de Pauw M, Dennis ES, Good AG** (2003) Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. Plant Physiol **132**: 1292-302

- **Jackson MB** (1989) Regulation of aerenchyma formation in roots and shoots by oxygen and ethylene. In: Osborn DJ, Jackson MB (eds) Cell separation in plants. Springer-Verlag, Berlin 263- 274

- **Jackson MB, Armstrong W** (1999) Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. Plant Biol **1**: 274- 287

- **Jaeger C, Gessler A, Biller S, Rennenberg H, Kreuzwieser J** (2009) Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging. J Exp Bot **60**: 4335-45

- **Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H** (1996) Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. Proc Natl Acad Sci USA **93**: 11274-9

- **Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T, Huyghe C** (2003) Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (Medicago sativa) using microsatellite and AFLP markers. BMC Plant Biology **3**: 9

- **Julier B, Huguet T, Chardon F, Ayadi R, Pierre J, Prosperi JM, Barre P, Huyghe C** (2007) Identification of quantitative trait loci influencing aerial morphogenesis in the model legume Medicago truncatula. Theor Appl Genet **114**: 1391-1406

- **Justin SHFW, Armstrong W** (1987) The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. New Phytol **106**: 465- 495

- **Kamphuis LG, Lichtenzveig J, Oliver RP, Ellwood SR** (2008) Two alternative recessive quantitative trait loci influence resistance to spring black stem and leaf spot in Medicago truncatula. BMC Plant Biology **8**: 30

- **Kang YY, Guo SR, Duan JJ** (2008) Effects of root zone hypoxia on respiratory metabolism of cucumber seedlings roots. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao **19**: 583-7

- **Kathiresan A, Tung P, Chinnappa CC, Reid DM** (1997) Gamma-aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower. Plant Physiol **115**: 129–135

- **Kato-Noguchi H** (2004) Sugar utilization and anoxia tolerance in rice roots acclimated by hypoxic pretreatment. J Plant Physiol **161**: 803-8

- **Kawano N, Ito O, Sakagami J** (2008) Morphological and physiological responses of rice seedlings to complete submergence (flash flooding). Ann Bot **103** :161-9

- **Kende H** (1993) Ethylene biosynthesis. Plant Mol. Biol **44**: 283–307

- **Kennedy AR** (1995) The evidence for soybean products as cancer preventative agents. J Nutr **125**: 733-743

- **Kikuchi H, Hirose S, Toki S, Akama K, Takaiwa F** (1999) Molecular characterization of a gene for alanine aminotransferase from rice (Oryza sativa). Plant Mol Biol **39**: 149-59

- **Kindscher K** (1992) Medicinal wild plants of the prairie. University Press of Kansas, Lawrence

- **Klok EJ, Wilson IW, Wilson D, Chapman SC, Ewing RM, Somerville SC, W.J. Peacock WJ, Dolferus R, Dennis ES** (2002) Expression profile analysis of the low-oxygen response in Arabidopsis root cultures. Plant Cell **14**: 2481–2494

- **Klos K, Brummer E** (2000) Response of six alfalfa populations to selection under laboratory conditions for germination and seedling vigour at low temperatures. Crop science **40**: 959-964

- **Kozlowski TT** (1997) Responses of woody plants to flooding and salinity. Tree Physiol Monogr **1**: 1–29

- **Kreuzwieser J, Hauberg J, Howell KA, Carroll A, Rennenberg H, Millar AH, Whelan J** (2008) Differential response of gray poplar leaves and roots underpins stress adaptation during hypoxia. Plant Physiol **149**: 461-73

- **Kürsteiner O, Dupuis I, Kuhlemeier C** (2003) The pyruvate decarboxylase1 gene of Arabidopsis is required during anoxia but not other environmental stresses. Plant Physiol **132**: 968-78

- **Lam HM, Hsieh MH, Coruzzi G** (1998) Reciprocal regulation of distinct asparagine synthetase genes by light and metabolites in Arabidopsis thaliana. Plant J **16**: 345-353

- **Lambers H** (1976) Respiration and NADH oxidation of the root of flood- intolerant Senecio species as affected by anaerobiosis. Plant Physiol **37**: 117- 122

- **Lancien M, Roberts MR** (2006) Regulation of Arabidopsis thaliana 14-3-3 gene expression by gamma-aminobutyric acid. Plant Cell Environ **29**: 1430-6

- **Larbat R, Le Bot J, Bourgaud F, Robin C, Adamowicz S** (2012) Organ-specific responses of tomato growth and phenolic metabolism to nitrate limitation. Plant Biol 1438-8677

- **Lawrence GW, McLean KS, Batson WE, Miller D, Borbon JC** (1990) Response of Rotylenchulus reniformis to Nematicide Applications on Cotton. J Nematol **22**: 707-11

- **Le Deunff E, Davoine C, Le Dantec C, Billard JP, Huault C** (2004) Oxidative burst and expression of germin/oxo genes during wounding of ryegrass leaf blades: comparison with senescence of leaf sheaths. Plant J **38**: 421-31

- **Lee KW, Chen PW, Lu CA, Chen S, Ho TH, Yu SM** (2009) Coordinated responses to oxygen and sugar deficiency allow rice seedlings to tolerate flooding. Sci Signal **2**: 61

- **Lee RB, Drew MC** (1989) Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. J Exp Bot **40**: 741-752

- **Lejay L, Gansel X, Cerezo M, Tillard P, Müller C, Krapp A, von Wirén N, Daniel-Vedele F, Gojon A** (2003) Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. Plant Cell **15**: 2218-2232

- **Lejay L, Tillard P, Lepetit M, Olive F, Filleur S, Daniel-Vedele F, Gojon A** (1999) Molecular and functional regulation of two NO_3^- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. Plant J **18**: 509-519

- **Lew RR, Dearnaley JDW** (2000) Extracellular nucleotide affects on the electrical properties of growing Arabidopsis thaliana root hairs. Plant Sci **153**: 1–6

- **Li J, Mahdi F, Du L, Datta S, Nagle DG, Zhou YD** (2011) Mitochondrial respiration inhibitors suppress protein translation and hypoxic signaling via the hyperphosphorylation and inactivation of translation initiation factor eIF2α and elongation factor eEF2. J Nat Prod **74**: 1894-901

- **Liao CT, Lin CH** (2001) Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. Proc Natl Sci Counc Repub China B **25**: 148-57

- **Libourel IG, van Bodegom PM, Fricker MD, Ratcliffe RG** (2006) Nitrite reduces cytoplasmic acidosis under anoxia. Plant Physiol **142**: 1710-7

- **Liepman AH, Olsen LJ** (2003) Alanine aminotransferase homologs catalyze the glutamate:glyoxylate aminotransferase reaction in peroxisomes of Arabidopsis. Plant Physiol **131**: 215-27

- **Limami AM, Glévarec G, Ricoult C, Cliquet JB, Planchet E** (2008) Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young Medicago truncatula seedlings under hypoxic stress. J Exp Bot **59**: 2325-35

- **Liu F, VanToai T, Moy LP, Bock G, Linford LD, Quackenbush J** (2005) Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in Arabidopsis. Plant Physiol **137**: 1115–1129

- **Liu KH, Huang CY, Tsay YF** (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. Plant Cell **11**: 865-874

- **Liu KH, Tsay YF** (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. EMBO J **22**: 1005-1013

- **Lorbiecke R and Sauter M** (1999) Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. Plant Physiol **119**: 21–29

- **Loreti E, Poggi A, Novi G, Alpi A, Perata P** (2005) A genome-wide analysis of the effects of sucrose on gene expression in Arabidopsis seedlings under anoxia. Plant Physiol **137**: 1130-8

- **Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel ML, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Henaut I, Burstin J** (2005) Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (Pisum sativum L.). TAG **111**, 1022-1031

- **Lu XM, Sun J, Guo SR, Li B** (2012) Effects of exogenous 24-epibrassinolide on the leaf photosynthetic characteristics and polyamines content of cucumber seedlings under hypoxia stress. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao **23**: 140-6

- **Ludewig F, Hüser A, Fromm H, Beauclair L, Bouché N** (2003) Mutants of GABA transaminase (POP2) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (ssadh) mutants in Arabidopsis. PLoS One **3**: e3383

- **Ludewig U, von Wirén N, Frommer WB** (2002) Uniport of NH^{+}_{4} by the root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT1;1. J Biol Chem **277**: 13548-13555

- **Marschner M** (1995) Mineral Nutrition in Higher Plants. 2 ed. London : Academic Press

- **Marshall B, Squire GR** (1996) Non-linearity in rate-temperature relations of germination in oilseed rape. Journal of Experimental Botany **47**: 1369-1375

- **Marshall DR, Broue P, Pryor AJ** (1973) Adaptive significance of alcohol dehydrogenase isozymes in maize. Nature **244**: 16- 17

- **Marshall Porterfield D, Crispi Mark L and Musgrave Mary E** (1997) Changes in Soluble Sugar, Starch, and Alcohol Dehydrogenase in Arabidopsis thaliana, Plant Cell Physiol **12**: 1354-1358

- **Martin-Tanguy J, Tepfer D, Paynot M, Burtin D, Heisler L, Martin C** (1990) Inverse Relationship between Polyamine Levels and the Degree of Phenotypic Alteration Induced by the Root-Inducing, Left-Hand Transferred DNA from Agrobacterium rhizogenes. Plant Physiol **92**: 912-8

- **Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J, Valadier MH, Feraud M, Jouglet T, Suzuki A** (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. Plant Physiol **140**: 444-456

- **Melo-Oliveira R, Oliveira IC, Coruzzi GM** (1996) Arabidopsis mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. Proc Natl Acad Sci USA **93**: 4718-23

- **Menegus F, Cattaruzza L, Chersi A, Fronza G** (1989) Differences in the Anaerobic Lactate-Succinate Production and in the Changes of Cell Sap pH for Plants with High and Low Resistance to Anoxia. Plant Physiol **90**: 29-32

- **Miesak BH, Coruzzi GM** (2002) Molecular and physiological analysis of Arabidopsis mutants defective in cytosolic or chloroplastic aspartate aminotransferase. Plant Physiol **129**: 650-660

- **Miflin BJ, Habash DZ** (2002) The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. J Exp Bot **53**: 979-987

- **Mirabella R, Rauwerda H, Struys EA, Jakobs C, Triantaphylidès C, Haring MA, Schuurink RC** (2008) The Arabidopsis her1 mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness. Plant J **53**: 197-213

- **Miyashita Y, Dolferus R, Ismond KP, Good AG** (2007) Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in Arabidopsis thaliana. Plant J **49**: 1108-21

- **Miyashita Y, Good AG** (2008) Glutamate deamination by glutamate dehydrogenase plays a central role in amino acid catabolism in plants. Plant Signal Behav **3**: 842-3

- **Molteni A, Brizio-Molteni L, Persky V** (1995) In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. J Nutr, **125**: 751-756

- **Mommer L, Pons TL, Visser EJ** (2005) Photosynthetic consequences of phenotypic plasticity in response to submergence: Rumex palustris as a case study. J Exp Bot **57**: 283-90

- **Mommer L, Visser EJ** (2005) Underwater photosynthesis in flooded terrestrial plants: a matter of leaf plasticity. Ann Bot **96**: 581-9

- **Morard E, Silvestre J** (1996). Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: a review. Plant Soil **184**: 243- 254

- **Morard P, Silvestre J, Lacoste L, Caumes E, Lamaze T** (2004). Nitrate uptake and nitrite release by tomato roots in response to anoxia. J Plant Physiol. **161** : 855-65

- **Morot-Gaudry JF, Martin F, Thoreux A, Gojon A** (1998) In Assimilation de l'azote chez les plantes 265-280

- **Muench DG, Good AG** (1994) Hypoxically inducible barley alanine aminotransferase: cDNA cloning and expression analysis. Plant Mol Biol **24**: 417-27

- **Muench DG, Wu Y, Coughlan SJ, Okita TW** (1998) Evidence for a Cytoskeleton-Associated Binding Site Involved in Prolamine mRNA Localization to the Protein Bodies in Rice Endosperm Tissue. Plant Physiol **116**: 559-69

- **Muller B, Tillard P, Touraine B** (1995) Nitrate fluxes in soybean seedling roots and their response to amino acids: An approach using N-15. Plant Cell Environ **19**: 1267-1279

- **Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**: 473-497

- **Musgrave ME, Vanhoy MA** (1989) A growth analysis of waterlogging damage in mung bean (Phaseolus aureus). Can J Bot **67** : 2391-5

- **Narsai R, Rocha M, Geigenberger P, Whelan J, van Dongen JT** (2011) Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. New Phytol **190**: 472–487

- **Negbi M, Black M, Bewley JD** (1968) Far-red Sensitive Dark Processes Essential for Light- and Gibberellin-induced Germination of Lettuce Seed. Plant Physiol **43**: 35-40

- **Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT** (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. Plant Physiol, **128**: 13–16

- **Newman DS and Smit BA** (1991) The influence of leaf water status and ABA on leaf growth and stomata of Phaseolus vulgaris with hypoxic roots. J. Exp. Bot **42**: 1499–1506

- **Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB** (1994) Identification of a high affinity NH^+_4 transporter from plants. EMBO J **13**: 3464-3471

- **Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2004) Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. Department of Advanced

Bioscience, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, JAPON

- **Olson DC, Oetiker JH, Yang SF** (1995) Analysis of LE-ACS3, a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expressed during flooding in the roots of tomato plants. J. Biol. Chem., **270**: 14056–14061

- **Orsel M, Krapp A, Daniel-Vedele F** (2002) Analysis of the NRT2 nitrate transport family in Arabidopsis. Structure and gene expression. Plant Physiol **129**: 886-896

- **Ourry A, Macduff JH, Prudhomme MP, Boucaud J** (1996) Diurnal variation in the simultaneous uptake and sink allocation of NH_4^+ and NO_3^- by Lolium perenne in flowing solution culture. J Exp Bot **47**: 1853-1863

- **Palanivelu R, Brass L, Edlund AF, Preuss D** (2003) Pollen tube growth and guidance is regulated by POP2, an Arabidopsis gene that controls GABA levels. Cell **114**: 47-59

- **Pedreschi R, Hertog M, Robben J, Lilley KS, Karp NA, Baggerman G, Vanderleyden J, Nicolaï B** (2009) Gel-based proteomics approach to the study of metabolic changes in pear tissue during storage. J Agric Food Chem **57**: 6997-7004

- **Peng HP, Chan CS, Shih MC, Yang SF** (2001) Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis. Plant Physiol **126**: 742–749

- **Peoples MB, Gifford RM** (1993) Long distance transport of carbon and nitrogen from sources to sinks in higher plants. In Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Edited by DT Dennis DT, Turpin DH. New York, 434-47

- **Pezeshki SR, DeLaune RD, Jugsujinda A** (2001) The effects of crude oil and the effectiveness of cleaner application following oiling on US Gulf of Mexico coastal marsh plants. Environ Pollut **112**: 483-9

- **Pierre JB** (2008) Recherche de déterminants génétiques de la date de floraison chez la Légumineuse modèle, Medicago truncatula. Thèse. 143 pages

- **Ponnamperuma C** (1989) Experimental studies in the origin of life. J Br Interplanet **42**: 397-400

- **Ponnamperuma FN** (1972) the chemistry of submerged soil. Adv Agron **24**: 29- 96

- **Ponnamperuma FN** (1984) Effects of flooding on soils. In: Kozlowski TT (ed) Flooding and plant growth. Academic Press, Orlando. pp 9- 45

- **Prosperi JM, Jenczewski E, Ronfort J** (2000) The mielgas: wild Spanish populations of alfalfa. Results of ten years of researches. In: F. Veronesi, D. Roseillini (Eds) Lucerne and medics for the XXI Century. Proceedings XIII Eucarpia Medicago spp. Group Meeting, Perugia, Italy: 1-10

- **Puiatti M, Sodek L** (1999) Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. Plant Physiol Biochem **37:** 767–773

- **Qi Y, Yamauchi Y, Ling J, Kawano N, Li D, Tanaka K** (2004) Cloning of a putative monogalactosyldiacylglycerol synthase gene from rice (Oryza sativa L.) plants and its expression in response to submergence and other stresses. Planta **219**: 450-8

- **Rademacher W** (2000) Growth retardants: effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. Plant Physiol. Plant Mol. Biol **51**: 501–531

- **Raskin I, Kende H** (1984) Regulation of growth in stem sections of deepwater rice. Planta **160** : 66–72

- **Raven JA, Wollenweber B, Handley LL** (1992) A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. New Phytologist **121**: 19-32

- **Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass AD** (1999) AtAMT1 gene expression and NH_4^+ uptake in roots of Arabidopsis thaliana: evidence for regulation by root glutamine levels. Plant J **19**: 143-152

- **Reddy VS, Ali GS, Reddy AS** (2002) Genes encoding calmodulin-binding proteins in the Arabidopsis genome. J Biol Chem **277**: 9840-52

- **Reggiani R, Hochkoeppler A, Bertani A** (1989) Polyamines in Rice Seedlings under Oxygen-Deficit Stress. Plant Physiol **91**: 1197-201

- **Reggiani R, Nebuloni M, Mattana M, Brambilla I** (2000) Anaerobic accumulation of amino acids in rice roots: role of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. Amino Acids **18**: 207-17

- **Ricard J, Mulliert G, Kellershohn N, Giudici-Orticoni MT** (1994) Dynamics of enzyme reactions and metabolic networks in living cells. A physico-chemical approach. Prog Mol Subcell Biol **13**: 1-80

- **Ricoult C, Cliquet JB, Limami AM** (2005) Stimulation of alanine amino transferase (AlaAT) gene expression and alanine accumulation in embryo axis of the model legume Medicago truncatula contribute to anoxia stress tolerance. Plant Physiol **123**: 30–39

- **Ricoult C, Echeverria LO, Cliquet JB, Limami AM** (2006) Characterization of alanine aminotransferase (AlaAT) multigene family and hypoxic response in young seedlings of the model legume Medicago truncatula. J Exp Bot **57**: 3079-89

- **Rijnders JG, Yang YY, Takahashi N, Barendse GW, Blom CW, Voesenek LA** (1997) Ethylene enhances gibberelin levels and petiole sensitivity in flooding tolerant Rumex in contrast to intolerant species. Planta **203**: 20–23

- **Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, van Dongen JT** (2010a) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine

aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of Lotus japonicus. Plant Physiol **152**: 1501-13

- **Rocha M, Sodek L, Licausi F, Hameed MW, Dornelas MC, van Dongen JT** (2010b) Analysis of alanine aminotransferase in various organs of soybean (Glycine max) and in dependence of different nitrogen fertilisers during hypoxic stress. Amino Acids **39**: 1043-53

- **Rodríguez-Gamir J, Ancillo G, González-Mas MC, Primo-Millo E, Iglesias DJ, Forner-Giner MA** (2011) Root signalling and modulation of stomatal closure in flooded citrus seedlings. Plant Physiol Biochem **49**: 636–645

- **Rood SB, Nielsen JL, Shenton L, Gill KM, Letts MG** (2009) Effects of flooding on leaf development, transpiration, and photosynthesis in narrowleaf cottonwood, a willow-like poplar. Photosynth Res **104**: 31-9

- **Rose RJ** (2008) Medicago truncatula as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. Functional Plant Biol **35**: 253-264

- **Saglio PH, Drew MC, Pradet A** (1988) Metabolic Acclimation to Anoxia Induced by Low (2-4 kPa Partial Pressure) Oxygen Pretreatment (Hypoxia) in Root Tips of Zea mays. Plant Physiol **86** : 61-6

- **Sairam RK, Kumutha D, Ezhilmathi K, Deshmukh PS, Srivastava GC** (2008) Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants. Biol Plant **52**: 401-412

- **Sato E, Nakamichi N, Yamashino T, Mizuno T** (2002) Aberrant expression of the Arabidopsis circadian-regulated APRR5 gene belonging to the APRR1/TOC1 quintet results in early flowering and hypersensitiveness to light in early photomorphogenesis. Plant Cell Physiol **43**: 1374-85

- **Sato S, Nakamura Y, Asamizu E, Isobe S, Tabata S** (2007) Genome sequencing and genome resources in model legumes. Plant Physiol **144**: 588-593

- **Schultz CJ, Coruzzi GM** (1995) The aspartate aminotransferase gene family of Arabidopsis encodes isoenzymes localized to three distinct subcellular compartments. Plant J **7**: 61-75

- **Setsuko S, Ishida K, Tomaru N** (2004) Size distribution and genetic structure in relation to clonal growth within a population of Magnolia tomentosa Thunb (Magnoliaceae). Mol Ecol **13**: 2645-53

- **Setsuko S, Ishida K, Ueno S, Tsumura Y, Tomaru N** (2007) Population differentiation and gene flow within a metapopulation of a threatened tree, Magnolia stellata (Magnoliaceae). Am J Bot **94**: 128-36

- **Setter TL, Belford RK** (1990) Waterlogging: How it reduces plant growth and how plants can overcome its effect. West Aust J Agric **31**: 51- 57

- **Setter TL, Ellis M, Laureles EV, Ella ES, Senadhira D, Mishra SB, Sarkarung S, Datta S** (1997) Physiology and genetics of submergence tolerance in rice. Ann Bot **79**: 67-77

- **Setter TL, Waters I, Sharma SK, Singh KN, Kulshreshtha N, Yaduvanshi NPS, Ram PC, Singh BN, Rane J, McDonald G, Khabaz- Saberi H, Biddulph TB, Wilson R, Barclay I, McLean R, Cakir M** (2009) Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India: the importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. Ann Bot **103**: 221- 235

- **Settler TL, Waters I** (2003) Reviews of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. Plant Soil **253**: 1- 34

- **Shelp BJ, Bown AW, McLean MD** (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. Trends Plant Sci **4**: 446–452

- **Shiu OY, Oetiker JH, Yip WK, Yang SF** (1998) The promoter of LE-ACS7, an early flooding-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of the tomato, is tagged by a Sol3 transposon. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 10334–10339

- **Sieciechowicz KA, Joy KW, Ireland RJ** (1988) The metabolism of asparagine in plants. Phytochemistry **27**: 663-671

- **Silvertown J, Law R** (1987) Do plants need niches? Some recent developments in plant community ecology. Trends Ecol Evol **2**: 24-6

- **Smirnoff N, Crawford RMM** (1983) Variation in the structure and response to flooding of root aerenchyma in some wetland plants. Ann Bot **51**: 237- 249

- **Smulders MJM and Horton RF** (1991) Ethylene promotes elongation growth and auxin promotes radial growth in Ranunculus sceleratus petioles. Plant Physiol **96**: 806–811

- **Sohlenkamp C, Shelden M, Howitt S, Udvardi M** (2000) Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. FEBS Lett **467**: 273-278

- **Squire GR** (1999) Temperature and heterogeneity of emergence time in oilseed rape. Annual Applied Biology **135**: 439-447

- **Streeter JG, Thompson JF** (1972) Anaerobic Accumulation of gamma-Aminobutyric Acid and Alanine in Radish Leaves (Raphanus sativus, L.). Plant Physiol **49**: 572-8

- **Studart-Guimarães C, Fait A, Nunes-Nesi A, Carrari F, Usadel B, Fernie AR** (2007) Reduced expression of succinyl-coenzyme A ligase can be compensated for by up-regulation of the gamma-aminobutyrate shunt in illuminated tomato leaves. Plant Physiol **145**: 626-39

- **Su M, Li XF, Ma XY, Peng XJ, Zhao AG, Cheng LQ, Chen SY, Liu GS** (2011) Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. Plant Sci **181**: 652-9

- **Subbaiah CC, Sachs MM** (2003) Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. Ann Bot **91**: 119-27

- **Subbaiah CC, Zhang J, Sachs MM** (1994) Involvement of intracellular calcium in anaerobic gene expression and survival of maize seedlings. Plant Physiol **105**: 369–376

- **Summers JE and Jackson MB** (1996) Anaerobic promotion of stem extension in Potamogeton pectinatus. Roles for carbon dioxide, acidification and hormones. J Physiol Plant **96**: 615–622

- **Szal B, Drozd M, Rychter AM** (2004) Factors affecting determination of superoxide anion generated by mitochondria from barley roots after anaerobiosis. J Plant Physiol **161**: 1339-46

- **Tamet V, Boiffin J, Dürr C, Souty N** (1996) Emergence and early growth of an epigeal seedling (Daucus carota L.): influence of soil temperature, sowing depth, soil crusting and seed weight. Soil and Tillage Research **40**: 25-38

- **Tamet V, Souty N, Rode C** (1995). Emergence des plantules de carotte (Daucus carotta L) sou des obstacles mecaniques superficiels. Agronomie **15**: 109-121

- **Tang W, Brady SR, Sun Y, Muday GK, Roux SJ** (2003) Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin transport. Plant Physiol, **131**: 147–154

- **The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. Nature **408**: 796-815

- **Thomas AL, Sodek L** (2006) Amino acid and ureide transport in the xylem of symbiotic soybean plants during short-term flooding of the root system in the presence of different sources of nitrogen. Braz J Plant Physiol **18:** 333–339

- **Thomson CJ, Colmer TD, Watkin ELJ, Greenway H** (1992) Tolerance of wheat. (Triticum aestivum cv. Gamenya and Kite) and triticale (Triticosecale cv. Muir) to waterlogging, New Phytol **120**: 335- 344

- **Thoquet P, Gherardi M, Journet EP, Kereszt A, Ane JM, Prosperi JM, and Huguet T** (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume Medicago truncatula: an essential tool for the comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. Plant Biol **2**: 1-13

- **Tivoli B, Baranger A, Sivasithamparam K, and Barbetti MJ** (2006) Annual Medicago: From a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the Nature of disease resistance. Ann Botany **98**: 1117–1128

- **Trought MCT, Drew MC** (1980a) The development of waterlogging damage in wheat seedlings (Triticum aestivum L.) I. Shoot and root growth in relation to changes in concentration of dissolved gases and solutes in the soil solutions. Plant Soil **54**: 77-94

- **Trought MCT, Drew MC** (1980b) The development of waterlogging damage in wheat seedlings (Triticum aestivum L.) II. Accumulation and redistribution of nutrients by the shoot. Plant Soil **56**: 187- 199

- **Trought MCT, Drew MC** (1982) Effects of waterlogging on young wheat plants (Triticum aestivum L.) and on soil solutes at different temperatures. Plant Soil **69**: 311- 326

- **Tsay YF, Schroeder JI, Feldmann KA, Crawford NM** (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. Cell **72**: 705-713

- **Valenciano JB, Casquero, PA, Boto JA** (2004) Influence of sowing techniques and pesticide application on the emergence and the establishment of bean plants (Phaseolus vulgaris L.). Agronomie **24**: 113-118

- **Van Dongen JT, Fröhlich A, Ramírez-Aguilar SJ, Schauer N, Fernie AR, Erban A, Kopka J, Clark J, Langer A, Geigenberger P** (2009) Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in oxygen concentration in the roots of arabidopsis plants. Ann Bot **103**: 269-80

- **Van Dongen JT, Gupta KJ, Ramírez-Aguilar SJ, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2010) Regulation of respiration in plants: a role for alternative metabolic pathways. J Plant Physiol **168**: 1434-43

- **Vanlerberghe GC, Joy KW, Turpin DH** (1991) Anaerobic Metabolism in the N-Limited Green Alga Selenastrum minutum: III. Alanine Is the Product of Anaerobic Ammonium Assimilation. Plant Physiol **95**: 655-8

- **Vidoz ML, Loreti E, Mensuali A, Alpi A, Perata P** (2010) Hormonal interplay during adventitious root formation in flooded tomato plants. Plant J **63**: 551-62

- **Visser E, Cohen JD, Barendse G, Blom C, Voesenek L** (1996) An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded Rumex palustris Sm. Plant Physiol **112**: 1687–1692

- **Visser EJW, Voesenek LACJ** (2004) Acclimation to soil flooding - sensing and signal transduction. Plant Soil **254**: 197- 214

- **Voesenek L, Banga M, Thier RH, Mudde CM, Harren F, Barendse G, Blom C**, (1993) Submergence-induced ethylene synthesis, entrapment, and growth in two plant species with contrasting flooding resistances. Plant Physiol **103**: 783–791

- **Voesenek LA, Colmer TD, Pierik R, Millenaar FF, Peeters AJ** (2006) How plants cope with complete submergence. New Phytol **170** : 213-26

- **Voesenek LA, Harren FJ, Bögemann GM, Blom CW, Reuss J** (1990) Ethylene production and petiole growth in rumex plants induced by soil waterlogging: the application of a continuous flow system and a laser driven intracavity photoacoustic detection system. Plant Physiol **94**: 1071-7

- **Von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB** (2000) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. Curr Opin Plant Biol 3 (3): 254-261

- **Walch-Liu P, Filleur S, Gan Y, Forde BG** (2005) Signaling mechanisms integrating root and shoot responses to changes in the nitrogen supply. Photosynth Res **83**: 239-250

- **Wang T, Li J, Guo SR, Gao HB, Wang SP** (2005) Effects of exogenous polyamines on the growth and activities of H+-ATPase and H+-PPase in cucumber seedling roots under hypoxia stress. Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao **31**: 637-42

- **Waters I, Morrell S, Greenway H, Colmer TD** (1991) Effects of anoxia on wheat seedlings. 2. Influence of O2 supply prior to anoxia on tolerance to anoxia, alcoholic fermentation, and sugar levels. J Exp Bot **42** : 832–841

- **Weger HG, Turpin DH** (1989) Mitochondrial Respiration Can Support NO_3 and NO_2 Reduction during Photosynthesis : Interactions between Photosynthesis, Respiration, and N Assimilation in the N-Limited Green Alga Selenastrum minutum.. Plant Physiol **89**: 409-15

- **Wilkie SE, Roper JM, Smith AG, Warren MJ** (1995) Isolation, characterisation and expression of a cDNA clone encoding plastid aspartate aminotransferase from Arabidopsis thaliana. Plant Mol Biol **27**: 1227-33

- **Wong HK, Chan HK, Coruzzi GM, Lam HM** (2004) Correlation of ASN2 gene expression with ammonium metabolism in Arabidopsis. Plant Physiol **134**: 332-8

- **Woo KC, Boyle FA, Flugge IU, Heldt HW** (1987) N-ammonia assimilation, 2-oxoglutarate transport, and glutamate export in spinach chloroplasts in the presence of dicarboxylates in the light. Plant Physiol **85**: 621-5

- **Xia QP, Gao HB, Li JR** (2011) Effects of gamma-aminobutyric acid on the photosynthesis and chlorophyll fluorescence parameters of muskmelon seedlings under hypoxia stress. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao **22**: 999-1006

- **Xu K, Xu X, Ronald PC, Mackill DJ** (2000) A high-resolution linkage map of the vicinity of the rice submergence tolerance locus Sub1. Mol Gen Genet **263**: 681-9

- **Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S** (2005) Sequencing the genespaces of Medicago truncatula and Lotus japonicus. Plant Physiology **137**: 1174-1181

- **Young ND, Mudge J, Ellis THN** (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. Current opinion in plant biology **6**: 199-204

- **Zhang J, Van Toai T, Huynh L, Preiszner J** (2000) Development of flooding-tolerant Arabidopsis thaliana by autoregulated cytokinin production. Mol Breed **6**: 135–144

- **Zhu H, Choi HK, Cook DR and Shoemaker RC** (2005) Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. Plant Physiol **137**: 1189-1196

Résumé

Les plantes se développent dans un environnement dynamique, ce qui impose souvent des contraintes sur la croissance et le développement. Parmi les facteurs environnementaux adverses, fréquemment rencontrés par les plantes terrestres, l'inondation ou submersion temporaire qui impose une hypoxie racinaire (1-2% d'oxygène). La submersion du sol peut avoir un très fort impact sur la survie des plantes, et donc sur la production agricole ainsi que les écosystèmes naturels.
La plupart des études antérieures sur les altérations biologiques et biochimiques chez les plantes, dues au stress hypoxique, ont porté sur le métabolisme des sucres. Toutefois, quelques données concernant les effets de l'hypoxie racinaire sur le métabolisme azoté (N) sont récemment devenues disponibles.
Le but de notre travail est d'étudier les effets de l'hypoxie racinaire sur le métabolisme azoté chez la plante modèle *"Medicago truncatula"*.
Les résultats obtenus ont montré que l'hypoxie racinaire entraine une augmentation significative de la biomasse aérienne (MF et MS) avec allongement des tiges et augmentation du nombre de feuilles pendant une période transitoire allant jusqu'à 5 semaines avant d'engendrer la mort des plantes. Les effets sur le métabolisme primaire ont été suivis par des analyses métabolomiques (GC-MS), marquage à l'azote (^{15}N) et expression de gènes impliqués dans le métabolisme azoté. Nos résultats montrent que si l'hypoxie racinaire entraine des modifications sommes toute attendues des métabolismes de l'azote et du carbone, elle entraine également des réarrangements de ces métabolismes dans la partie aérienne non soumise à l'hypoxie. La réponse des parties aériennes en termes de croissance et de modification métabolique a été obtenue même quand une partie minoritaire seulement du système racinaire a été soumise à l'hypoxie suggérant une communication racine – partie aérienne qui mériterait d'être plus étudiée dans l'avenir.

Abstract

Plants grow in a dynamic environment, which often, imposes constraints on growth and development. Among the adverse environmental factors commonly encountered by land plants, flooding or waterlogging which imposes a temporary root hypoxia (1-2% oxygen). Hypoxia stress jeopardizes plant survival, and therefore induces tremendous damage on the agricultural production and natural ecosystem.
Most previous studies of biological and biochemical alterations in plants, due to hypoxic stress, have focused on sugar metabolism. However, few data, regarding the effect of root hypoxia on nitrogen (N) metabolism have recently become available.
The aim of our work is to study the impact of root hypoxia on nitrogen metabolism in the model plant "*Medicago truncatula*."
Our results showed that root hypoxia leads to a significant increase in shoot biomass (MF and MS) with increased stem elongation and number of leaves during a transitional period of almost 5 weeks before inducing plant death. Effects on primary metabolism were followed by metabolomic analysis (GC-MS), labeling of nitrogen (15N) and expression of genes involved in nitrogen metabolism. Root hypoxia induced the expected rearrangement of carbon and nitrogen in the root but interestingly it induced significant changes in C and N metabolisms in the aerated shoot. Hypoxia-induced changes in shoot biomass and metabolism were obtained in split-root experiment where only part of the root system was submitted to hypoxia. The response of the aerated shoot to root hypoxia suggests a communication between root and shoot upon hypoxia aiming at a coherent adaptive response at the whole plant level. The nature of this communication deserves to be more thoroughly investigated.