HAL
open science

Étude du métabolisme des lipides membranaires et des gènes associés chez Vigna unguiculata (L.) Walp sous contraintes abiotiques combinées (sécheresse/ozone)

Deborah Moura Rebouças

To cite this version:

Deborah Moura Rebouças. Étude du métabolisme des lipides membranaires et des gènes associés chez Vigna unguiculata (L.) Walp sous contraintes abiotiques combinées (sécheresse/ozone). Ecologie, Environnement. Université Paris-Est; Universidade federal do Ceará, 2014. Français. NNT : 2014PEST1083 . tel-01127032

HAL Id: tel-01127032

https://theses.hal.science/tel-01127032v1

Submitted on 6 Mar 2015

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 PARIS-EST CRETEIL VAL-DE-MARNE

Equipe IPE, iEES Paris UMR 7618
Ecole Doctorale Sciences, Ingénierie et Environnement

UNIVERSITE FEDERALE DU CEARA

Département de Biochimie et Biologie Moléculaire

DOCTORAT EN COTUTELLE

Spécialités :

Sciences de l'Univers et de l'Environnement (UPEC)

Biochimie (UFC)

par :

MOURA REBOUÇAS Deborah

Étude du métabolisme des lipides membranaires et des gènes associés chez *Vigna unguiculata* (L.) Walp sous contraintes abiotiques combinées (sécheresse/ozone)

Directeurs de recherche : REPELLIN Anne / FERNANDES DE MELO Dirce
Co-encadrant : BAGARD Matthieu

Soutenance le 31 octobre 2014 à Fortaleza (Brésil), devant le jury composé de :

REPELLIN Anne	Pr., Université Paris-Est Créteil	Directrice de thèse
FERNANDES DE MELO Dirce	Pr., Universidade Federal do Ceará	Directrice de thèse
BAGARD Matthieu	MC, Université Paris-Est Créteil	Co-encadrant de thèse
MATOS Ana Rita	Pr., Universidade de Lisboa	Rapporteur
Ivan DE GODOY MAIA	Pr., Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho	Rapporteur
FARIAS DE ARAGAO Maria Erivalda	Pr., Universidade Estadual do Ceará	Examinatrice

Étude du métabolisme des lipides membranaires et des gènes associés chez *Vigna unguiculata* (L.) Walp sous contraintes abiotiques combinées (sécheresse/ozone)

Avant-propos

Le doctorat en cotutelle a été développé dans le cadre d'un accord franco-brésilien appelé CAPES/COFECUB (Sv 685/10) entre l'Université Paris-Est Créteil et l'Université Fédérale du Ceará. Le volet expérimental du travail a été conduit sous la coresponsabilité du Pr. Anne Repellin et du Dr. Matthieu Bagard, de l'équipe Interactions Plantes-Environnement (UMR 7618, iEES Paris) au laboratoire d'Ecophysiologie Moléculaire de l'Université Paris-Est Créteil, ainsi que sous la responsabilité du Pr. Dirce Fernandes de Melo du Laboratoire de Bioénergétique du Département de Biochimie et Biologie Moléculaire de l'Université Fédérale du Ceará. La partie initiale du travail a été menée au laboratoire d'Ecologie et Ecophysiologie Forestières de l'Université de Lorraine sous la responsabilité du Pr. Yves Jolivet de l'équipe Physiologie et Diversité de la Réponse aux Contraintes (UMR 1137).

Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris
Equipe Interactions Plantes-Environnement
Faculté des Sciences et Technologie
Université Paris Est Créteil
61, Avenue du Général De Gaulle
94010 Créteil Cedex - France

Remerciements

Tout d'abord, je remercie le ***Professeur Dirce****. J'ai été accueillie dans son laboratoire en 2006 en tant qu'étudiante d'initiation scientifique ; j'ai fait le master et avec ça, nous avons établi des liens non seulement de directrice et étudiante, mais plus que ça. Même avant de savoir si j'allais réussir l'entrée au doctorat en biochimie de l'UFC, à la fin du master, elle m'a invitée à participer au projet de collaboration entre notre laboratoire et celui en France, avec l'idée de m'envoyer là-bas pour y faire une partie de mon doctorat. Elle m'a donné tout le soutien nécessaire pour que je puisse me développer personnellement et professionnellement dans un pays si différent du nôtre, toujours avec des mots de réconfort, citant ses 3 C : calme, courage et confiance. Elle a tout fait au Brésil pour que je puisse prolonger mon séjour en France. Quand je suis rentrée au Brésil, elle a continué à me donner tout le soutien dont j'avais besoin dans le cadre de mon travail de thèse et des enseignements. Je dois au Professeur Dirce une grande partie de mon éducation!*

Je remercie le ***Professeur Anne Repellin****. Quand je suis allée travailler dans son laboratoire en France, elle m'a accueillie « à bras ouverts ». Je la remercie de m'avoir aidé avec toute son expérience et ses connaissances, d'avoir organisé des réunions pour me guider dans l'avancement des travaux, allant même à la paillasse m'apprendre à extraire des lipides. Je la remercie de toujours me féliciter en tant qu'étudiante et quand je maîtrisais la langue française ; de toujours corriger « en temps et en heure » mes rapports, mes résumés de conférences, l'article et la thèse ; de faire ce qu'il fallait pour que je puisse obtenir la cotutelle du doctorat ; d'être sympathique et aimable ; de se soucier de moi.*

Je remercie ***Matthieu Bagard****. Son implication était fondamentale dans le développement et la finalisation de ce travail. Mes mots ne suffisent pas pour exprimer toute ma gratitude pour sa disponibilité, son aide intellectuelle et l'encouragement professionnel. Je tiens à le remercier pour son professionnalisme en tant que co-encadrant, de m'avoir guidée dans les travaux expérimentaux, trouvant des solutions aux problèmes rencontrés ; d'avoir partagé ses connaissances scientifiques, en encourageant mon travail ; de m'aider avec mes présentations de conférences et dans l'écriture de l'article et du manuscrit de thèse ; de m'avoir appris ce que je devais savoir pour le bon déroulement de la recherche ; de m'aider avec mon côté personnel ; de fournir son temps pour ce que j'avais besoin, y compris venir au Brésil pour m'aider et de, même de loin, me donner tout le soutien nécessaire pour la finalisation de ce travail.*

*Je remercie également **Yuri**, à l'époque doctorant et maintenant docteur. Quand j'ai commencé les expériences à Nancy, c'est lui qui m'a donné tout le soutien scientifique et technique, m'a appris le travail expérimental et l'a effectué avec moi. Je le remercie pour tout le soutien pendant mon doctorat, pas seulement professionnellement, mais aussi personnellement, dans une période où tout était nouveau pour moi. Merci pour son amitié, pour ses enseignements, pour le rire dans les heures de travail, de rendre le travail plus facile et amusant, de m'écouter et de me conseiller.*

*Je suis reconnaissante envers le **Professeur Hélio**, qui m'a aussi beaucoup aidé dans le développement de ce travail. Merci pour son aide à la conception des amorces pour les études d'expression génique ; je le remercie pour ses enseignements en biologie moléculaire et bioinformatique, pour sa participation dans la correction de l'article et pour les moments de détente expérimentés en laboratoire.*

*Merci beaucoup au **Professeur Yves Jolivet** de m'avoir accueillie dans son laboratoire à Nancy pendant trois mois afin que je puisse commencer le travail expérimental. Je tiens à le remercier non seulement pour son accueil, mais aussi pour sa gentillesse. Aussi, je le remercie pour sa disponibilité pour les réunions que nous avons eues sur l'état d'avancement des expériences et des articles ; pour sa participation dans la correction des publications et pour ses enseignements si précieux.*

*Je tiens également à remercier les autres personnes du laboratoire de Nancy que j'ai eues l'occasion de rencontrer, qui m'ont accueilli si bien et qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué au développement de ce travail, que ce soit avec les connaissances scientifiques, avec l'appui technique, avec la compagnie aux congrès ou avec le quotidien. Ils sont : **Pierre Dizengremel**, **Marie-Paule**, **Marie-Noëlle**, **Joëlle**, **Stéphane**, **Dominique**, **Morgane** et **Ata**, entre autres.*

*Avec mon retour à Créteil, j'ai eu l'occasion de vivre avec des gens merveilleux dans le laboratoire où j'ai passé la plupart du doctorat. Un merci spécial à **Mme. Phan-Thi** pour ses enseignements sur les lipides et pour avoir passé une journée sur la paillasse pour m'apprendre les techniques à utiliser. Merci à **Yasmin Zuilly-Fodil** pour sa convivialité, ses enseignements précieux et ses conseils. Je remercie **Daniel Laffray** pour son hospitalité, sa bonne humeur, sa convivialité et ses enseignements. Je remercie **Luis** pour son hospitalité, sa gentillesse et sa volonté de m'aider dans la recherche. Merci à **Agnès Gigon** pour sa gentillesse, ses conseils et sa volonté d'aider. Je remercie **Christophe** pour sa volonté d'aider et de transmettre son savoir à chaque fois que j'avais besoin (il avait un pdf pour tout!) et aussi pour sa manie d''organisation*

(ce qui n'était pas peu!) qui a permis de travailler dans un laboratoire propre. Merci à ***Chantal****,* ***Juliette****,* ***Manuel****,* ***Mireille****,* ***Mixa*** *et* ***Nicolas*** *pour votre sympathie dans le laboratoire. Je remercie les secrétaires :* ***Fryni Grekis*** *pour sa sympathie, sa gentillesse et son aide et* ***Agnès Massias*** *pour avoir toujours été si gentille avec moi. Je tiens également à remercier* ***Pascale*** *pour m'avoir donné des moments de détente, de toujours me faire rire avec son chant et de prendre bien soin de la verrerie du laboratoire, ce qui facilitait notre travail. Merci à* ***Lili*** *de nous avoir permis de travailler dans les meilleures conditions de travail, laissant le laboratoire toujours aussi propre et à* ***Gilberte*** *pour les moments de détente que nous avons eus ensemble. Je ne peux pas m'empêcher de remercier les stagiaires qui sont passés par le laboratoire et m'ont aidé dans le développement de la thèse, soit parce qu'ils ont travaillé avec moi directement :* ***Karima*** *et* ***Stéphanie****, soit parce qu'ils m'ont appris la méthodologie de clonage :* ***Olivier****, ou parce qu'ils m'ont donné des moments de détente :* ***Nacera****,* ***Ariana****,* ***Battle*** *et* ***Fatima****.*

Je tiens à remercier tout particulièrement mes collègues de doctorat en France (certains sont déjà docteurs). Avec eux, le développement du travail de thèse est devenu plus spécial et même plus facile. Le quotidien au sein du laboratoire, dans la salle des étudiants, au déjeuner ou pendant un café était toujours très agréable. Ils ont participé de mon développement professionnel ainsi que personnel, parce que j'ai beaucoup appris avec eux. Je remercie ***Rafiq*** *de m'avoir appris beaucoup de choses sur les techniques de biologie moléculaire ; de sa compagnie quand nous partions du laboratoire et d'être toujours prêt à aider, même dans les questions liées à la vie étudiante à l'étranger. Il nous a manqué après le retour dans son pays. Merci à* ***Ruben*** *d'avoir été toujours disponible quand j'ai eu besoin de son aide. Je me suis toujours tournée vers lui quand je ne savais pas comment utiliser un logiciel sur l'ordinateur ou lorsque l'ordinateur avait un problème, en plus de poser des questions sur les expériences. Je n'ai jamais rencontré quelqu'un autant prêt à aider, et amusant, surtout lorsqu'il se joint à* ***Marien****. Marien est un autre doctorant que je ne peux pas ne pas remercier, tout particulièrement pour son aide avec les protocoles et les calculs. Avec son intelligence, il était toujours prêt à m'aider et à rendre les jours de travail plus drôles. Je remercie* ***Ahmed*** *de son aide pour les questions de la vie étudiante ; de sa compagnie au moment des expériences en laboratoire ; de rendre l'atmosphère plus détendue ; de se soucier si mes expériences allaient bien ou si j'étais bien ; de m'écouter ; de me conseiller et de me faire apprendre la langue française avec sa façon de parler vite (à partir du moment que j'ai pu le comprendre, je me suis dit que je savais le français !). Je tiens à remercier* ***Maha*** *qui est devenue une amie spéciale à l'intérieur et à l'extérieur du laboratoire, pour sa compagnie au retour à la maison, pour sa gentillesse, de toujours nous apporter de la*

nourriture si délicieuse, et pour sa patience, son écoute et ses conseils. Je remercie également ***Elodie*** *pour sa manière si douce de me traiter, d'être toujours prête à m'aider, s'efforçant de nous convaincre à faire un « happy hour » entre les étudiants. Enfin, je remercie* ***Biet*** *d'être si gentil et de m'avoir encouragé à étudier les lipides.*

Je tiens également à remercier le Président de l'Université de la France: ***Bernard Saint Girons*** *et le directeur de l'Ecole Doctorale SIE :* ***Denis Duhamel*** *de permettre la cotutelle du doctorat avec leurs signatures sur la Convention. Je remercie* ***Luc Abbadie*** *de m'accueillir à l'UMR 7618 Bioemco et* ***Philippe Mora*** *de m'accueillir dans l'équipe Interations Plantes-Environnement et pour sa gentillesse à chaque fois que j'avais besoin de sa signature. Je remercie de façon particulière la secrétaire de l'Ecole Doctorale SIE* ***Brigitte David*** *pour sa volonté d'effectuer mon inscription, de résoudre la bureaucratie liée à ma cotutelle, de répondre à mes questions et aussi pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa patience.*

Le temps que j'ai passé en France pendant ma thèse est devenu moins difficile grâce à l'appui d'amis brésiliens que je me suis fait pendant cette période. Parmi eux, merci notamment à : ***Shirley****,* ***Marcela****,* ***Gisele****,* ***Maira****,* ***Luis Fernando****,* ***Tarcísio****,* ***Herbet****,* ***Cecília****,* ***Antonio****,* ***Rafael****,* ***Evelyn****,* ***Helena****,* ***Eliana****,* ***Osamu****,* ***Karen****,* ***Juliana****,* ***David****,* ***Américo****,* ***Roberta*** *et* ***Camila****.*

Les personnes qui appartiennent au Laboratoire de Bioénergétique et les autres membres du Département de Biochimie et Biologie Moléculaire méritent également mes remerciements. Ces gens m'ont soutenu et m'ont aidé d'une manière ou d'une autre au cours de ma thèse, étant au Brésil ou en France, loin de tout le monde. Parmi ces personnes, je veux d'abord remercier mon amie ***Neuzinha****. Merci pour son aide et son soutien, non seulement pendant la période où j'étais au Brésil, mais surtout quand j'étais en France; elle a été d'une importance fondamentale pour ma croissance personnelle et professionnelle. Ensuite, je remercie mes amies d'études supérieures pour l'appui donné même quand j'étais loin, pour les moments de détente et pour les précieux conseils :* ***Andresiane****,* ***Bia****,* ***Camila****,* ***Carine****,* ***Carol****,* ***Georgia****,* ***Kátia****,* ***Lívia****,* ***Mirele*** *et* ***Nila****. Je remercie aussi les garçons du laboratoire pour tout le soutien et pour les moments de détent :* ***Edson Garantizado****,* ***Flávio****,* ***Henrique****,* ***Pedro*** *et en spécial* ***Edson Rocha,*** *pour sa gentillesse et sa patience de m'apprendre la partie bioinformatique de mon travail. Merci à* ***Michelle*** *pour son aide dans toutes les questions bureaucratiques du laboratoire, ce qui facilitait notre travail, et pour les moments de détente. Merci aux Professeurs* ***Alana****,* ***Erika*** *et* ***Luciana*** *de m'avoir soutenue et conseillée pendant ces années et aussi à* ***Malu*** *de m'avoir montré l'exemple pour le travail des lipides effectué en France. Je remercie également* ***Adolph****,* ***Dalton****,* ***Izabel****,* ***Janaína****,* ***Joanna****,* ***Karine****,* ***Karol****,* ***Luis Matheus*** *et* ***Nayara,*** *les étudiants d'initiation scientifique*

du laboratoire pour leur soutien et les bons moments partagés. Je remercie également nos collègues du Département, notamment ***Adilton*** *et* ***Natássia*** *pour leur soutien, leurs conseils et les bons moments partagés. Merci à* ***Nega*** *et à* ***Teka*** *pour le nettoyage et l'hygiène de notre environnement de travail. Je remercie notre coordinateur* ***Pr. Márcio Ramos*** *pour tout le soutien, le professionnalisme et ses enseignements au cours de ces années, et aussi la secrétaire de l'Ecole Doctorale* ***Fátima*** *pour sa volonté de résoudre la bureaucratie liée à mon inscription et de répondre à mes nombreuses questions. Je remercie également les autres fonctionnaires du Département pour leur soutien chaque fois que j'avais besoin :* ***Daniel****,* ***Edberto****,* ***Gildemar*** *et* ***Gilmar****.*

Merci au ***CNPq*** *pour la délivrance de bourse de thèse au Brésil et à la* ***CAPES*** *pour la bourse de thèse en France.*

Je remercie les autres ***membres du jury*** *pour leur précieuse participation : Professeur Ana Rita, qui a fourni son temps, en provenance du Portugal et qui a été d'une importance fondamentale pour les observations en ce qui concernent les lipides, et qui a accepté de rédiger le rapport de thèse ; Professeur Ivan, qui a également fourni son temps, en provenance de Sao Paulo, en ajoutant de précieux conseils en matière de biologie moléculaire, ainsi qu'avec sa participation comme Rapporteur de thèse ; Professeur Erivalda, qui, à travers ses conseils, a collaboré pour une bonne rédaction de la thèse.*

Je remercie ***ma famille : Joselino (père)****,* ***Rosalba (mère)****,* ***Bruna (sœur)*** *et* ***Roberto (frère)*** *de m'avoir soutenue pendant ces années et d'avoir supporté la distance pour que je puisse faire mon doctorat à l'étranger.*

Enfin, je remercie ***Dieu*** *de m'avoir donné la force et l'illumination pour la réalisation et l'achèvement de ce travail.*

« J’ai trouvé le sens de la raison qui m’entraîne

A chaque pas sur le devant de la scène

J'ai trouvé le sens de la vie que je mène

Et je l'aime »

(Tal, chanteuse française)

Résumé

Les changements climatiques globaux sont responsables de l'augmentation de la fréquence des épisodes de sécheresse et de fortes concentrations d'ozone troposphérique, qui peuvent se produire simultanément, en réduisant la croissance des plantes, en limitant la production agricole et en affectant la fourniture de nourriture pour une population mondiale croissante. Ces contraintes environnementales peuvent conduire à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène en favorisant le stress oxydatif et provoquant un déséquilibre métabolique. Les membranes cellulaires sont les premières cibles des dommages induits par le stress et la préservation de l'intégrité cellulaire par le remodelage des lipides membranaires est essentielle pour la survie des plantes dans des conditions défavorables. L'objectif de cette étude était d'étudier les effets de la sécheresse, de l'ozone et des contraintes combinées chez deux cultivars de haricot niébé dotés de différents degrés de tolérance à la sécheresse: EPACE-1 (tolérante) et IT83-D (sensible) par des réponses physiologiques et par une étude portée sur la teneur et la composition des lipides de membrane, ainsi que dans l'expression de gènes liés à la biosynthèse et la dégradation des ces lipides. La sécheresse et l'ozone (120 ppb), seuls ou en combinaison, ont été appliqués aux plantes après trois semaines de germination pendant deux semaines. Après 7 et 14 jours de traitements, des paramètres physiologiques ont été déterminés. Les lipides extraits de feuilles ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. L'accumulation de transcrits (*VuMGD1*, *VuMGD2*, *VuDGD1*, *VuDGD2*, *VuCLS*, *VuFAD7*, *VuFAD8*, *VuPLD1* et *VuPAT1*) a été détecté chez les feuilles par PCR en temps réel. Chez les deux cultivars, la sécheresse a limité la croissance et la photosynthèse par la fermeture des stomates, ce qui a semblé impliquer l'expression génétique de la phospholipase D (*VuPLD1*). L'ozone a causé des dommages foliaires et de la dégradation des galactolipides, principalement chez IT83-D. Chez ce cultivar, les dommages ont impliqué dans l'augmentation du ratio DGDG:MGDG et de l'expression de *VuDGD2*. De plus, une diminution partielle de la teneur en phospholipides en réponse à l'ozone a été associée à une augmentation de l'expression de *VuPLD1*, ce qui suggère un remplacement des phospholipides par DGDG. Contrairement, le cultivar EPACE-1 en présence d'ozone, en même temps que la dégradation des galactolipides, a montré une augmentation de la teneur en lipides de réserve et en DPG (cardiolipine). La combinaison des contraintes a conduit à des résultats similaires à ceux de la sécheresse appliquée séparément, chez les deux cultivars, ce qui reflète probablement la forte restriction de l'absorption de l'ozone en raison de la fermeture des stomates induite par la sécheresse. En conclusion, les présents résultats mettent en évidence le rôle important des lipides membranaires dans les ajustements métaboliques qui se produisent pour régler la tolérance des plantes à la sécheresse et à l'ozone.

Mots-clés : contraintes combinées, lipides de membrane, ozone, sécheresse, *Vigna unguiculata.*

Study of the membrane lipid metabolism and associated genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp under combined abiotic stress (drought/ozone)

Abstract

Global climate changes are responsible for the increased frequency of episodes of drought and high concentrations of tropospheric ozone, which can occur simultaneously reducing plant growth, limiting agricultural production and affecting the food supply for an increasing world population. These environmental stresses can lead to the overproduction of reactive oxygen species, promoting oxidative stress and causing metabolic imbalance. Cell membranes are the primary targets of damage induced by stresses and the preservation of cell integrity through remodeling of membrane lipids is essential for plant survival under adverse conditions. The objective of this study was to investigate the effects of drought, ozone and the combined stresses in two cowpea cultivars with different degrees of drought tolerance: EPACE-1 (tolerant) and IT83-D (susceptible) through physiological responses and a study focused on the content and composition of membrane lipids, as well as on the expression of genes related to the biosynthesis and degradation of these lipids. Drought and ozone (120 ppb), isolated or in combination, were applied on three-week-old seedlings during two weeks. After 7 and 14 days of treatments, physiological parameters were determined. Lipids extracted from leaves were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. Transcript accumulation (*VuMGD1*, *VuMGD2*, *VuDGD1*, *VuDGD2*, *VuCLS*, *VuFAD7*, *VuFAD8*, *VuPLD1* and *VuPAT1*) was detected in leaves by real time PCR. In both cultivars, drought inhibited the plant growth and photosynthesis through stomatal closure, which appeared to involve the gene expression of phospholipase D (*VuPLD1*). Ozone caused foliar injury and degradation of galactolipids, mainly in IT83-D. In this cultivar, the damage resulted in an increase in DGDG:MGDG ratio and in *VuDGD2* expression. Furthermore, a partial decrease in the phospholipids content in response to ozone was associated with an increase in *VuPLD1* expression, suggesting a replacement of phospholipids by DGDG. Differently, EPACE-1 cultivar in the presence of ozone, concomitantly with the degradation of galactolipids, showed an increase in storage lipids and DPG (cardiolipin) contents. The two stresses in combination led to results similar to those observed in response to the drought treatment alone, in both cultivars, which likely reflected the severe restriction of ozone uptake resulting from drought-induced stomatal closure. In conclusion, the present results highlight the prominent role of membrane lipids in the metabolic adjustments that occur for the plant tolerance to drought and ozone.

Keywords : combined stresses, drought, membrane lipids, ozone, *Vigna unguiculata.*

Liste des Figures

Etat de l'Art :

Figure 1 : Répartition de l'ozone dans l'atmosphère terrestre selon l'altitude……..... **4**

Figure 2 : Représentation schématique du cycle de l'ozone troposphérique……. **5**

Figure 3 : Historique et prévision des concentrations troposphériques en ozone de 1840 à 2100…… **6**

Figure 4 : Les effets de l'ozone sur les feuilles des plantes……... **11**

Figure 5 : L'évolution de la sècheresse au cours des années……. **14**

Figure 6 : Illustration de la réponse des plantes à la sécheresse…… **21**

Figure 7 : Modèle des effets de la production d'éthylène induite par l'ozone sur la fermeture des stomates induite par l'ABA……. **24**

Figure 8 : Structure des glycérophospholipides……. **27**

Figure 9 : Structure des galactolipides et d'un sulfolipide…… **28**

Figure 10 : Planches Botaniques représentant *Vigna unguiculata* (L.) Walp…… **41**

Matériels et Méthodes :

Figure 11 : Chambre de germination où les plantes ont été cultivées pendant deux semaines dans des conditions contrôlées…… **46**

Figure 12 : Chambres phytotroniques où les plantes ont été soumises à une période d'acclimatation d'une semaine et soumises aux différents traitements pour 14 jours…… **47**

Figure 13 : Les différentes classes de lipides visualisées sous lumière UV après pulvérisation de primuline sur la plaque de CCM…….. **52**

Figure 14 : Aperçu simplifié de la disposition des échantillons sur une plaque de qPCR……..... **65**

Résultats :

Figure 15 : Masse sèche de la partie aérienne de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)…….. **69**

Figure 16 : Teneur relative en eau de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)…….. **69**

Figure 17 : **(a)**. Rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m) et **(b)**. Rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)…… **70**

Figure 18 : Conductance stomatique (g_s) de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)…….. **71**

Figure 19 : Détection de peroxyde d'hydrogène à l'aide d'une coloration au DAB dans les feuilles de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) exposées aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS)……. **73**

Figure 20 : Teneur en lipides totaux de feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)…….. **74**

Figure 21 : Teneur de MGDG **(a)** et de DGDG **(b)** dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)……... **77**

Figure 22 : Rapport DGDG:MGDG dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)…… **78**

Figure 23 : Rapport AG totaux : AG membranaires dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), **82**

ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)……...

Figure 24 : Teneur de phospholipides dans les feuilles de plantes d'EPACE-1 **(a)** et d'IT83-D **(b)** soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)……. **83**

Figure 25 : Séquences nucléotidique (en noir) et en aminoacides (en bleu) déduite de l' ADNc de *VuCLS* qui code la cardiolipin synthase chez *V.unguiculata*…… **92**

Figure 26 : Alignement de la cardiolipine synthase (CLS) de *Vigna unguiculata* (Vu) et d'autres représentants de l'ordre Fabales……. **93**

Figure 27 : Arbre phylogénétique des séquences en acides aminés de la cardiolipine synthase (CLS) chez une espèce représentative des dicotylédones, une espèce représentative des monocotylédones et des espèces représentatives de l'ordre Fabales…… **94**

Figure 28 : Expression relative de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans les feuilles de plantes d'EPACE-1 **(a,b)** et d'IT83-D **(c,d)** soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc)…… **97**

Liste des Tableaux

Matériel et Méthodes :

Tableau 1 : Gènes retenus pour les analyses d'expression ; produit génique ; séquences (sens et antisens) des oligonucléotides spécifiques de *V. unguiculata* utilisées comme amorces dans les réactions de qPCR ; taille attendue des fragments amplifiés par réaction de qPCR ; N° d'accession..……..... **63**

Tableau 2 : Gènes de référence testés ; produit génique ; séquences des oligonucléotides spécifiques de *V. unguiculata* utilisées comme amorces dans les réactions de qPCR ; taille attendue des fragments amplifiés par réaction de qPCR ; N° d'accession……. **64**

Résultats :

Tableau 3 : Moyenne de 12h de concentration d'ozone, indice d'exposition à l'ozone (AOT40, les concentrations d'ozone accumulées au-dessus d'un seuil de 40 ppb) et absorption stomatique (POD_0, la dose phytotoxique d'ozone, exprimée en tant que flux stomatique d'ozone cumulé), dans lesquels les plantes de niébé (cultivars EPACE-1 et IT83-D) ont été soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS)…… **72**

Tableau 4 : Composition en acides gras des lipides totaux dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS)……. **75**

Tableau 5 : Composition en acides gras de MGDG **(a)** et de DGDG **(b)** dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS)…….. **80**

Tableau 6 : Composition en acides gras de PC **(a)**, PG **(b)**, PI **(c)**, PE **(d)**, PA **(e)** et DPG **(f)** dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS)……. **86**

Liste des Abréviations

ABA	Acide abscissique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire des ARN messagers
AG	Acides gras
AGT	Acides gras totaux
Ah	*Arachis hypogaea*
ANOVA	Analyse de variance
AOT40	*Accumulated ozone exposure over a threshold of 40 ppb* (dose cumulative d'ozone au-dessus du seuil de concentration d'ozone de 40 ppb)
APX	Ascorbate peroxydase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
At	*Arabdopsis thaliana*
BHT	Hydroxytoluène butyle
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
C	Contrôle
Ca	*Cicer arietinum*
CAT	Catalase
Cc	*Cajanus cajan*
CDP	Cytidine-diphosphate
CFC	Chlorofluorocarbures
CLS	Cardiolipin synthase
COV	Composés organiques volatils
Ct	Nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection
CTP	Cytidine-triphosphate
DAB	3,3'-diaminobenzine tétrahydrochloride

DAG	Diacylglycérol
DGDG	Digalactosyldiacylglycérol
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DPG	Diphosphatidylglycérol
DTT	Dithiothréitol
E.R.	Expression relative
EMAG	Esters méthyliques d'acides gras
EPACE	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Ceará
EROs	Espèces réactives de l'oxygène
EST	*Expressed sequence tag* (marqueur de séquence transcrite)
FAD	*Fatty acid desaturase*
$\mathbf{F_{O3}}$	Flux stomatique d'ozone
$\mathbf{F_S}$	Fluorescence à l'état stationnaire
Fv/Fm	Rendement quantique maximal du photosystème II
Gm	*Glycine max*
$\mathbf{g_{O3}}$	Conductance stomatique à l'ozone
$\mathbf{g_s}$	Conductance stomatique à la vapeur d'eau
IPTG	Isopropyl b-D-thiogalactopyranoside
La	*Lupinus angustifolius*
LAH	Lipide acyle-hydrolases
LB	Milieu de culture Luria Bertani
Lj	*Lotus japonus*
LN	Lipides neutres
MDA	Malondialdéhyde
MEGA	*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
MF	Masse fraîche
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérol
MS	Masse sèche
MSPA	Masse sèche de la partie aérienne
MT	Masse à pleine turgescence
Mt	*Medicago truncatula*
NIST	*National Institute of Standards Technology*

O	Ozone
Os	*Oryza sativa*
OS	Ozone + sécheresse
PA	Acide phosphatidique
PAT	*Patatin-like lipid acyl -hydrolase*
PC	Phosphatidylcholine
PCR	*Polymerase chain reaction* (amplification en chaîne par polymérase)
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidyl glycérol
PGP	Phosphatidyl-glycérolphosphate
PI	Phophatidylinositol
PLA1	Phospholipases A1
PLA2	Phospholipases A2
PLC	Phospholipases C
PLD	Phospholipases D
POD_0	*Phytotoxic ozone dose above a threshold of 0 nmol.m^{-2}* (flux stomatique d'ozone cumulé au-delà d'un seuil de 0 nmol.m^{-2})
ppb	Parties par milliards, en volume
PPFD	*Photosynthetic photon flux density* (densité de flux de photons photosynthétiques)
PS	Phosphatidylsérine
PSII	Photosystème II
Pv	*Phaseolus vulgaris*
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
S	Sécheresse
SIR	*Single-ion-recording*
SQDG	Sulfoquinivosyl-diacylglycérol
TAE	Tris, Acétate, EDTA
TAG	Triacylglycérol
Taq	*Thermus aquaticus*
Tp	*Trifolium pratense*
TRE	Teneur Relative en Eau
UDP-Gal	Uridine diphosphate galactose

UV	Ultra violette
Va	*Vigna angularis*
Vu	*Vigna unguiculata*
WGS	*Whole Genome Sequencing*
X-GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D- galactopyranoside
$\mathbf{\Phi_{PSII}}$	Rendement quantique du photosystème II
16:0	Acide palmitique ; acide hexadécanoïque
16:3	Acide hexadéca-triénoïque
18:0	Acide stéarique ; acide octadécanoïque
18:1	Acide oléique ; acide cis-9-octadécamonoénoïque
18:2	Acide linoléique; acide cis-9,12-octadécadiénoïque ; oméga 6
18:3	Acide linolénique; acide cis-9,12,15-octadécatriénoïque ; oméga 3

Liste des Annexes

Annexe 1 : Détails sur le vecteur de clonage plasmidique pGEM-TEasy et son mode de fonctionnement……. **135**

Annexe 2 : Photos des plantes et des feuilles à 14 jours de traitements…….. **136**

Annexe 3 : Résumé schématique des résultats et discussion…….. **138**

Annexe 4 : Liste des articles……....……... **140**

Table des matières

Etat de l'art **1**

I. L'OZONE **2**

I.1 L'ozone stratosphérique **2**

I.2 L'ozone troposphérique **2**

I.2.1 Formation de l'ozone **2**

I.2.2 Evolution des concentrations en ozone troposphérique **5**

I.3 Effets toxiques de l'ozone troposphérique sur les plantes **7**

I.3.1 Symptômes phénotypiques **7**

I.3.2 Production de biomasse **7**

I.3.3 Photosynthèse et conductance stomatique **8**

I.3.4 Sénescence foliaire **9**

I.4 L'action de l'ozone dans les cellules **9**

I.4.1 Diffusion dans les tissus foliaires et stress oxydatif **9**

I.5 Réponses des plantes à l'ozone **10**

I.5.1 La détoxification **10**

II. LA SECHERESSE **12**

II.1 Définition et caractéristiques **12**

II.2 Effets de la sécheresse sur les plantes **15**

II.2.1 Symptômes phénotypiques **15**

II.2.2 Production de biomasse **15**

II.2.3 Conductance stomatique et photosynthèse **15**

II.2.4 Sénescence foliaire **16**

II.2.5 Intégrité des systèmes membranaires **17**

II.3 L'action de la sécheresse dans les cellules **17**

II.3.1 Perception et signalisation du stress hydrique **17**

II.3.2 Production d'EROs et stress oxydatif **18**

II.4 Réponses des plantes à la sécheresse **19**

II.4.1 Stratégies d'adaptation **19**

II.4.2 Réponses cellulaires **19**
III. LES CONTRAINTES COMBINEES **22**
III.1 Caractéristiques **22**
III.2 Incidence de l'ozone et de la sécheresse à l'échelle mondiale **22**
III.3 Interaction de l'ozone et de la sécheresse combinés au niveau cellulaire **23**
IV. LES LIPIDES MEMBRANAIRES **25**
IV.1 Généralités sur les lipides **25**
IV.2 Les lipides membranaires des végétaux **26**
IV.2.1 Glycérolipides : phospholipides et glycolipides **26**
IV.3 Biosynthèse des lipides membranaires **28**
IV.3.1 Voies procaryotique et eucaryotique **28**
IV.3.2 Les désaturases d'acides gras (FADs) **29**
IV.3.3 Biosynthèse de la Phosphatidylcoline (PC) **30**
IV.3.4 Biosynthèse du Phosphatidylglycérol (PG) **31**
IV.3.5 Biosynthèse du Diphosphatidylglycérol (DPG ou Cardiolipine) **31**
IV.3.6 Biosynthèse de la Phosphatidylethanolamine (PE) **32**
IV.3.7 Biosynthèse de la Phosphatidylsérine (PS) **32**
IV.3.8 Biosynthèse du Phosphatidylinosytol (PI) **33**
IV.3.9 Biosynthèse du Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) **33**
IV.3.10 Biosynthèse du Digalactosyldiacylglycérol (DGDG) **34**
IV.4 Dégradation des lipides membranaires **35**
IV.4.1 Phospholipase D **35**
IV.4.2 Lipide acyle-hydrolase type patatine **35**
IV.5 Effets de l'ozone sur les lipides membranaires **36**
IV.6 Effets de la sécheresse sur les lipides membranaires **38**
V. *Vigna unguiculata* (L.) Walp **39**
V.1 Description **39**
V.1.1 Classification botanique et origine **39**
V.2 Importance économique et nutritionnelle **39**
V.2.1 Culture vivrière **39**
V.2.2 Valeur nutritive **40**
V.2.3 Fixation de l'azote **40**

V.3 Climat **40**

V.3.1 Les capacités de résistance à la sécheresse **40**

V.3.2 L'impact de l'ozone sur le haricot **41**

Objectifs **42**

Matériels et Méthodes **44**

1. Matériel végétal **45**

2. Conditions de culture et traitements **45**

2.1 Procédure de fumigation à l'ozone **47**

3. Analyses physiologiques **48**

3.1 Mesure de la masse sèche de la partie aérienne **48**

3.2 Mesure de la teneur relative en eau **48**

3.3 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne **48**

3.4 Mesure de la conductance stomatique à la vapeur d'eau **49**

3.5 Indices d'exposition à l'ozone et de dose d'ozone **49**

3.6 Accumulation de peroxyde d'hydrogène dans les feuilles **51**

4. Analyses Biochimiques **51**

4.1 Extraction des lipides totaux à partir de feuilles de haricot niébé **51**

4.2 Séparation des classes lipidiques par chromatographie sur couche mince **51**

4.3 Méthylation des acides gras **53**

4.4 Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse **53**

5. Analyses moléculaires **54**

5.1 Extraction d'ARNs totaux **54**

5.2 Synthèse de l'ADN complémentaire par transcription inverse **56**

5.3 Dessin des amorces de la cardiolipine synthase de Vigna unguiculata pour clonage **56**

5.4 Amplification de l'ADNc de la cardiolipine synthase par PCR conventionnelle **57**

5.5 Clonage et séquençage du cDNA de la cardiolipine synthase **58**

5.5.1 Ligation de produits d'amplification PCR dans un vecteur de clonage plasmidique **58**

5.5.2 Transformation de bactéries compétentes **58**

5.5.3 Réaction de PCR sur colonies bactériennes **59**

5.5.4 Minipréparation d'ADN plasmidique **60**
5.5.5 Séquençage d'ADN **60**
5.6 Analyse des séquences de nucléotides de la VuCLS par bioinformatique **60**
5.7 Dessin des amorces de la cardiolipine synthase de Vigna unguiculata pour PCR en temps réel **61**
5.8 Analyse de l'expression de gènes du métabolisme des lipides par PCR en temps réel **62**
5.9 Analyses statistiques **66**
Résultats **67**
1. Réponses physiologiques de plantes de Vigna unguiculata à la sécheresse et à l'ozone **68**
2. Indices d'exposition à l'ozone et de dose d'ozone, lésions foliaires et accumulation de peroxyde d'hydrogène dans les feuilles **71**
3. Teneur en lipides totaux dans les feuilles de niébé **73**
4. Composition en acides gras des lipides totaux **74**
5. Teneur en galactolipides dans les feuilles de niébé **75**
6. Rapport DGDG:MGDG **78**
7. Composition en acides gras des galactolipides **79**
8. Proportion de lipides neutres dans les feuilles de niébé **81**
9. Teneur en phospholipides dans les feuilles de niébé **82**
10. Composition en acides gras des phospholipides **84**
11. Identification du gène de Vigna unguiculata codant pour une cardiolipine synthase **89**
12. Expression des gènes codants des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides membranaires dans les feuilles de niébé **95**
Discussion **98**
1. Réponses physiologiques et moléculaires à la sécheresse **99**
2. Réponses physiologiques et moléculaires à l'ozone **101**
3. Différences inter-variétés de sensibilité à l'ozone **102**
4. Participation de DGD2 et de PLDα dans le remodelage de la membrane sous ozone chez IT83-D **103**
5. Rôle de la cardiolipine dans la tolérance à l'ozone chez EPACE-1 **105**
6. Atténuation par la sécheresse des effets de l'ozone à travers la réduction de son absorption stomatique **106**

Conclusion **107**

Références **109**

Annexes **134**

Etat de l'Art

I. L'OZONE

La molécule d'ozone (O_3) est une variété allotropique de l'oxygène, composée de trois atomes, présente naturellement dans l'atmosphère. Ces trois atomes d'oxygène sont disposés spatialement de manière à former un triangle isocèle de 1,278 Å formant un angle de 116,8°. À température ambiante, l'O_3 est un gaz incolore très électrophile avec un potentiel d'oxydo-réduction de 2,076 V. Au contact d'un milieu aqueux, l'O_3 possède une demi-vie très courte et se décompose rapidement pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont très réactives (Von Gunten, 2007).

I.1 L'ozone stratosphérique

L'ozone stratosphérique (entre 15 et 35 km d'altitude) constituant la couche d'ozone représente environ 80% du contenu global en ozone de l'atmosphère et protège la biosphère des effets nocifs de la radiation en absorbant les radiations UV-B ($200 < \lambda < 320$ nm) (Figure 1). Les chlorofluorocarbures (CFC) et d'autres polluants de l'air qui se diffusent dans la couche d'ozone sont responsables de la destruction de la couche d'ozone, ce qui augmente la quantité de rayonnement UV qui atteint la surface de la terre et affecte négativement la plupart des organismes vivants (Rowland, 2006; Solomon, 1999).

I.2 L'ozone troposphérique

I.2.1 Formation de l'ozone

Contrairement à l'ozone stratosphérique, qui protège contre les rayonnements solaires ultraviolet à ondes courtes, l'ozone troposphérique (entre 0 et 15 km d'altitude) est un polluant atmosphérique ainsi qu'un gaz à effet de serre (Booker et al., 2009) (Figure 1).

L'ozone troposphérique est formé par l'interaction entre les rayonnements UV du soleil et les dioxydes d'azote (NO_2) émis par les activités anthropiques (industrie et transports en zones urbaines). Le NO_2 absorbe des rayonnements UV et subit une décomposition en monoxyde d'azote (NO) et un atome d'oxygène actif (O^{2-}) (réaction 1) qui, en contact avec l'oxygène moléculaire (O_2), forme de l'ozone (O_3) (réaction 2). La réaction est réversible lorsque l'O_3 et le NO réagissent pour former O_2 et NO_2 (réaction 3). Par contre, les composés organiques volatils

(COVs) émis principalement par des sources naturelles, notamment par les plantes et aussi par l'industrie, peuvent former des espèces réactives de l'oxygène (radicaux comme HO_2^- ou RO_2^-) qui vont entrer en concurrence avec l'O_3 sur la formation de NO_2 (réaction 4), ce qui fait que l'O_3 s'accumule dans l'atmosphère, étant transporté vers les zones rurales et les forêts. Ces réactions qui font augmenter les concentrations d'ozone se produisent généralement au printemps et en été dans des conditions atmosphériques de haute température, haute irradiance et faible vitesse du vent (Finlayson-Pitts et Pitts, 1993; Jenkin et Clemitshaw, 2000) (Figure 2).

(1) $NO_2 + h\nu \rightarrow NO + O$

(2) $O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M$

où M est un partenaire de collision non affecté par la réaction

(3) $NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$

(4) $NO \rightarrow NO_2$

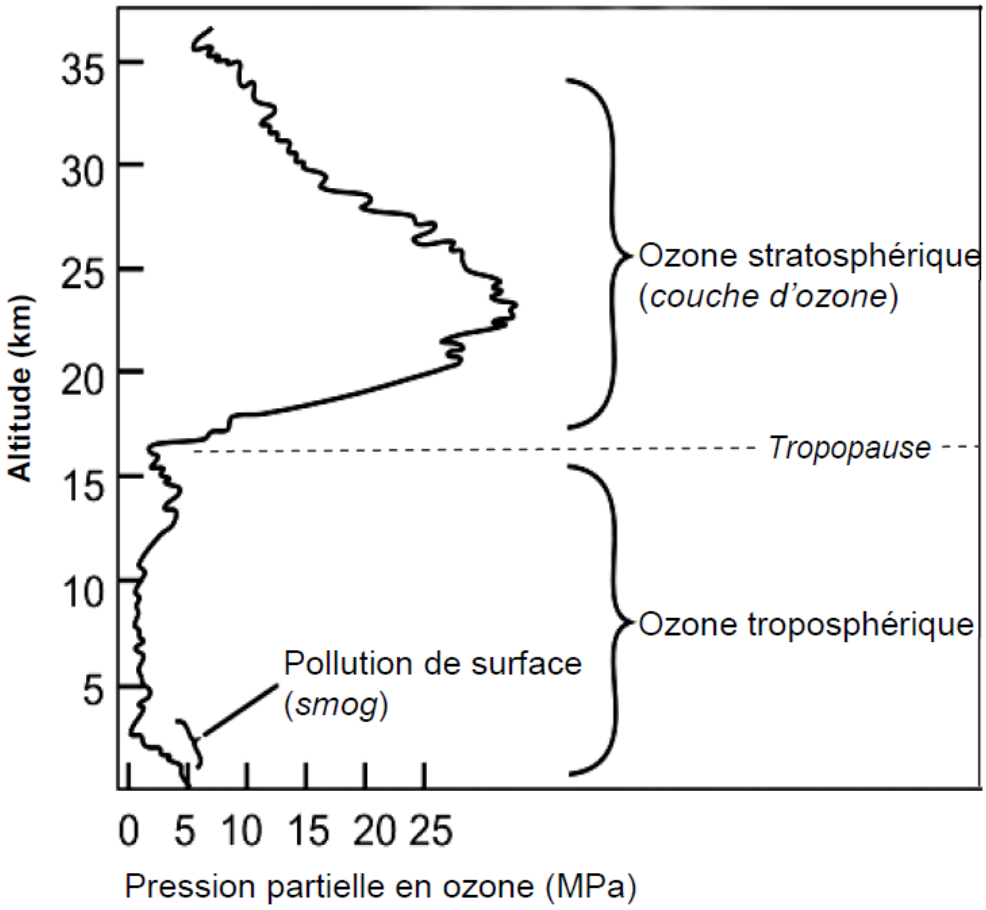


Figure 1 : Répartition de l'ozone dans l'atmosphère terrestre selon l'altitude (D'après NASA - *Earth Observing System (EOS) Science Plan*).

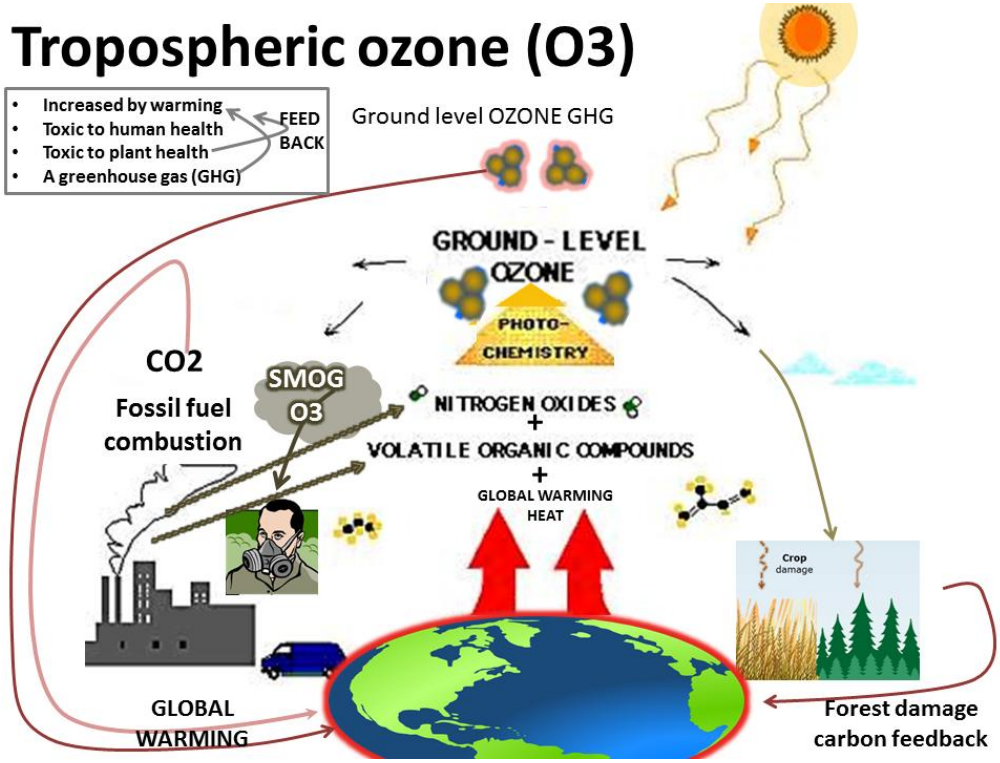


Figure 2 : Représentation schématique du cycle de l'ozone troposphérique. (D'après http://www.climatechange-foodsecurity.org/trop_ozone.html)

I.2.2 Evolution des concentrations en ozone troposphérique

L'évolution de l'ozone troposphérique dans le temps (Figure 3) attire beaucoup d'attention scientifique parce que l'ozone est un gaz à effet de serre et des augmentations importantes qui ont eu lieu au cours du dernier siècle ont contribué au changement climatique (Parrish et al., 2012). L'échelle du problème a pris de l'ampleur au cours des 25 dernières années en tant que raison de l'augmentation de la densité de la population, de l'industrialisation et des activités liées au transport dans de vastes régions du monde, en particulier dans les pays moins développés (Fiscus et al., 2005).

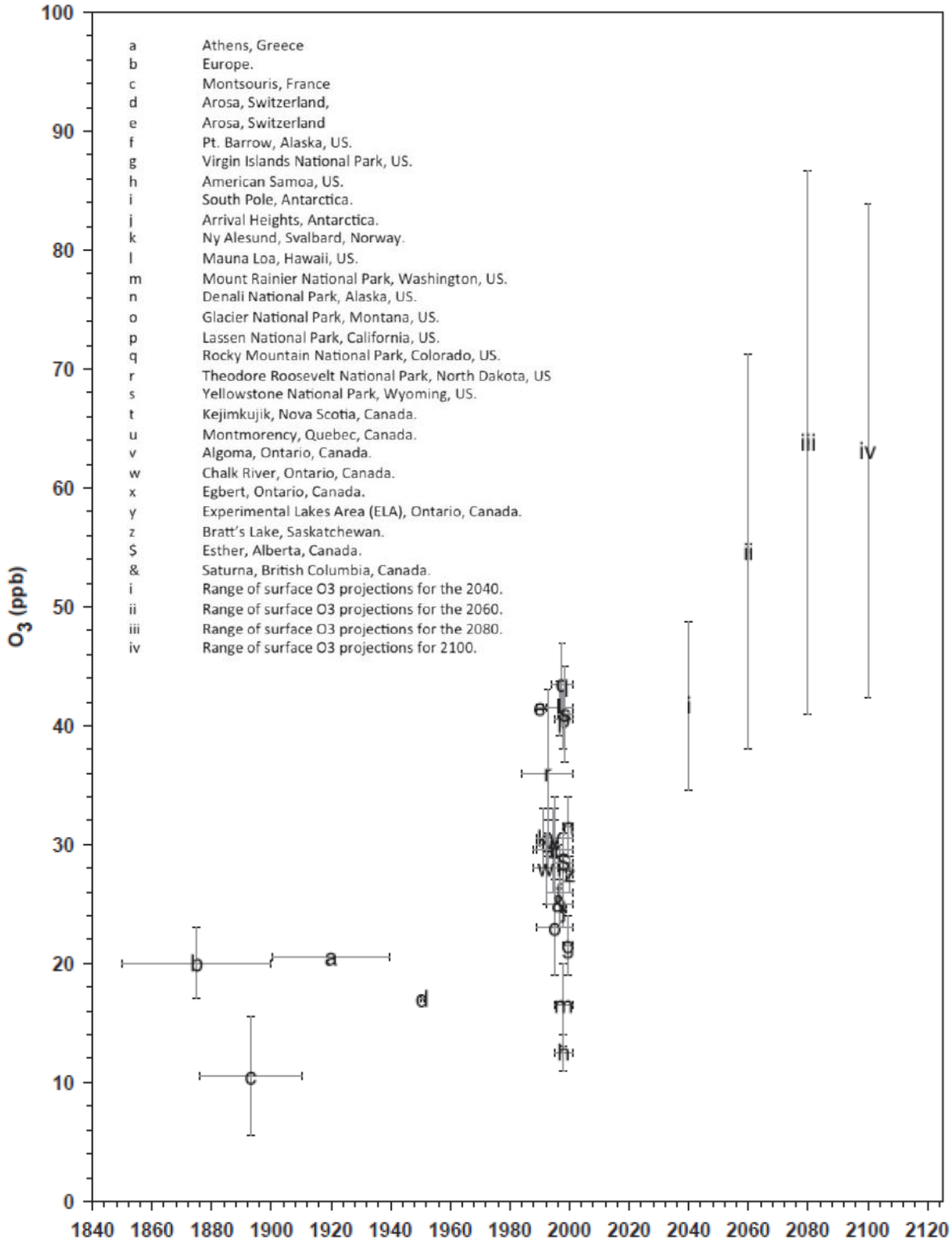


Figure 3 : Historique et prévision des concentrations troposphériques en ozone de 1840 à 2100. Valeurs historiques (a, b, c, d), mesures récentes (e à &) et projections du GIEC (i, ii, iii, iv). Les barres d'erreurs correspondent aux ecarts-type indiqués dans les publications sources (D'aprèsVingarzan, 2004).

La concentration moyenne d'ozone troposphérique est plus importante dans l'hémisphère Nord, urbanisé et industrialisé, que dans l'hémisphère Sud (Oltmans et al., 2006). Dans les régions tempérées de l'hémisphère nord, la concentration d'ozone pendant le jour est comprise entre 20 et 45 ppb, avec la variabilité étant fonction de la localisation géographique, l'altitude et l'étendue de l'influence anthropique (Vingarzan, 2004). De l'ère préindustrielle à l'année 2000, la concentration moyenne d'ozone a augmenté d'environ 38 $nmol.mol^{-1}$ à environ 50 $nmol.mol^{-1}$. Les plus pessimistes des projections indiquent une augmentation supplémentaire de 80 $nmol.mol^{-1}$ en 2100 (Fiscus et al., 2005).

I.3 Effets toxiques de l'ozone troposphérique sur les plantes

L'ozone troposphérique peut endommager les plantes, ce qui cause des effets écologiques et économiques importants, avec des pertes de productivité ainsi que la mort de la plante (Paoletti et Manning, 2007).

I.3.1 Symptômes phénotypiques

Les conséquences les plus visibles de la pollution due à l'ozone troposphérique sur la végétation sont les dommages qui se manifestent comme taches chlorotiques ou nécrotiques sur la surface des feuilles en forme de pointillés, qui peuvent fusionner pour former de plus grandes zones blessées (Figure 4). Ces symptômes ont été confirmés sur 27 espèces végétales qui poussent dans les champs des agriculteurs à travers l'Europe, et sont causés par l'induction de radicaux libres de la mort cellulaire non régulée et/ou programmée (Mills et al., 2011). Les injuries visibles sont un moyen par lequel l'ozone peut éventuellement réduire le rendement, même si elles ne se produisent qu'au début du stade végétatif de croissance des cultures (Wilkinson et al., 2012).

I.3.2 Production de biomasse

L'exposition chronique à l'ozone est responsable de la réduction de la biomasse végétale générale et des pertes significatives de croissance et de rendement pour de nombreuses espèces de première importance agronomique (Wilkinson et al., 2012). La réduction de la biomasse racinaire (ce qui indirectement réduit le rendement) est due soit d'une réduction de la translocation de carbone de la partie aérienne à la racine via le phloème, soit d'un effet de l'ozone sur les concentrations des hormones végétales telle que l'éthylène, qui contrôle la croissance des

racines (Wilkinson et Davies, 2010). Les réductions induites par l'ozone dans la biomasse racinaire cause indirectement un impact sur la partie aérienne et donc sur la production de grain via réduction de la capacité de la plante de prendre les nutriments et l'eau nécessaires pour soutenir la croissance et le rendement (Wilkinson et al., 2012).

Il était estimé que les pertes induites par l'ozone pour 23 cultures dans 47 pays européens étaient autour de 6,7 ± 2,5 milliards/an ou 2% de la production agricole en 2000 (Holland et al., 2006). Plus de 20% de la production agricole en Europe a été estimée être au risque de pertes de rendement de 5% ou plus en raison de la pollution par l'ozone (Mills et al., 2007). La concentration d'ozone en plongée à l'avenir réduira encore le rendement des cultures comme résultat du stress oxydatif dans les tissus foliaires et reproductifs (Fiscus et al., 2005).

I.3.3 Photosynthèse et conductance stomatique

Autre que des injuries visibles et le rendement des cultures, la photosynthèse est un facteur largement étudié chez les plantes en réponse à l'ozone. En général, l'exposition chronique à l'ozone cause des pertes de la capacité photosynthétique due principalement à la réduction de l'efficacité de carboxylation directement liée à la perte d'activité de la Rubisco ou à une diminution de sa concentration dans les feuilles, entraînant une hausse de la concentration interne en CO_2 (Ci) et une fermeture stomatique (Bagard et al., 2008; Dizengremel, 2001; Fiscus et al., 2005; Leitao et al., 2007; Pell et al., 1994) (Figure 4). Néanmoins, il existe un effet direct de l'ozone sur le fonctionnement des cellules stomatiques, induisant des changements de la réponse dynamique des stomates impliquant un découplage de la photosynthèse et la conductance stomatique (Lombardozzi et al., 2012). De plus, si l'ozone réduit les capacités photosynthétiques, la respiration est à l'inverse stimulée, tout comme l'activité de la PEPC, ce qui permet de contrebalancer en partie la diminution de la photosynthèse (Dghim et al., 2012 ; Dizengremel, 2001).

L'ozone présente également des effets néfastes sur le transport des électrons dans la photosynthèse, surtout sur la fonction du PSII (Fiscus et al., 2005). Des études avec *Phaseolus vulgaris* ont montré une baisse significative de Fv/Fm, qui représente l'efficacité de la capture de l'énergie d'excitation par le PSII dans les feuilles adaptées à l'obscurité, ce qui suggère des dommages ou désactivation du photosystème (Guidi et al., 2000, 2002).

I.3.4 Sénescence foliaire

L'un des effets les plus communs de l'ozone est de promouvoir la sénescence foliaire (Pell et al., 1997). Morgan et al. (2003) ont attribué la perte de rendement du soja à l'accélération de la sénescence, représentée par la diminution de la teneur en chlorophylle des feuilles exposées à l'ozone. La dégradation de la chlorophylle et de la Rubisco pourrait être une conséquence directe de l'exposition à l'ozone et initier la sénescence foliaire, ou résulter du déclenchement de la sénescence foliaire par l'ozone par d'autres voies (Pell et al., 1994).

I.4 L'action de l'ozone dans les cellules

I.4.1 Diffusion dans les tissus foliaires et stress oxydatif

Au cours de la lumière du jour, lorsque la photosynthèse est active, et quand il n'y a pas de forte sécheresse, les stomates des feuilles sont largement ouverts pour permettre l'absorption du CO_2 et la libération de l'O_2. Au même temps, les molécules d'ozone entrent dans les feuilles des plantes à travers les stomates. Donc, les stomates représentent la première barrière mécanique de défense permettant de réguler l'entrée d'ozone dans les plantes (Renaut et al., 2009) (Figure 4). A l'intérieur des feuilles, l'ozone est hautement réactif et peut interagir rapidement avec l'eau, les thiols, les composés phénoliques et les métaux de transition dans l'apoplaste et avec les membranes et des parois des cellules voisines pour produire des espèces réactives de l'oxygène (EROs), comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH•), le radical perhydroxyle (HOO•), le radical superoxyde ($O2•^-$), le radical hyperoxyde ($•O_2H$) ou l'oxygène singlet (^1O) (Fiscus et al., 2005 ; Langebartels et al., 2002 ; Ashmore, 2005 ; Wittig et al., 2009, 2007). Ces EROs peuvent réagir avec les lipides membranaires afin de générer des peroxydes lipidiques qui peuvent déclencher une série de réactions productrices d'intermédiaires oxygénés réactifs. Ces radicaux libres nuisibles et leurs produits réagissent avec les protéines, l'ADN et les lipides de membrane pour provoquer la réduction de la photosynthèse, une fuite d'électrolyte, une sénescence accélérée et des effets néfastes sur des processus métaboliques, généralement associés à l'exposition à l'ozone (Sharma et Davis, 1997). Cependant, dans des conditions optimales, les EROs sont des molécules de signalisation produites par les réactions qui se produisent au niveau des chaînes de transport d'électrons des chloroplastes, lors de la photosynthèse, des mitochondries, lors de la respiration cellulaire, et des peroxysomes, lors de la photorespiration (Blokhina et Fagerstedt , 2010 ; Asada, 2006 ; Del Rio et al., 2006). L'action des EROs comme

molécule toxique et/ou de signalisation dépend de l'équilibre délicat entre sa production et sa détoxication. En raison des rôles multifonctionnels des EROs, il est nécessaire pour les cellules contrôler étroitement le niveau des EROs pour éviter tout dommage oxydatif et permettre la signalisation cellulaire (Mittler, 2006 ; Sharma et al., 2012).

I.5 Réponses des plantes à l'ozone

I.5.1 La détoxification

La principale réponse biochimique des plantes comme stratégie adaptative à n'importe quel type de stress environnemental est l'augmentation des activités et des quantités d'enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, gaïacol peroxydase, ascorbate peroxydase, etc.) et des métabolites ou des antioxydants non-enzymatiques (ascorbate, glutathion, caroténoïdes, tocophérols et des composés phénoliques) (Sharma et al., 2012 ; Sharma et Davis, 1997). Bien que l'ozone ambiant à des concentrations élevées est toxique pour tout organisme vivant, des espèces de plantes ont développé des réactions d'adaptation efficaces leur permettant de détoxifier cet air polluant (Fiscus et al., 2005; Kangasjärvi et al., 1994).

Parmi les antioxydants non-enzymatiques, l'acide ascorbique apoplastique forme la première ligne de défense contre l'ozone (Didyk et Blum, 2011; Fiscus et al., 2005; Sharma et Davis, 1997) (Figure 4). Il est d'abord synthétisé à l'intérieur des cellules suivi par le transport du cytoplasme à l'espace extracellulaire par des transporteurs spécifiques situés dans la membrane plasmique (Smirnoff et al., 2001; Horemans et al., 2000). L'acide ascorbique dans l'apoplaste des feuilles est un facteur essentiel dans la détoxification de l'ozone extracellulaire et des EROs, dans la protection des membranes plasmiques des dommages oxydatifs et dans la prévention d'injuries visibles. Il pourrait servir soit comme un charognard chimique directe d'ozone ou en tant que substrat pour des enzymes extracellulaires (par exemple l'ascorbate peroxydase) qui atténuaient les quantités d'EROs et donc affectaient la propagation du signal initial d'ozone (Fiscus et al., 2005; Sharma et Davis, 1997). Plusieurs études ont montré une corrélation entre l'ascorbate apoplastique et les niveaux d'ozone atmosphériques (Luwe et al., 1993). L'exposition à l'ozone a provoqué une augmentation des niveaux d'ascorbate apoplastique chez les feuilles de *Sedum album* (Castillo et Greppin, 1988) et chez les feuilles de blé (Fangmeier et al., 1994). Ces résultats, et d'autres, indiquent que l'ascorbate joue probablement un rôle important dans la fourniture de résistance au stress oxydatif imposé par l'exposition à l'ozone. Cependant, les

niveaux d'acide ascorbique dans l'apoplaste de feuilles peuvent être très faibles dans certaines espèces végétales, ce qui suggère que le séquestre extracellulaire d'ozone et d'EROs par l'ascorbate ne doit pas être un facteur signifiant chez toutes les plantes (Fiscus et al., 2005).

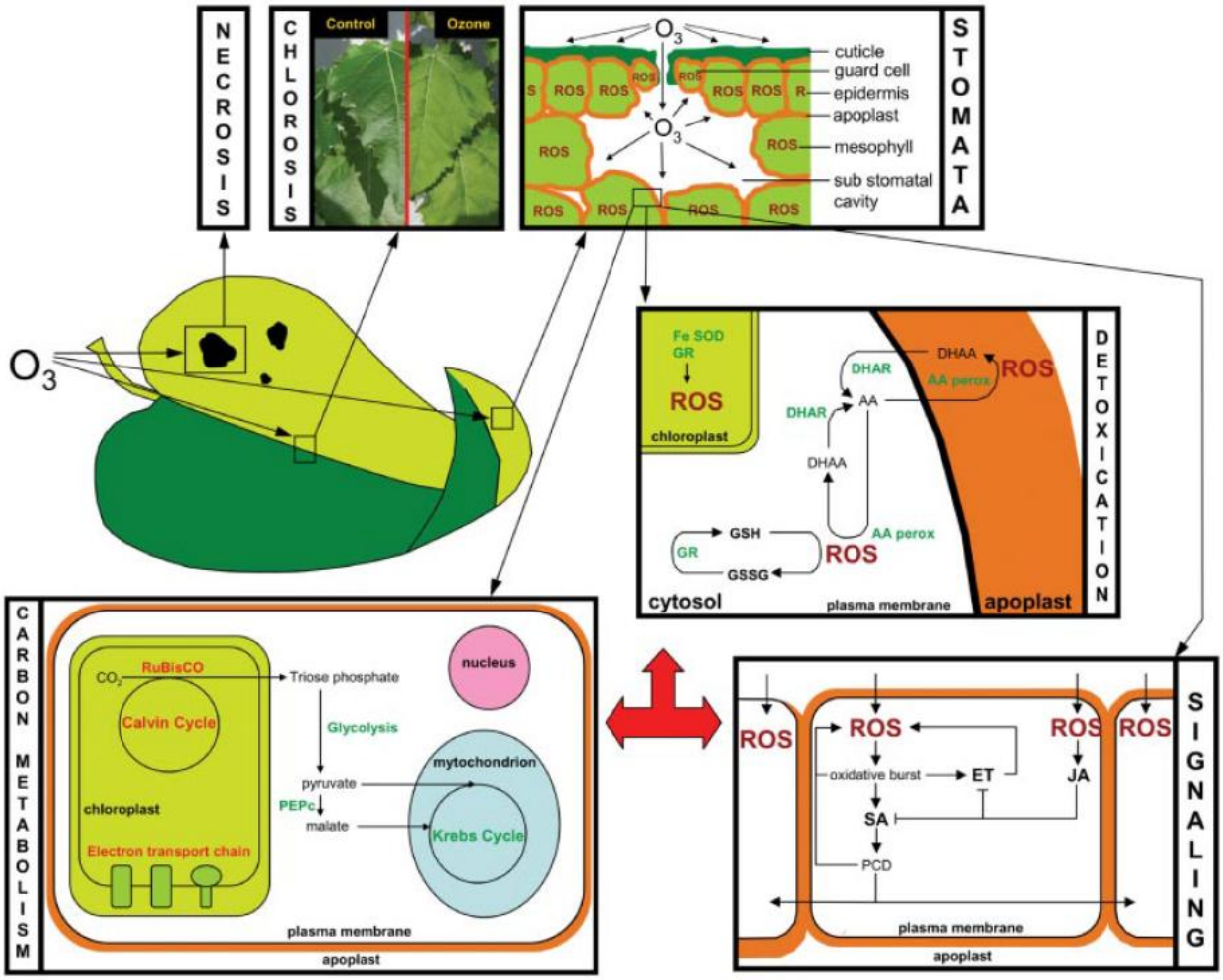


Figure 4 : Les effets de l'ozone sur les feuilles des plantes: des symptômes visuels : le développement d'une nécrose et d'une chlorose sur les feuilles ; les stomates : la diffusion de l'ozone pour les sièges primaires de contact; détoxification : voie de l'ascorbate, de la SOD et du glutathion; signalisation : l'activation les voies de l'éthylène/acide salicylique et du jasmonate ; le métabolisme du carbone : réduction de la photosynthèse et augmentation de la respiration (D'après Renaut et al., 2008).

II. LA SECHERESSE

II.1 Définition et caractéristiques

La sécheresse est un événement climatique extrême récurrent sur la Terre caractérisé par des précipitations pluviométriques inférieures à la normale sur une période de plusieurs mois ou années, souvent accompagnée avec des températures elevées. La période séchée est temporaire et se produit sur la plupart des régions du monde, même en milieu et régions humides. Cette sécheresse météorologique déclenche des autres types de sécheresse : hydrologique et agricole. La sécheresse hydrologique se produit lorsque le débit de la rivière et le stockage de l'eau dans les aquifères, les lacs et les réservoirs tombent en dessous des niveaux moyens à long terme. La sécheresse agricole est une période de sol sec qui résulte de la sécheresse météorologique, avec de forte évaporation, conduisant à la réduction de la production agricole. (Dai, 2010).

La sécheresse impact à la fois des ressources d'eaux de surface et souterraines et peut entraîner une diminution de l'approvisionnement en eau, une qualité de l'eau dégradée, des mauvaises récoltes, une baisse de la productivité de gamme, ainsi qui touchent une foule d'activités économiques et sociales (Mishra et Singh, 2010).

Au cours des dernières années, les sécheresses intenses de grande échelle ont été observées sur tous les continents, touchant de vastes étendues en Europe, Afrique, Asie, Australie, Amérique du Sud, Amérique Centrale et Amérique du Nord (Le Comte, 1997) (Figure 5). Dans les régions sèches, comme en Australie, Afrique du Nord, Amérique du Sud et certaines parties de la Chine et de l'Amérique du Nord, les précipitations annuelles se produisent pendant une quantité de seulement 25 jours. Même dans les endroits où la pluviométrie est connue pour être souvent présente, comme le Nord-Ouest des États-Unis et de l'Europe, il est intéressant de noter que la plupart des précipitations annuelles totales se produit généralement en moins de 80 jours. Par ailleurs, de fortes précipitations se produisent rarement (moins de quelques pour cent) et elles sont à seulement quelques millimètres par jour. Ainsi les régions où la plupart des précipitations annuelles se produit à moins en environ 10-15 jours sont vulnérables aux sécheresses (Sun et al., 2006). En 1988, une grave sécheresse survenue dans le centre et l'est des États-Unis avec des pertes très sévères pour l'agriculture et les industries connexes. Environ 67% des précipitations annuelles se produisent normalement dans environ 20-30 jours dans le sud-est des États-Unis, 30-40 jours dans le nord-est et 40-55 jours dans le nord-ouest, tandis que dans le sud-ouest sec, la

plupart des précipitations annuelles se produit généralement en moins de 10 jours. Ainsi, dans le sud-ouest sec, la manque de fortes pluies peuvent avoir un impact significatif sur le climat de cette année, ce qui explique pourquoi régions sèches sont vulnérables à la sécheresse. Des analyses montrent que le changement dans le nombre des jours de pluie est plus important que la variation de l'intensité dans la production de la sécheresse en 1988 (Sun et al., 2006).

La plus grande variabilité de jours de pluie se retrouve sur les régions arides et semi-arides, tandis que les variations de jours d'année en année sont généralement de petite taille sur les régions humides. Ceci est cohérent avec l'idée que les sécheresses sont beaucoup moins susceptibles de se produire dans les régions humides que dans les régions sèches, ce qui souligne donc l'importance d'épisodes de fortes précipitations dans la détermination de la disponibilité d'eau par région (Sun et al., 2006).

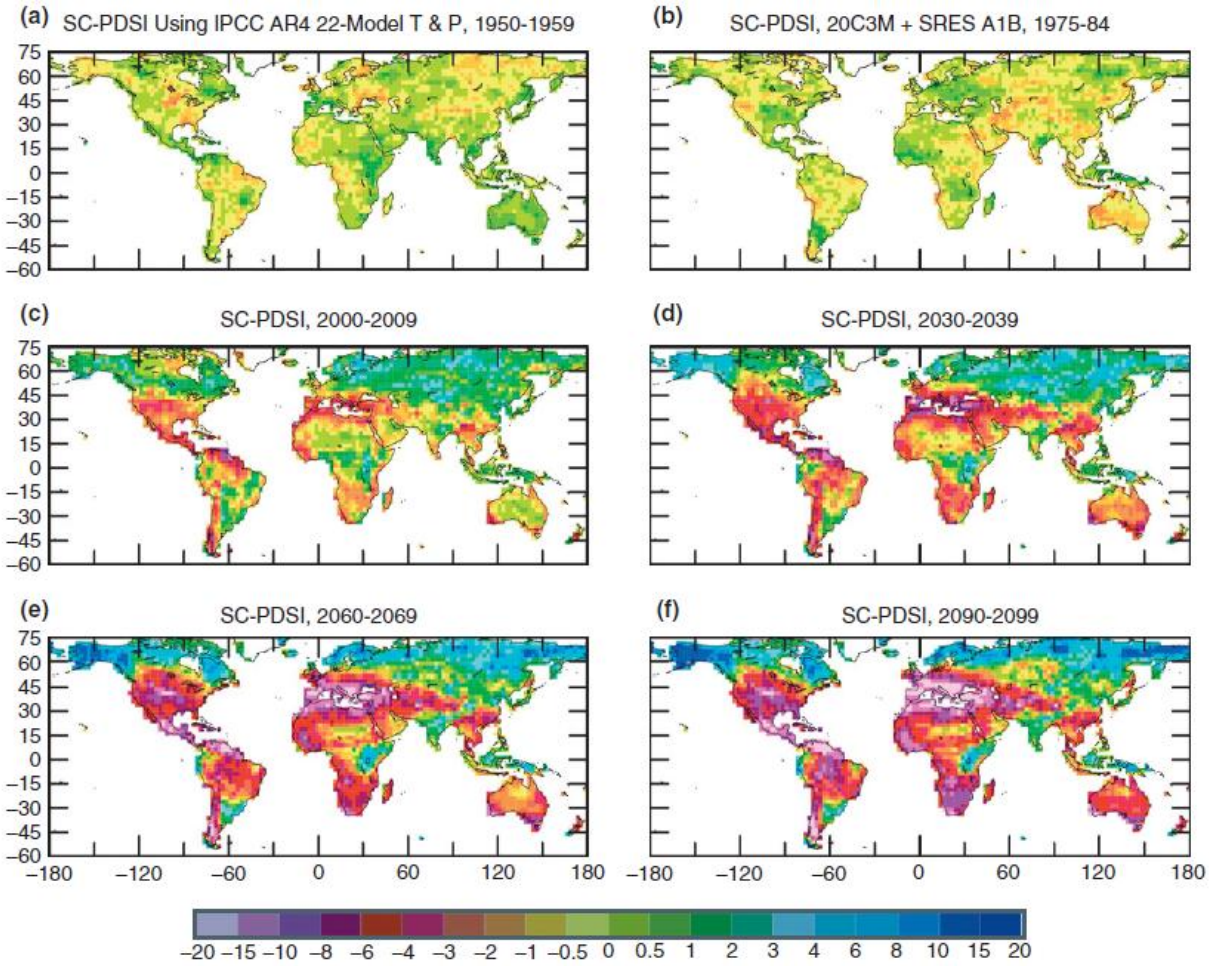


Figure 5 : L'évolution de la sècheresse au cours des années. Les cartes illustrent le potentiel de la sécheresse actuelle et à venir dans le monde entier au cours des décennies indiqués, sur la base des projections actuelles concernant les futures émissions de gaz à effet de serre. Les cartes utilisent l'indice Palmer de gravité de sécheresse, qui affecte des nombres positifs lorsque les conditions sont exceptionnellement humides pour une région donnée, et des nombres négatifs lorsque les conditions sont exceptionnellement sèches (D'après Dai, 2010).

II.2 Effets de la sécheresse sur les plantes

Les effets physiologiques de la sécheresse sur les plantes sont notamment la fermeture des stomates, la diminution de l'activité photosynthétique, l'altération de l'élasticité de la paroi cellulaire, et même la génération de métabolites toxiques causant la mort de la plante (Ahuja et al., 2010).

II.2.1 Symptômes phénotypiques

L'effet de la sécheresse peut se traduire par des modifications morphologiques qui affectent la partie aérienne ou souterraine : réduction de la surface foliaire et du nombre de talles, enroulement des feuilles et/ou meilleur développement du système racinaire (Slama et al., 2005).

II.2.2 Production de biomasse

L'un des effets physiologiques de la sécheresse sur les plantes sont la réduction de la croissance végétative, en particulier la croissance des pousses. En général, la croissance de la feuille est plus sensible que la croissance des racines. La réduction de l'expansion des feuilles est favorable aux plantes dans des conditions de déficit d'eau, car moins de la surface foliaire est exposée, résultant en une transpiration réduite. En ce qui concerne la racine, la croissance relative peut causer amélioration, ce qui facilite la capacité du système racinaire d'extraire plus d'eau à partir des couches profondes du sol (Mahajan et Tuteja, 2005).

II.2.3 Conductance stomatique et photosynthèse

La première réponse de presque toutes les plantes aux aigus déficits en eau est la fermeture de leurs stomates pour prévenir la perte d'eau par transpiration. Cette réaction fonctionne plus ou moins précocement à l'apparition de la période de sécheresse, en fonction de la stratégie inhérente (et acclimatation) des plantes à un stress hydrique (Cruz de Carvalho, 2008). La fermeture des stomates peut résulter de l'évaporation directe de l'eau à partir des cellules de garde sans la participation métabolique. Ce processus de fermeture stomatique est référé comme une fermeture hydropassive. La fermeture des stomates peut également être métaboliquement dépendante et implique des processus qui résultent dans l'inversion des fluxes des ions qui causent l'ouverture des stomates. Ce processus de fermeture des stomates, qui exige des ions et des métabolites, est

connu comme une fermeture hydroactive et semble être régulé par l'ABA. L'ABA favorise l'efflux d'ions K^+ des cellules de garde, ce qui entraîne la perte de la pression de turgescence, conduisant à la fermeture des stomates. La fermeture ne dépend pas toujours de la perception des signaux de déficit hydrique découlant des feuilles. En fait, la fermeture répond également directement à la dessiccation du sol avant même d'exister une réduction significative dans la pression de turgescence du mésophylle de la feuille (Mahajan et Tuteja, 2005).

La limitation stomatique était généralement admis être le principal déterminant de la réduction de la photosynthèse sous stress hydrique. Ça a été attribué à une diminution à la fois dans le taux de photosynthèse des feuilles et dans la concentration interne en CO_2, qui inhibe enfin le métabolisme photosynthétique total (Reddy, Chaitanya et Vivekanandan, 2004). Il a été démontré que la baisse du taux de la photosynthèse sous sécheresse est principalement due à la déficience en CO_2, car l'efficience photochimique pourrait être ramenée à la normale après une transition rapide de feuilles vers un environnement enrichie en CO_2 (Meyer et Genty, 1998). Egalement, la baisse des niveaux de CO_2 intracellulaire résulte dans la sur-réduction des composants dans la chaîne de transport d'électrons et les électrons sont transférés à l'oxygène dans le photosystème I, ce qui produit des EROs (Li et Sherman, 2000). En outre, il a été signalé que la baisse de l'activité de la Rubisco résulte dans une photosynthèse limitée en condition de sécheresse sévère (Bota, Flexas et Medrano, 2004).

II.2.4 Sénescence foliaire

La sénescence des feuilles induite par la sécheresse a lieu progressivement et est caractérisée par des modifications macroscopiques, cellulaires, biochimiques et moléculaires spécifiques. Le jaunissement des feuilles (c'est-à-dire, dégradation de la chlorophylle) et des changements spécifiques dans l'ultrastructure cellulaire (par exemple la condensation de la chromatine, le gonflement du thylakoïde, l'accumulation de plastoglobules), le métabolisme (par exemple la dégradation des protéines, la peroxydation des lipides) et l'expression des gènes se produisent pendant la sénescence des feuilles chez les plantes victimes de la sécheresse. Les cytokinines et l'ABA ont montré être impliqués dans la régulation de la sénescence des feuilles induite par la sécheresse, bien que le rôle possible d'autres hormones végétales ne doit pas être exclu. Les espèces réactives de l'oxygène, dont la concentration augmente pendant la sénescence des feuilles induite par la sécheresse, sont également connues pour être des régulateurs de ce

processus qui est important pour éviter de grandes pertes par transpiration, contribuant ainsi au maintien de l'équilibre de l'eau dans la plante (Munné-Bosch et Alegre, 2004).

II.2.5 Intégrité des systèmes membranaires

La pression exercée sur la membrane est l'un des graves effets de la sécheresse impliqués sur la physiologie des plantes. Dans une situation où le déficit d'eau devient trop intense ou prolongé, les plantes peuvent flétrir, les cellules peuvent subir un retrait et cela peut conduire à une contrainte mécanique sur les membranes cellulaires. L'élimination de l'eau de la membrane perturbe la structure normale de la bicouche et se traduit par une membrane exceptionnellement poreuse lorsque desséché. Le stress au sein de la bicouche lipidique peut également se traduire par le déplacement de protéines de la membrane, ce qui contribue à la perte de l'intégrité membranaire, à la sélectivité, à la perturbation de la compartimentalisation cellulaire et à une perte d'activité des enzymes. En plus de dommages à la membrane, des protéines cytosoliques et des organites peuvent présenter activité réduite ou peuvent même subir une dénaturation complète quand déshydraté. La forte concentration d'électrolytes cellulaires dus à la déshydratation du protoplasme peut également provoquer des perturbations du métabolisme cellulaire (Mahajan et Tuteja, 2005).

II.3 L'action de la sécheresse dans les cellules

II.3.1 Perception et signalisation du stress hydrique

L'adaptation des plantes au changement de l'état hydrique de l'environnement nécessite de la détection rapide et sensible de la situation de stress (Golldack et al., 2014). En fait, l'augmentation de la production d'EROs cellulaire est captée par la plante comme un signal d'alarme qui déclenche un parcours de défense et des réponses d'acclimatation, ce qui permet à la plante de s'adapter aux changements de l'environnement (Cruz de Carvalho, 2008). Des protéines récepteurs et capteurs localisées aux membranes jouent un rôle important dans les différentes voies de signalisation par la transmission d'informations à leurs protéines cibles cytoplasmiques via des processus catalytiques, comme la phosphorylation. La signalisation de la membrane plasmique a émis l'hypothèse d'être impliquée dans le processus initial de la perception de l'état des eaux en dehors de la cellule (Osakabe, 2014). Des preuves croissantes de la participation des lipides de signalisation dans la détection primaire des changements environnementaux et dans le

déclenchement et régulation de cascades de signalisation hormonale ont été apparues. L'ABA est également considéré comme un signal clé impliqué dans la régulation de la réponse des plantes à différents stress, et en particulier dans le fonctionnement de la régulation stomatique des plantes soumises aux déficits en eau (Wilkinson et Davies, 2002). Fait intéressant, l'interaction entre la signalisation dépendante de l'ABA et les voies du métabolisme lipidique maintien la structure et la fonction des membranes cellulaires. Ainsi, la modification du métabolisme lipidique primaire déclenché par l'ABA contribue à souligner la réorganisation des membranes adaptées aux stresses et à maintenir l'approvisionnement d'énergie cellulaire dans des conditions de stress abiotique et de limitation de l'approvisionnement en eau (Golldack et al., 2014).

II.3.2 Production d'EROs et stress oxydatif

L'augmentation de la production d'EROs conduit à un stress oxydatif chez les plantes croissantes. Sous sécheresse, cette production est renforcée de plusieurs façons. La limitation de l'assimilation de CO_2 due la clôture des stomates, permettra de réduire la régénération de $NADP^+$ à travers le cycle de Calvin, donc provoquant une super réduction de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons et résultant dans la production accélérée d'EROS dans le chloroplaste. En fait, lors de la photosynthèse et en cas de sécheresse, il existe une fuite plus élevée des électrons à l'oxygène par la réaction de Mehler. Cependant, il est assez difficile d'évaluer la partie d'EROs générée par la réaction de Mehler de celle générée par photorespiration. En effet, la voie photorespiratoire est également augmentée, en particulier, quand l'oxygénation de la ribulose-1,5- biphosphate est maximale en raison de la limitation de la fixation du CO_2. Le chloroplaste est un compartiment cellulaire très ferme à l'égard des EROs en raison des différentes enzymes de détoxification et des métabolites présents. Toutefois, en vertu de la sécheresse, l'une des menaces réelles vers le chloroplaste est la production du radical hydroxyle dans les thylakoïdes par la réduction du peroxyde d'hydrogène par la SOD et l'ascorbate. Le radical hydroxyle est l'ERO qui a une demi-vie plus courte, mais il a également un potentiel d'oxydation très fort réagissant avec pratiquement toutes les molécules biologiques. En outre, il n'y a pas de réaction enzymatique connue pour éliminer le radical hydroxyle hautement réactif et son accumulation conduira inévitablement à des réactions nocives qui endommagent les membranes thylacoïdales et l'appareil photosynthétique, ce qui cause le stress oxydatif (Cruz de Carvalho, 2008 ; Sharma et al., 2012).

II.4 Réponses des plantes à la sécheresse

L'adaptation des plantes à la sécheresse est un processus complexe, impliquant beaucoup plus de changements que seulement une croissance atténuée. Elle implique, au niveau cellulaire, la régulation de l'expression de gènes, des augmentations transitoires de la concentration en ABA, l'accumulation de solutés compatibles et de protéines protectrices, l'augmentation des niveaux d'antioxydants et la suppression des voies de consommation d'énergie. Tous ces changements sont essentiels pour restaurer l'homéostasie après le déséquilibre causé par le stress (Conde et al., 2011) (Figure 6).

II.4.1 Stratégies d'adaptation

Les plantes répondent à un déficit hydrique et s'adaptent aux conditions semi-arides par des changements physiologiques, biochimiques, anatomiques et morphologiques, y compris des transitions dans l'expression de gènes. Les plantes également s'adaptent aux différents types de stratégies de vie pour faire face et résister à la sécheresse. Deux de ces stratégies sont l'évitement et la tolérance à la sécheresse. L'évitement de la sécheresse est la capacité de la plante à maintenir le potentiel en eau des tissus haut dans des conditions de sécheresse, tandis que la tolérance à la sécheresse est la capacité d'une plante à maintenir ses fonctions régulières même à faibles potentiels de l'eau des tissus. L'évitement est habituellement obtenu par des changements morphologiques dans la plante, comme la réduction de la conductance stomatique, la réduction de la surface foliaire, le développement extensif des systèmes de racines et l'augmentation des rapports racine/tige. D'autre part, la tolérance est obtenue par des mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires spécifiques des cellules et du tissu, qui comprennent l'expression de gènes spécifiques et l'accumulation de protéines spécifiques sous sécheresse (Levitt, 1980 ; Reddy, Chaitanya et Vivekanandan, 2004).

II.4.2 Réponses cellulaires

Pour lutter contre le danger posé par les EROs, les plantes possèdent des différentes enzymes de détoxification (peroxydases, superoxyde dismutase, catalases) et des métabolites (caroténoïdes, ascorbate, α-tocophérol, glutathion, flavonoïdes) (Cruz de Carvalho, 2008 ; Sharma et al., 2012). Cependant, l'élimination d'EROS se produit notamment en fonction du compartiment cellulaire, du stade physiologique et des espèces végétales. La capacité d'une

espèce végétale à maintenir ou rétablir l'homéostasie redox peut la rendre tolérante au stress. Ainsi, des changements comparatifs dans les activités des enzymes antioxydantes en réponse au stress hydrique ont souvent été utilisés pour la sélection de plantes résistantes à la sécheresse (Kar, 2011). L'augmentation de l'activité ou de l'expression génique des enzymes du système de défense antioxydante a été rapportée sous sécheresse chez plusieurs espèces de plantes (Contour-Ansel et al., 2006 ; D'Arcy-Lameta et al., 2006 ; Sharma et Dubey, 2005). L'étude comparative des réponses antioxydantes chez des génotypes tolérants et sensibles à la sécheresse ont révélé la capacité antioxydante élevée chez les génotypes tolérants, avec les activités APX et CAT augmentées, une teneur plus élevée d'ascorbate et une teneur plus faible d'H_2O_2 et de MDA (Sairam, Deshmukh et Saxena, 1998). En outre, les plantes transgéniques surexprimant les enzymes antioxydantes acquièrent une plus grande tolérance à la sécheresse ainsi qu'au stress oxydatif que les plantes sauvages respectives (Cruz de Carvalho, 2008).

En outre que la défense antioxydante, les plantes ont tendance à faire face au stress hydrique par le processus connu comme ajustement osmotique. Dans ce processus, les plantes diminuent leur potentiel osmotique cellulaire par l'accumulation de solutés. Certains processus métaboliques sont déclenchés en réponse au stress, ce qui augmente la concentration de soluté net dans la cellule, permettant ainsi la circulation de l'eau dans la feuille provoquant un accroissement de sa la turgescence. De grands nombres de composés sont synthétisés, qui jouent un rôle clé dans le maintien de l'équilibre osmotique et dans la protection des membranes ainsi que des macromolécules. Ces composés inclure la proline, le glutamate, la glycine-bétaïne, la carnitine, le mannitol, le sorbitol, les fructanes, les polyols, le tréhalose, le saccharose, des oligosaccharides et des ions inorganiques tel que K^+. Ces composés aident les cellules à maintenir leur état hydraté et par conséquent ils fonctionnent à fournir une résistance contre la sécheresse et la déshydratation cellulaire (Mahajan et Tuteja, 2005).

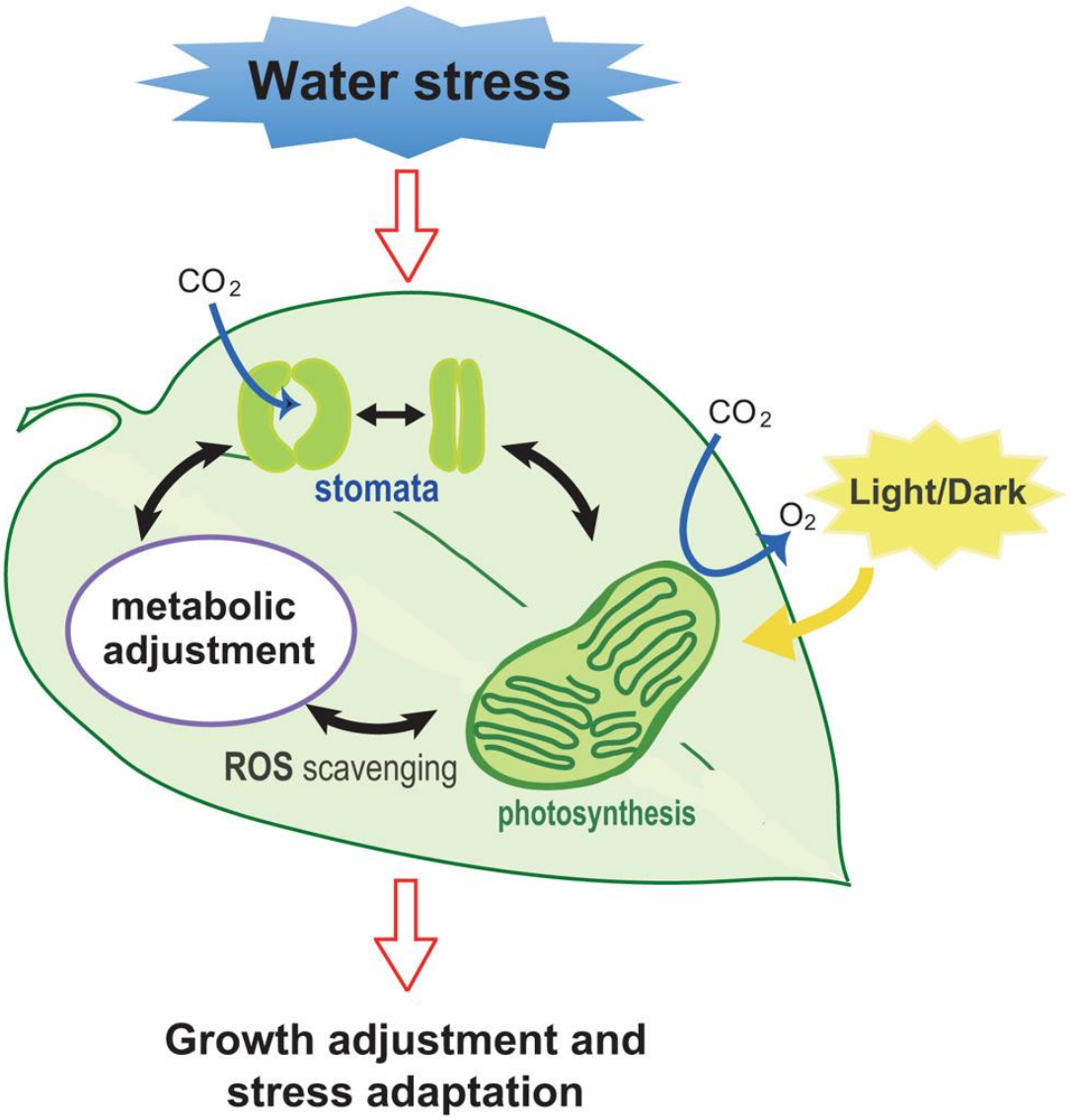


Figure 6 : Illustration de la réponse des plantes à la sécheresse. La réponse stomatique, l'élimination des EROs, des changements métaboliques et la photosynthèse sont tous touchés lorsque les plantes sont soumises au stress hydrique. Ces réponses collectives conduisent à un ajustement du taux de croissance des plantes comme une réponse adaptative pour la survie (D'après Osakabe et al., 2014).

III. LES CONTRAINTES COMBINEES

III.1 Caractéristiques

Il y a eu peu d'études portant sur les réactions des plantes à des contraintes environnementales appliquées en combinaison. Tel recherche est particulièrement importante vu que, dans la nature, les stress abiotiques simultanés sont courants (Ahuja et al., 2010). L'acclimatation des plantes à une combinaison de différents stress abiotiques exigerait une réponse appropriée adaptée à chacune des conditions de stress individuels impliqués, ainsi que conçue pour la nécessité de compenser ou régler certains aspects antagonistes de la combinaison de stress. Pourtant, il est logique de supposer que l'exposition simultanée d'une plante à des conditions de stress abiotique se traduira par la co-activation de diverses voies de réponse au stress, qui peuvent avoir un effet synergique ou antagoniste sur l'autre (Mittler, 2006).

III.2 Incidence de l'ozone et de la sécheresse à l'échelle mondiale

L'occurrence de hautes concentrations en ozone durant les épisodes de sécheresse est fréquente étant donné qu'ils sont en partie causés par les mêmes phénomènes météorologiques, c'est-à-dire, des périodes de longues journées avec une forte irradiation solaire et une faible couverture de nuage (Bohler et al., 2013). Le changement dans des conditions climatiques du à des causes essentiellement anthropiques telles que l'augmentation des émissions de CO_2 résulte en une élévation de la température. L'augmentation de la température contribue alors à la formation de l'ozone troposphérique et à l'intensification des épisodes de sécheresse due des précipitations altérées (Kissoudis et al., 2014 ; Matyssek et al., 2005). Non seulement les régions arides sont soumises à la sécheresse, mais de plus en plus de périodes de sécheresse sont signalées dans les régions tempérées comme l'Europe occidentale et centrale. Ils sont en outre appelés à devenir plus fréquents et graves, et plus à cause du changement climatique (Kreuzwieser et Gessler, 2010). Dans les zones rurales, les niveaux d'ozone élevés peuvent se produire au printemps/début de l'été, avant le début de la sécheresse. La nature de l'effet de ces contraintes sur les plantes semble dépendre du génotype et de la spécificité des régimes factoriels ainsi que, au cours des saisons, les instants d'apparition, la durée et l'intensité des deux contraintes par rapport à l'autre. (Matyssek et al., 2005).

III.3 Interaction de l'ozone et de la sécheresse combinés au niveau cellulaire

Il a été suggéré que la sécheresse pourrait protéger les plantes contre les dommages induits par l'ozone en provoquant la fermeture des stomates et empêchant ainsi l'entrée de l'ozone dans les feuilles (Karlsson et al., 1995; Khan et Soja, 2003 ; Paakkonen et al., 1998 ; Pearson et Mansfield, 1993 ; Reichenauer et al., 1998). Cependant, la découverte des réductions de la sensibilité des stomates à l'acide abscissique sous ozone dépendante d'éthylène indique que la conductance stomatique au déficit hydrique du sol est supérieure sous ozone élevé, et les plantes continuent à perdre de l'eau, malgré le potentiel de déshydratation et le flux d'ozone augmenté (Wilkinson and Davies, 2009, 2010) (Figure 7). Les études ont montré que l'ozone a causé une «lenteur» stomatique qui conduit à la fermeture incomplète des stomates et donc exacerbe les effets de la sécheresse (Wagg et al., 2012 ; Wilkinson et Davies, 2009). Ces observations remettent en question l'idée largement répandue que l'ozone induit toujours la fermeture des stomates (Wittig, Ainsworth et Long, 2007) et auront des conséquences importantes pour l'utilisation de l'eau dans les systèmes naturels et agricoles (Wilkinson et Davies, 2010).

L'interaction de l'ozone et de la sécheresse est très dépendante de la sévérité et de la durée d'apparition de deux facteurs de stress (Matyssek et al., 2005), mais en général, la contrainte combinée s'est révélée être plus néfaste que leurs composants individuels (Paakkonen et al., 1998). Ses impacts physiologiques sur les plantes sont complexes et méritent une attention étant donnée que les concentrations d'ozone dans la troposphère vont continuer à augmenter à l'avenir (Ainsworth, Rogers et Leakey, 2008 ; Ashmore 2005).

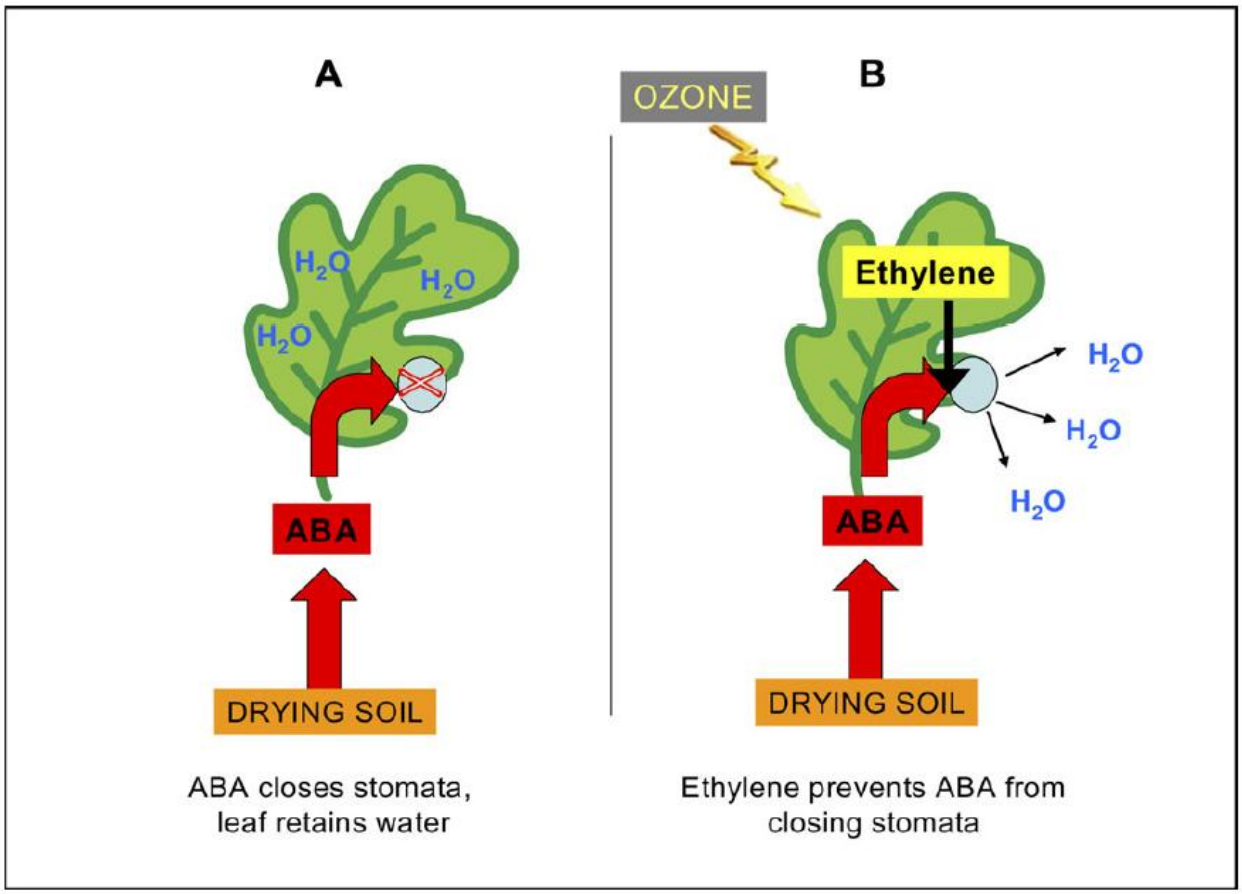


Figure 7 : Modèle des effets de la production d'éthylène induite par l'ozone sur la fermeture des stomates induite par l'ABA. A : Sous des contraintes telles que le séchage du sol, l'ABA est sur-régulé et ferme les stomates de sorte que les feuilles retiennent l'eau. B : Toutefois, dans certains génotypes sensibles, l'éthylène induit par l'ozone provoque des cellules de garde stomatiques à perdre leur sensibilité à l'ABA de telle façon que des pores stomatiques restent plus ouverts. Les plantes absorbent plus d'ozone et perdent plus d'eau que ce qu'elles auraient fait en absence d'ozone (D'après Wilkinson et al., 2012).

IV. LES LIPIDES MEMBRANAIRES

IV.1 Généralités sur les lipides

Les lipides remplissent trois fonctions générales. Tout d'abord, en raison de leur état relativement réduit, les lipides sont utilisés pour le stockage d'énergie, principalement sous forme d'esters de triacylglycérol et d'esters de stéroïde, en gouttelettes lipidiques. Ceux-ci fonctionnent essentiellement comme des réservoirs anhydres pour le stockage efficace de réserves caloriques et comme des caches de composants d'acides gras et de stérols qui sont nécessaires pour la biogenèse membranaire. D'autre part, la matrice des membranes cellulaires est formée par des lipides polaires, qui se composent d'une portion hydrophobe et d'une portion hydrophile. La propension des groupements hydrophobes à s'auto-associer (entropiquement entraîné par l'eau) et la tendance des fractions hydrophiles d'interagir avec les milieux aqueux et les uns avec les autres sont la base physique de la formation spontanée des membranes. Ce principe fondamental des lipides amphiphiles est une propriété chimique qui a permis les premières cellules à séparer leurs constituants internes de l'environnement extérieur. Ce même principe est récapitulé à l'intérieur de la cellule pour produire des organites discrets. Cette compartimentation permet la séparation des réactions chimiques spécifiques aux fins de l'amélioration de l'efficacité biochimique et de la diffusion restreinte de produits de réaction. En plus de la fonction de barrière, les lipides fournissent des membranes ayant un potentiel de bourgeonnement, de tubulure, de fission et de fusion, les caractéristiques qui sont essentielles pour la division cellulaire, la reproduction biologique et le trafic membranaire intracellulaire. Les lipides permettent aussi aux protéines particulières des membranes de s'agréger et d'autres de se disperser. Enfin, les lipides peuvent agir en tant que premier et seconds messagers dans la transduction du signal et dans les processus de reconnaissance moléculaire. La dégradation des lipides polaires amphipathiques permet les phénomènes de signalisation bipartites, qui peuvent être transmis au sein d'une membrane par des parties hydrophobes de la molécule et aussi propagés à travers le cytosol par des parties solubles de la molécule. En outre, certains lipides servent à définir des domaines membranaires, qui recrutent des protéines du cytosol qui organisent ensuite la signalisation secondaire ou des complexes effecteurs (Van Meer, Voelker et Feigenson, 2008).

IV.2 Les lipides membranaires des végétaux

IV.2.1 Glycérolipides : phospholipides et glycolipides

Les lipides constitutifs des membranes cellulaires sont des glycérolipides. Ils renferment dans leurs molécules un squelette glycérol, des restes d'acides gras et un groupement polaire, d'où leur désignation de lipides polaires. La plupart des acides gras végétaux a une longueur de chaîne de 16 à 18 atomes de carbone et contient de une à trois doubles liaisons en position *cis*. Cinq acides gras, les acides palmitique (16:0), stéarique (18:0), oléique (18:1), linoléique (18:2) et linolénique (18:3) et, chez certaines espèces, l'acide hexadéca-triénoïque (16:3), représentent plus de 90% des chaînes acyle des glycérolipides de presque toutes les membranes végétales. Dans les feuilles, les acides gras les plus abondants sont dans l'ordre : acide linolénique, acide linoléique et acide palmitique (Harwood, 1996).

Les glycérolipides des membranes cellulaires appartiennent à deux groupes, selon la nature de leur tête polaire : les phospholipides et les glycolipides. Chez les phospholipides (ou glycérophospholipides, plus spécifiquement), le groupement polaire comprend une molécule d'acide phosphorique et un radical X qui peut être de la choline [il s'agit alors de la phosphatidycholine (PC)], de l'ethanolamine [phosphatidyléthanolamine (PE)], de l'inositol [phosphatidylinositol (PI)], de la sérine [phosphatidylsérine (PS)] ou d'une ou deux molécules de glycérol [phosphatidylglycérol (PG) et di phosphatidylglycérol (DPG ou cardiolipine), respectivement] (Figure 8). Si le group polaire est constitué d'un sucre, il s'agit des glycolipides (ou galactolipides, plus spécifiquement), parmi lesquels les plus abondants sont le monogalactosyl-diacylglycérol (MGDG) et le digalactosyl-diacylglycérol (DGDG). Dans les tissus végétaux, on trouve également un sulfolipide, le sulfoquinivosyl-diacylglycérol (SQDG) (Figure 9) (Dörmann et Benning, 2002).

Les lipides principaux chez les eucaryotes sont les phospholipides, avec PC comme le plus abondant, suivi par PE, PS, PI et PA (van Meer, Voelker et Feigenson, 2008). PG est également présent chez les eucaryotes et est utilisé comme précurseur pour la synthèse de DPG (ou cardiolipine), trouvé exclusivement dans la membrane interne des mitochondries (Nowicki, Muller et Frentzen, 2005).

Les galactolipides représentent la classe de lipides la plus abondante dans la biosphère en raison de leur forte proportion (80%) dans les membranes plastidiales (surtout thylakoïdes). Les membranes plastidiales (les membranes de l'enveloppe externe et interne et les thylakoïdes) sont caractérisées par une faible teneur en phospholipides et par une forte proportion de galactolipides: la membrane de l'enveloppe externe est enrichie en DGDG et PC, tandis que le principal glycérolipide constituant de la membrane de l'enveloppe interne et des thylakoïdes est le MGDG. L'enveloppe interne et la membrane des thylacoïdes ne diffèrent pas de manière significative: ils comprennent les deux galactolipides (MGDG et DGDG), un sulfolipide (SQDG) et PG comme le seul phospholipide dans ces membranes (Block et al., 2007).

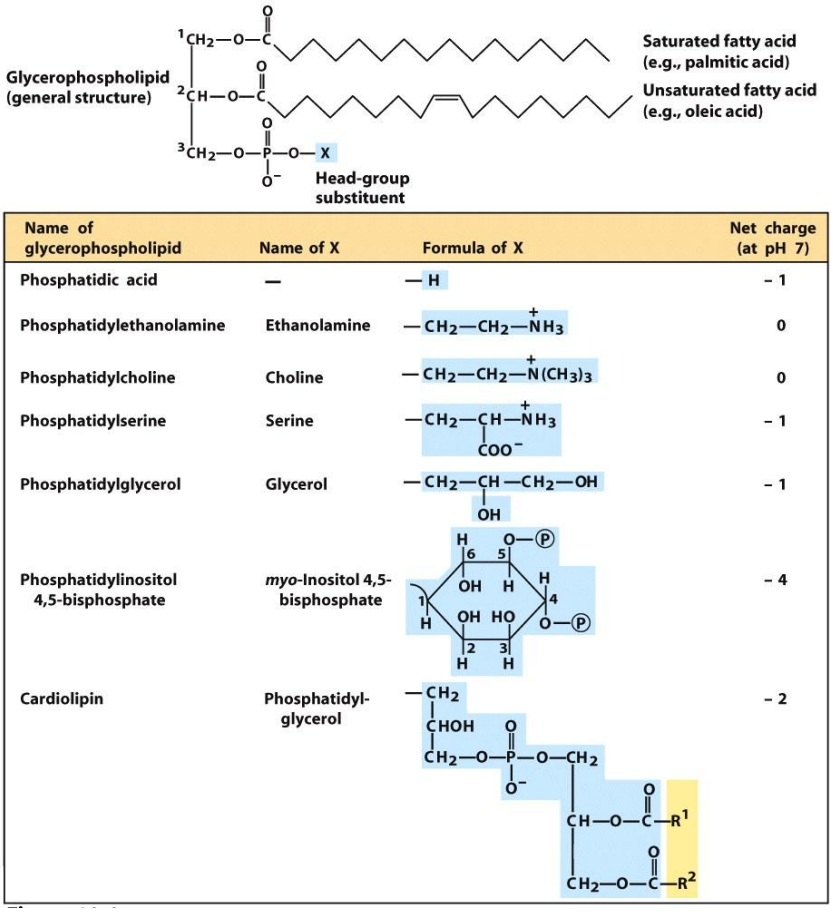


Figure 8 : Structure des glycérophospholipides(D'après Nelson et Cox, 2010).

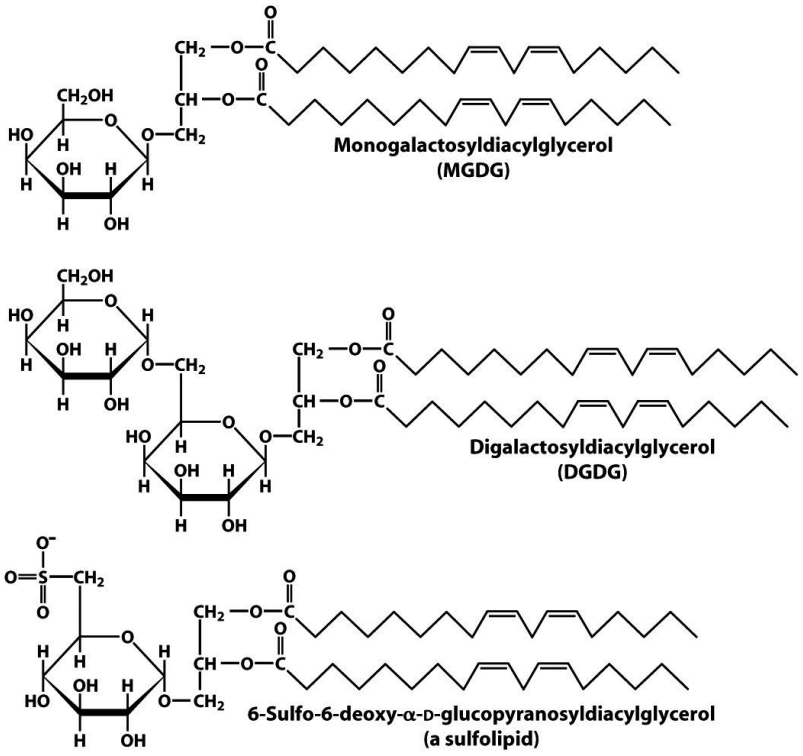


Figure 9 : Structure des galactolipides et d'un sulfolipide (D'après Nelson et Cox, 2010).

IV.3 Biosynthèse des lipides membranaires

IV.3.1 Voies procaryotique et eucaryotique

Chez les végétaux, la biosynthèse des acides gras a lieu dans les plastes. Une fois synthétisées, ces molécules sont, en grande majorité, exportées vers le réticulum endoplasmique (RE). Les glycérolipides sont synthétisés à partir de glycérol-3-phosphate sur lequel sont estérifiés deux acides gras. L'acide phosphatidique (PA), ainsi formé, sert de précurseur à la néosynthèse de tous les glycérolipides. Les phospholipides et les glycolipides sont générés à partir du diacylglycérol (DAG) ou du CDP-diacylglycérol, dérivant du PA. Les données cinétiques *in vitro* d'incorporation d'acétate dans les lipides plastidiaux montrent que les plastes isolés peuvent synthétiser des glycolipides contenant un squelette DAG C18/C16 mais sont incapables de synthétiser du PA et du DAG contenant uniquement du C18. Il existe donc deux voies de synthèse du PA, l'une dans les plastes et l'autre dans le réticulum endoplasmique. Suivant les lieux de synthèse du PA, la distribution des acides gras est différente. Deux grands

groupes structuraux de lipides ont été ainsi définis. Le premier possède en position *sn-2* des acides gras en C16 uniquement, la position *sn-1* du glycérol pouvant être estérifiée par des acides gras en C18 ou en C16. Il est dit de structure « procaryote » par analogie avec la composition en acides gras des glycérolipides des cyanobactéries. Le PA synthétisé par la voie procaryotique est soit utilisé dans la synthèse de PG soit converti en DAG par des PA-phosphatases. Ce *pool* de DAG procaryotique est utilisé comme précurseur pour la synthèse de MGDG, DGDG et SQDG chez les plantes en 16:3. Le second groupe possède des acides gras en C18 en position *sn-2* et est dit de structure « eucaryote », car cette structure est typique des glycérolipides extraplastidiaux eucaryotes. Ce PA est utilisé dans la synthèse de phospholipides tels que le PC, PE et PI, qui sont caractéristiques de plusieurs membranes extrachloroplastidiales. Une forte proportion des PC synthétisés au niveau du RE retournent ensuite vers les chloroplastes où ils sont utilisés comme précurseurs de la synthèse des lipides plastidiaux (Li-Beisson et al., 2013 ; Ohlrogge et Browse, 1995).

IV.3.2 Les désaturases d'acides gras (FADs)

Les désaturases d'acides gras sont des enzymes qui convertissent une liaison simple entre deux atomes de carbone (C-C) à une double liaison (C=C) dans une chaîne d'acyle gras. La double liaison résultante est souvent appelée une liaison insaturée, et les réactions catalysées par ces enzymes sont connues comme les réactions de désaturation. Ces réactions nécessitent de l'oxygène moléculaire et se produisent dans des conditions aérobies. L'insaturation des acides gras des glycérolipides est essentielle pour le bon fonctionnement des membranes biologiques. A des températures physiologiques, les glycérolipides polaires qui contiennent des acides gras saturés ne peuvent pas former la bicouche qui est la structure de base des membranes biologiques. L'introduction d'un nombre approprié de liaisons insaturées dans les acides gras des glycérolipides de la membrane diminue la température de transition à partir du gel (solide) à la phase liquide-cristalline et fournit des membranes avec la fluidité nécessaire. La fluidité des membranes est, à son tour, importante pour l'activation de certaines enzymes liées à la membrane (Los et Murata, 1998).

Les acides gras insaturés sont synthétisés par l'insertion séquentielle de doubles liaisons dans les dérivés d'acides palmitique et stéarique. Le premier de ces événements de désaturation est effectué dans les plastes et chloroplastes par la stéaroyl-ACP désaturase soluble. Par la suite, pour synthétiser les acides gras 16:2/18:2 et 16:3/18:3 qui sont essentiels pour les membranes de

plantes, une deuxième et une troisième double liaison sont introduites par Δ12 et ω-3 désaturases membranaires, respectivement. Ces désaturases peuvent être trouvées à la fois dans le plaste/chloroplaste (que l'on appelle « la voie procaryote ») et dans le réticulum endoplasmique (« voie eucaryote »). La première de ces voies est utilisée principalement dans les tissus photosynthètiquement actifs, tandis que la voie microsomale prédomine dans les tissus non-verts et les graines en développement (Venegas-Calerón et al., 2006).

Chez *Arabidopsis thaliana*, trois désaturases distinctes, actives à la dernière étape de conversion de l'acide linoléique (18:2) à l'acide linolénique (18:3) ont été identifiées : FAD3, FAD7 et FAD8. Chacune de ces enzymes sont codées par un seul gène dont l'expression est régulée de façon différentielle (Mekhedov, Ilarduya et Ohlrogge, 2000). Tandis que FAD3 encode une isoenzyme située dans le réticulum endoplasmique (enzyme microsomal), FAD7 et FAD8 encodent les ω-3 désaturases plastidiales (McCartney et al., 2004).

IV.3.3 Biosynthèse de la Phosphatidylcoline (PC)

Le PC peut être synthétisé par deux voies différentes, soit par méthylation du PE par une PE-N-méthyltransférase (choline kinase), soit par addition de CDP-choline sur du DAG (Kinney, 1993).

Le clonage des gènes de la choline kinase chez le soja a révélé l'existence de plusieurs isoformes, solubles, toutes spécifiques de la choline, mais pouvant être inhibées à des degrés divers par l'éthanolamine, la méthyléthanolamine ou la diméthyléthanolamine (Monks et al., 1996). Le *pool* de choline libre étant toutefois limité dans les cellules, les cholines kinases interviendraient plutôt dans la régulation de la synthèse du PC en cas de stress, par exemple de stress osmotique, la voie majoritaire étant la méthylation de la phosphoéthanolamine (Tasseva et al., 2004). Les trois méthylations successives de la phosphoéthanolamine pour produire de la phosphocholine sont catalysées par une seule enzyme soluble, une phosphoéthanolamine N-méthyltransférase S-adénosylméthionine dépendante. Cette enzyme catalyse les trois méthylations à partir de la phosphoéthanolamine ainsi que les deux méthylations à partir de la phosphatidylméthyléthanolamine (Bolognese et McGraw, 2000 ; Nuccio et al., 2000). La phosphocholine est ensuite transformée en CDP-choline par une CTP:phosphocholine cytidylyltransférase. La caractérisation de cette enzyme purifiée a montré qu'elle pouvait fixer le CTP au niveau de la phosphocholine mais aussi de la phosphométhyléthanolamine et de la

phosphodiméthyléthanolamine (Wang et Moore, 1990). Deux isoformes ont été identifiées chez *Arabidopsis* et quatre chez *Brassicanapus* (Inatsugi et al., 2002). Enfin, la CDP-choline est transférée sur un DAG par une aminoalcoolphosphotransférase (Kinney, 1993).

IV.3.4 Biosynthèse du Phosphatidylglycérol (PG)

Chez les plantes, la biosynthèse du PG se produit dans les membranes de l'envelope interne des plastes, dans le réticulum endoplasmique et dans les membranes internes des mitochondries. Le PG est synthétisé à partir de la cytosine 5'-diphosphate (CDP)-diacylglycérol et du glycérol-3-phosphate, impliquant l'action d'une PG-phosphate synthase liée à la membrane et d'une PG-phosphate phosphatase, chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez les plantes en C18 comme chez les plantes en C16, le PG plastidial a la même structure de type procaryote que celle du PA synthétisé dans l'enveloppe (Frentzen, 2004).

Chez *Arabidopsis*, deux gènes ont été caractérisés codant pour des PG-phosphate synthases : *PGP1* et *PGP2*. *PGP2* code l'isoenzyme des microsomes, alors que *PGP1* code pour une pré-protéine qui cible à la fois les plastes et les mitochondries (Frentzen, 2004; Müller et Frentzen, 2001).

IV.3.5 Biosynthèse du Diphosphatidylglycérol (DPG ou Cardiolipine)

Chez les eucaryotes, la biosynthèse de DPG (ou cardiolipine) se produit exclusivement dans la membrane mitochondriale interne par trois réactions séquentielles. La première étape, limitante de la vitesse de réaction, est catalysée par la phosphatidyl-glycérolphosphate (PGP) synthase, qui transfère un groupe phosphatidyle de la cytidine-diphosphate diacylglycérol (CDP-DAG) au glycérol-3-phosphate, ce qui produit PGP, qui est rapidement déphosphorylé par la PGP phosphatase à phosphatidylglycérol (PG). Enfin, la cardiolipine synthase (CLS) transfère un groupe phosphatidyl du CDP-DAG au PG, ce qui produit le DPG (Nowicki; Muller et Frentzen, 2005).

La CLS utilise préférentiellement le CDP-dioléoylglycérol (C18/C18) et le PG C18/C18 par rapport au CDP-dipalmitoylglycérol (C16/C16) et au PG C16/C18. Donc, le DPG possède un squelette DAG riche en C18 (Frentzen and Griebau, 1994).

Chez *Arabidopsis*, le gène *CLS*, codant pour l'enzyme responsable de cette activité, a été identifié au locus At4g04870 (Katayama et al., 2004 ; Nowicki; Muller et Frentzen, 2005). Il était préalablement référencé comme *PGP3* mais n'a aucune activité phosphatidylglycérol synthase. L'adressage de cette enzyme est mitochondrial d'après les études *in silico* et *in vivo* (Beisson et al., 2003 ; Katayama et al., 2004).

IV.3.6 Biosynthèse de la Phosphatidylethanolamine (PE)

Les plantes synthétisent le PE après une étape de décarboxylation qui peut s'effectuer soit au niveau du PS ou à celui de la sérine (Mudd et Datko, 1989). La décarboxylation de la sérine est la voie principale, catalysée par une enzyme soluble, la sérine décarboxylase, spécifique des plantes. L'éthanolamine libre synthétisée est ensuite phosphorylée par une éthanolamine kinase. La phosphoéthanolamine est ensuite transformée en CDP-éthanolamine par une CTP:phosphoéthanolamine cytidylyltransférase. La dernière activité impliquée dans la synthèse du PE est la CDP-éthanolamine:DAG-éthanolamine phosphotransférase catalysée par une aminoalcoolphosphotransférase (Rontein et al., 2003a).

Deux isoformes ont été identifiées chez le chou chinois et une chez le soja ; elles synthétisent aussi bien du PE que du PC à partir de DAG et de CDP-éthanolamine, CDP-méthyléthanolamine, CDP-diméthyléthanolamine ou CDP-choline (Choi et al., 2000 ; Dewey et al.,1994).

IV.3.7 Biosynthèse de la Phosphatidylsérine (PS)

Chez les plantes, le schéma de synthèse du PS n'est pas encore clair. Le PS serait synthétisé à partir de deux voies différentes: une réaction d'échange de têtes polaires et une réaction impliquant le CDP-DAG (Moore, 1982).

Delhaize et al. (1999) ont montré la présence d'une PS synthase, catalysant l'addition d'une sérine sur un CDP-DAG, en clonant le gène correspondant chez le blé et en détectant l'activité de synthèse de PS dans des plantes transgéniques. Le devenir du PS comme précurseur du PE et du PC n'a pas encore été clairement défini chez les plantes bien qu'une activité PS décarboxylase ait déjà été caractérisée dans les membranes mitochondriales et que son gène ait été cloné chez *Arabidopsis* et *Lycopersicon esculentum* (Rontein et al., 2003b).

IV.3.8 Biosynthèse du Phosphatidylinosytol (PI)

La PI synthase catalyse la réaction entre un inositol libre et du CDP-DAG. Cette activité a été mesurée dans des fractions du réticulum de feuilles d'épinard et nécessite des cations divalents (Mg^{2+} et Mn^{2+}) pour son activité (Moore, 1982).

Les phosphoinositides représentent un groupe important et de structure complexe. Le PI représente 93% des phosphoinositides alors que le PIP (principalement le PI-3P et le PI-4P) et le PIP2 (PI-(4,5)P2) en représente moins de 1%. Le PI-3P est formé à partir d'une PI 3-kinase, dont le gène a été cloné chez le soja et *Arabidopsis*, mais la compartimentation cellulaire de l'enzyme reste inconnue. Le PI-4P est synthétisé à l'aide de PI 4-kinases, dont 12 isoformes ont été identifiées chez *Arabidopsis* par similarité de séquence. Enfin, le PIP2 est formé à partir de PI-4P par une activité PI-4P 5-kinase, pour laquelle 9 isoformes ont été prédites mais une seule caractérisée fonctionnellement chez *Arabidopsis* (Kinney, 1993).

IV.3.9 Biosynthèse du Monogalactosyldiacylglycérol (MGDG)

La synthèse du MGDG s'effectue en une seule étape par une 1,2-DAG 3-β-galactosyltransférase (ou MGDG synthase) qui transfère un résidu galactosyl de l'UDP-Gal au DAG via une liaison glycosidique β1→3 (Miège et al., 1999).

Maréchal et al. (1994a) ont montré que l'activité de la MGDG synthase était capable d'utiliser différentes espèces de DAG avec différentes affinités. Cependant, le DAG procaryote 18:1/16:0 synthétisé dans les chloroplastes est utilisé avec une meilleure spécificité que le 16:0/18:1, la plus grande affinité étant pour le 18:2/18:2 (Maréchal et al., 1994b).

A partir des analyses de séquences, les enzymes MGDG synthases ont été classées en deux familles : le type A avec MGD1 et le type B avec MGD2 et MGD3 chez *Arabidopsis*. Les deux familles diffèrent par (1) la présence d'un transit peptide clivable pour le type A et son absence pour le type B, (2) la localisation dans la membrane interne de l'enveloppe pour le type A alors que le type B est probablement associé à la membrane externe, (3) une expression élevée pour le type A dans des conditions standard de culture et dans les tissus chlorophylliens et (4) une expression activée pour les enzymes de type B en carence de phosphate (Awai et al.,2001).

Chez un mutant d'*Arabidopsis* contenant une insertion dans le gène *mgd1*, l'activité MGDG synthase est réduite de 75 %, soulignant que MGD1 est la principale MGDG synthase des feuilles (Jarvis et al., 2000). La localisation de MGD1 dans la membrane interne de l'enveloppe a été confirmée dans des cellules de feuilles d'*Arabidopsis*. En revanche, MGD2 et MGD3, les enzymes de type B, sont localisées vraisemblablement dans la membrane externe. Le rôle des MGDG synthases de type B est moins évident. Ces enzymes ont une meilleure affinité pour le DAG eucaryote (18:2/18:2) par rapport au procaryote (18:1/16:0) (Awai et al., 2001). De plus, ces enzymes sont précocement et fortement induites lors de la carence de phosphate et sont vraisemblablement impliquées dans l'approvisionnement en MGDG pour la synthèse de DGDG (Awai et al.,2001; Kobayashi et al., 2004 ; Shimojima et al., 2013).

IV.3.10 Biosynthèse du Digalactosyldiacylglycérol (DGDG)

La biosynthèse du DGDG est effectuée par la DGDG synyhase qui ajoute un deuxième résidu de galactosyl de l'UDP-Gal à une molécule de MGDG via une liaison glycosidique α1→6 (Kelly et al., 2003 ; Kelly et Dörmann, 2002).

La caractérisation du mutant *dgd1* d'*Arabidopsis*, sévèrement affecté dans la synthèse du DGDG, a permis l'identification du premier gène de DGDG synthase (Dörmann et al., 1995). Ce mutant est altéré au niveau de la photosynthèse (Dörmann et al., 1995, Härtel et al., 1997) et de l'import des protéines dans les chloroplastes (Chen et Li, 1998). Par similarité avec *dgd1*, un second gène (*dgd2*) a été identifié dans le génome d'*Arabidopsis* (Dörmann et al., 1999). Le gène *dgd2* n'est pas essentiel pour la synthèse du DGDG dans des conditions standard de culture. L'analyse des mutants nuls *dgd1*et *dgd2* indiquent qu'*in vivo* DGD1 agit préférentiellement sur du MGDG C18/C18 alors que DGD2 semble avoir une affinité pour le MGDG avec du C16 en position *sn-1*et du C18 en position *sn-2* (Kelly et al., 2003). Des expériences d'import *in vitro* et des analyses biochimiques ont montré que ces deux enzymes étaient localisés dans les plastes, vraisemblablement dans la membrane externe de l'enveloppe (Froehlich et al., 2001 ; Kelly et al.,2003).

IV.4 Dégradation des lipides membranaires

IV.4.1 Phospholipase D

Les phospholipases sont classées en trois grandes catégories en fonction de la spécificité de la position de l'hydrolyse de la molécule de phospholipide. Les phospholipases D (PLD) et C (PLC) agissent sur la tête polaire des phospholipides, alors que les phospholipases A1 (PLA1) et A2 (PLA2) éliminent les acides gras des positions *sn-1* et *sn-2*, respectivement (Matos et Pham-Thi, 2009).

La phospholipase D est la principale famille d'enzymes qui hydrolysent les phospholipides pour produire le lipide de signalisation acide phosphatidique (Wang et al., 2006). Le génome d'*Arabidopsis* contient 12 gènes PLD qui ont été regroupés: *PLDα* (*1*,*2*,*3*), *PLDβ* (*1*,*2*), *PLDγ* (*1*,*2*,*3*), *PLDδ*, *PLDε* et *PLDζ* (*1*,*2*) (Qin et Wang, 2002 ;. Wang et al, 2006). Les différents groupes de PLD ont des exigences différentes pour les effecteurs d'activité, tels que Ca^{2+}, de l'acide gras libre et des phosphoinositides. Les PLDs diffèrent également dans la préférence de substrat (Hong et al., 2010). Ces différences biochimiques, avec leurs motifs distincts dans l'expression et la localisation subcellulaire, peuvent fournir une base pour les fonctions distinctes pour différentes PLDs dans la réponse des plantes à la sécheresse (El-Maarouf et al., 1999 ; Sang et al., 2001), à la salinité (Hong et al, 2008 ; Yu et al, 2010), à la privation d'azote (Hong et al., 2009) et à une carence en phosphate (Li et al., 2006). Les PLDα1 et PLDδ jouent un rôle dans la médiation de la réponse de la plante à l'ABA et promeuvent la fermeture des stomates, mais elles occupent différentes étapes dans la voie de signalisation (Guo et al., 2012). La PLDδ est impliquée dans la réponse aux EROs (Zhang et al., 2003), alors que la PLDα1 agit en amont de la PLDδ et favorise la production des EROs (Zhang et al., 2009).

IV.4.2 Lipide acyle-hydrolase type patatine

Considérant la composition lipidique particulière de feuilles de plantes, il n'est pas surprenant que, en plus des phospholipases, les plantes possèdent une variété d'enzymes lipolytiques capables d'hydrolyser les galactolipides. Les enzymes de ce type ont été purifiées à partir de tissus de plantes et, en dehors de leur activité de galactolipase, elles ont souvent été trouvées être capables d'agir sur les phospholipides, mais pas sur TAG. Elles ont donc reçu la désignation de lipide acyle-hydrolases (LAHs), pour indiquer que ces enzymes pourraient supprimer les deux groupements acyle à partir de différents types de lipides membranaires. La

patatine de tubercules de pomme de terre a été largement étudiée. Elle affiche des activités phospholipase et galactolipase, mais est incapable de déacyler les TAGs. Les patatines d'*Arabidopsis* comprennent une famille de neuf gènes sous-divisés en deux groupes. Les protéines provenant du groupe I ont le motif GxSxG conservé, tandis que dans le groupe II existe des substitutions de certains de ces acides aminés (Matos et Pham-Thi, 2009).

Matos et al. (2001) ont rapporté le clonage d'un ADNc de la patatine (*VuPAT1*) à partir de feuilles de niébé. Les transcrits de ce gène ont été accumulés dans les feuilles sous sécheresse, et la protéine VuPAT1 a eu une activité préférentielle de galactolipase. Des données sur les protéines du type patatine indiquent que ces protéines peuvent avoir un rôle important dans le métabolisme de lipides de plantes. Toutefois, beaucoup de travail reste à effectuer pour préciser le rôle exact de chaque isoforme. Dans le cas particulier d'*Arabidopsis thaliana*, les gènes de la patatine semblent être exprimés différemment selon le tissu végétal et les protéines qu'ils codent pour pouvoir varier aussi dans des spécificités de substrat. Il a été montré que trois gènes de la patatine sont induits par le déficit en eau et qu'*AtPAT IIA* affiche l'activité de LAH vers les galactolipides et les phospholipides. Le profil d'expression de ce gène suggère un double rôle pour cette protéine: la dégradation des lipides de membrane associée à un stress sévère et à la sénescence et, potentiellement, la signalisation de lipides (Matos et al., 2008). En outre, des résultats récents ont montré que les enzymes liées à la patatine sont impliquées dans différentes fonctions cellulaires, y compris les réponses des plantes à l'auxine, aux agents pathogènes, aux stress abiotiques et a là mobilisation des lipides au cours de la germination des graines. Ces enzymes ont l'activité de phospholipase A liée à la patatine et sont appelées pPLA (Scherer et al., 2010).

IV.5 Effets de l'ozone sur les lipides membranaires

L'action directe de l'ozone sur les cellules végétales peut provoquer différents effets sur les lipides membranaires et leur métabolisme : la diminution des teneurs des lipides (Carlsson et al., 1994), l'inhibition de la biosynthèse (Mudd et al., 1971), la stimulation de l'activité lipolytique (Hellgren, Selldén et Sandelius, 2001), la diminution de la teneur en acide linolénique (18: 3) (Carlsson, Wallin et Sandelius, 1996) et la peroxydation lipidique (Calatayud et Barreno, 2004).

En ce qui concerne les changements de la teneur et de la composition lipidique, il a été reporté que l'ozone a augmenté la teneur en phospholipides chez *Pharbitis nil* et l'a diminuée

chez *Phaseolus vulgaris* à l'étape initiale d'exposition à l'ozone, alors qu'il n'a pas varié la quantité des glycolipides, des acides gras insaturés et de MDA chez les deux plantes. Les auteurs on conclu que l'ozone ne doit pas oxyder directement les acides gras insaturés à l'étape initiale d'exposition, mais peut modifier le métabolisme des lipides polaires, particulièrement des phospholipides (Nouchi et Toyama, 1988). Quelques années après, des études sur le mécanisme des dommages causés par l'ozone ont démontré que l'un des premiers événements a été la stimulation de l'activité galactolipase endogène dans les feuilles, et que les acides gras libérés du MGDG par la galactolipase ont donné lieu à des changements lipidiques drastiques, c'est-à-dire, une grande diminution de MGDG et une accumulation de TAG (Sakaki et al., 1990 ; Sakaki, Kondo et Yamada, 1990).

Cependant, parfois l'ozone ne cause pas d'effets sur les paramètres étudiés. Par exemple, (Sakaki, Kato et Saji, 2007) ont trouvé essentiellement les mêmes changements lipidiques chez les feuilles des cultivars de *Phaseolus vulgaris* exposées à l'ozone avec différents niveaux de LAH endogènes. Néanmoins, les résultats n'excluent pas la possibilité que la LAH examinée a un rôle dans la réponse au stress, y compris l'ozone. Comme un autre exemple, les résultats de Wolfenden et Wellburn (1991) ont montré que des variations significatives du degré d'insaturation et du pourcentage d'acide linolénique (18:3) n'ont pas été trouvées en réponse au traitement à l'ozone chez des arbres de *Picea abies* qui ont été exposés à l'ozone durant les étés de trois années consécutives et dont la composition en acides gras du MGDG a été analysée au cours des 14 derniers mois.

Quant on analyse les deux galactolipides en réponse à l'ozone, on observe qu'une perte considérable de molécules formant des monocouches de galactolipides a été trouvée à des concentrations d'ozone (en milieu aqueux) supérieures à 0,1 ppm, avec un effet plus marqué mesuré pour MGDG. Cela va de pair avec les plus grandes quantités de MDA trouvées dans les extraits de films de MGDG oxydés par rapport à DGDG. Sur cette base, il a été conclu qu'un groupe de galactose de plus présent dans les molécules de DGDG agit de façon protectrice dans des conditions oxydantes (Rudolphi-Skorska, Filek et Zembala, 2014).

Des stratégies de compensation de la composition lipidique des membranes de la cellule peuvent également être trouvées. Hellgren, Selldén et Sandelius (2001) ont analysé les compositions en acides gras de deux classes de phospholipides, PE et PC. Les analyses ont montré que l'ozone a provoqué une diminution du rapport de PC à PE dans les membranes

plasmiques. Ils ont suggéré que la proportion de PC dans d'autres membranes augmente pour équilibrer la diminution observée avec la membrane plasmique.

Enfin, étant l'ozone une molécule très réactive, des dommages sur les membranes cellulaires sont souvent trouvés. Calatayud et Barreno (2001) ont observé une augmentation de la peroxydation lipidique causée par l'ozone chez la tomate, ce qui a contribué pour la réduction de la biomasse totale de la plante. Ces mêmes résultats ont été trouvés par ces auteurs chez la laitue quelques années plus tard (Calatayud et Barreno, 2004).

IV.6 Effets de la sécheresse sur les lipides membranaires

Les recherches entreprises depuis longtemps permettent de tirer un certain nombre de conclusions concernant les effets du déficit hydrique sur les lipides membranaires. Plusieurs travaux ont été consacrés à l'étude du métabolisme lipidique chez les plantes de *Vigna unguiculata* soumises à la sécheresse (Campos et Pham Thi, 1997 ; El-Maarouf et al., 1999, 2001 ; França et al., 2008 ; Matos et al., 2001 ; Monteiro de Paula et al., 1990, 1993 ; Sahsah et al., 1998 ; Torres-Franklin et al., 2007, 2009). Des autres travaux sur la même thématique ont été conduits chez *Arabidopsis thaliana* (Gigon et al., 2004 ; Matos et al., 2008), *Cocos nucifera* (Repellin A. et al., 1997), *Phaseolus vulgaris* (Júnior et al., 2008), *Arachis hypogaea* (Lauriano et al., 2000), *Gossypium hirsutum* (Pham-Thi et al., 1985), *Olea europaea* (Guerfel et al., 2008), *Triticum durum* (Quartacci et al., 1995) et *Avena sativa* (Larsson, Nyström et Liljenberg, 2006).

Des analyses d'acides gras chez les feuilles de plantes soumises à la sécheresse ont montré des résultats divergents, selon les espèces végétales et l'intensité du stress (Monteiro de Paula et al., 1990 ; Repellin et al., 1997). Cependant, le consensus général est que les plantes tolérantes à la sécheresse maintiennent la composition lipidique de la membrane, en raison de mécanismes antioxydants efficaces (Contour-Ansel et al., 2006 ; D'Arcy-Lameta et al., 2006), du contrôle des activités hydrolytiques (El-Maarouf et al., 1999 ; Matos et al., 2001, Sahsah et al., 1998) et de la capacité d'augmentation des niveaux d'insaturation par une stimulation de l'expression des gènes de désaturation (Torres-Franklin et al., 2009). Chez les espèces sensibles à la sécheresse, les processus de dégradation conduisent à des réductions de la teneur en lipides polaires et en acides gras polyinsaturés, en particulier dans les galactolipides de feuilles (Monteiro de Paula et al., 1993 ; Torres-Franklin et al., 2007).

Les enzymes impliquées dans la dégradation des lipides de membranes et les gènes correspondants sont relativement bien connues chez ces plantes soumises à la sécheresse (El-Maarouf et al., 1999, 2001; Matos et al., 2001, 2008). D'autre part, l'implication de la synthèse des acides gras polyinsaturés dans le maintien de la composition de la membrane dans des conditions de sécheresse est également importante. Les membranes cellulaires de feuilles de plantes et en particulier les membranes chloroplastiques contiennent des niveaux élevés d'acides gras triénoïques. L'insaturation contribue à la stabilité des membranes cellulaires et à l'activité optimale des protéines liées à la membrane. Ainsi, l'augmentation du contenu des acides gras polyinsaturés pourrait aider à maintenir la fluidité et la perméabilité appropriées des membranes sous des conditions de sécheresse (Torres-Franklin et al., 2009).

V. *Vigna unguiculata* (L.) Walp

V.1 Description

V.1.1 Classification botanique et origine

L'espèce *Vigna unguiculata* (L.) Walp est une eudicotylédone vulgairement connue sous le nom de niébé (Figure 10). Elle appartient à la famille des *Fabaceae*, à sous-famille des *Faboideae*, à la tribu des *Phaseoleae* et à la sous-tribu des *Phaseolinae* (Vercourt, 1970). Le genre *Vigna* consiste de plus de 200 espèces qui sont indigènes aux régions chaudes sur tous les continents (Fery, 2002). L'emplacement précis du centre d'origine du niébé est difficile à déterminer. Sur la base des variations génétiques et morphologiques en ce qui concerne le nombre et la répartition géographique des variétés sauvages, ainsi que leurs caractéristiques primitives, on croit que les espèces les plus primitives de *Vigna unguiculata* sauvage sont apparues au sud de l'Afrique. Cette espèce était répandue dans d'autres parties de l'Afrique, en Europe et en Inde et seulement portée à l'Amérique tropicale autour de l'année 1700 par les Espagnols avec la traite des esclaves (Singh, Mohan et Dashiell, 1997).

V.2 Importance économique et nutritionnelle

V.2.1 Culture vivrière

Le niébé est mis en évidence au Nordeste brésilien, où il est la principale culture de subsistance dans la région semi-aride. Il est aussi essentiel pour soutenir la production de bétail et

de céréales dans les régions semi-arides, servant de fourrage, de protection contre l'érosion et l'élimination de certaines plantes parasites (Silva, 2005). La superficie plantée en niébé dans le monde est d'environ 12,5 millions d'hectares, avec 8 millions (64% du total mondial) en Afrique occidentale et centrale. Les autres parties du monde, où le niébé est fortement présent, sont situées en Amérique du Sud, en Amérique centrale et en Asie, avec des zones également dans le sud-ouest de l'Europe, le sud-ouest des États-Unis et en Océanie (Citadin, Ibrahim et Aragão 2011 ; Sprent, Odee et Dakora 2010). Parmi tous les pays, les principaux producteurs sont le Nigeria, le Niger et le Brésil (Quin, 1997). Au Brésil, les principaux producteurs de niébé sont les Etats du Ceará (159.471 t), Piauí (58.786 t), Bahia (50.249 t) et du Maranhão (35.213 t), qui ont aussi les plus grandes superficies cultivées (IBGE, 2001).

V.2.2 Valeur nutritive

Le niébé est une excellente source de protéines (23-25% en moyenne), contenant tous les acides aminés essentiels, des hydrates de carbone (62%), des vitamines, des minéraux, des fibres alimentaires, ainsi qu'une faible quantité de lipides et l'absence de cholestérol. Il est principalement cultivé pour la production de grains, secs ou verts, ciblant la consommation humaine à l'état naturel, sous forme de conserve ou déshydratés (Dutra et Teófilo, 2006).

V.2.3 Fixation de l'azote

Le niébé promeut la fixation de l'azote par symbiose avec des bactéries de nodules (*Bradyrhizobium* sp.). On a vu que la plantation de haricots à la chaîne maintient la réserve d'azote dans le sol et est capable de l'augmenter (Singh, Mohan et Dashiell, 1997).

V.3 Climat

V.3.1 Les capacités de résistance à la sécheresse

Bien que considérée comme une culture tolérante à la sécheresse, les recherches ont montré que l'apparition d'un déficit hydrique pendant la culture du niébé, en particulier dans les périodes de floraison et de remplissage des graines, peut entraîner une diminution marquée du rendement. Le stress hydrique réduit aussi le poids des nodules, de l'azote cumulé, de la production d'azote et de la production de matière sèche des plantes de niébé, surtout lorsque le stress hydrique est imposé entre la deuxième et cinquième semaine après le semis (Stanford et al., 1990). Dans une

étude basée sur l'efflux des solutés a partir de disques foliaires traités par le polyéthylène glycol, *Vigna unguiculata* s'est révélée plus tolérante que d'autres espèces de haricot (Vasquez-Tello et al.,1990). Toujours sur ce critère, El-Maarouf et al. (1999) ont caractérisé le cultivar EPACE-1 comme étant un cultivar plus tolérant au stress hydrique que le cultivar IT83-D.

V.3.2 L'impact de l'ozone sur le haricot

Vis-à-vis de l'ozone, les réponses du niébé ne sont pas connues. Quelques travaux sur *Glycine max*, une espèce assez proche de *Vigna unguiculata*, ont montré la sensibilité de cette fabacée à l'ozone par rapport à d'autres cultures (Mills et al., 2007, 2011).

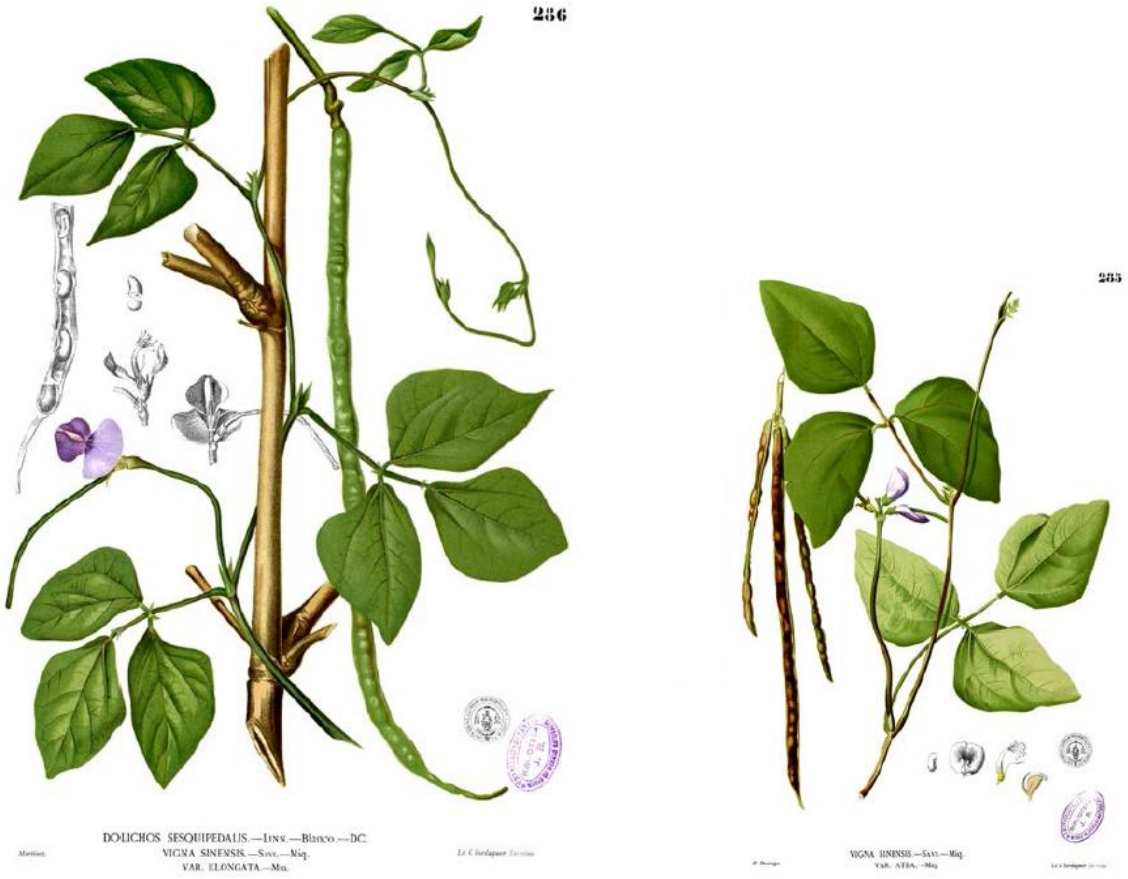


Figure 10 : Planches Botaniques représentant *Vigna unguiculata* (L.) Walp, antérieurement appelée *Vigna sinensis*.

Objectifs

Tandis que l'impact de la sécheresse sur les lipides membranaires a été largement documenté dans notre groupe, et que peu d'études sont portées sur les effets de l'exposition chronique à l'ozone sur les lipides, la présente étude représente la première étude sur les effets d''interaction entre l'ozone et la sécheresse sur les lipides membranaires chez la culture du haricot niébé.

Etant donné l'importance des membranes dans la tolérance/sensibilité des plantes à l'ozone et à la sécheresse en tant que cible des dommages causés par ces contraintes, le maintien de l'intégrité membranaire est donc un élément important de cette tolérance. Or, les membranes sont constituées d'une matrice lipidique. A l'instar d'autres contraintes environnementales, nous pensons que les modifications des lipides membranaires jouent un rôle essentiel permettant aux plantes de mieux résister aux effets de l'ozone et de la sécheresse.

Donc, l'objectif du présent travail a été d'étudier les effets de la sécheresse, de l'ozone et de la combinaison des deux contraintes sur deux cultivars de haricot niébé dotés de différents degrés de tolérance à la sécheresse: EPACE-1 et IT83-D, par le biais de la caractérisation des réponses physiologiques liées à la production de biomasse, aux échanges gazeux et à la photosynthèse ; de l'analyse de la teneur et de la composition en acides gras des lipides de membrane (galactolipides – MGDG et DGDG et phospholipides – PC, PG, PE, PI, PA et cardiolipine) ainsi que de l'expression de gènes associés à la synthèse (codant les enzymes MGDG synthase, DGDG synthase, cardiolipine synthase, désaturases d'acides gras) et à la dégradation (codant les enzymes phospholipase D et lipide acyle-hydrolase type patatine) des ces lipides. En outre, pour l'étude de l'expression du gène de la cardiolipine synthase, l'ADNc correspondant a été cloné, séquencé et caractérisé par bioinformatique.

Dans ce regard, l'étude des effets de la sécheresse et de l'ozone sur les lipides membranaires et leur métabolisme peut être essentielle dans l'identification de lipides comme des indicateurs de tolérance à ces contraintes. Ainsi, nous insistons sur l'importance de comprendre les mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires qui peuvent servir comme une ressource pour des applications biotechnologiques visant à la production de plantes plus tolérantes à ces contraintes.

Matériels et Méthodes

1. Matériel végétal

Des graines de deux cultivars de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. ont été utilisées : EPACE-1, développé et fourni par Entreprise de Recherche Agricole du Ceará et adapté aux régions semi-arides du nord-est du Brésil, et IT83-D, originaire des régions humides de la Chine et fourni par l'équipe IBIOS – UMR 7816 Bioemco de l'Université Paris-Est Créteil. Des études antérieures ont montré que ces deux cultivars tolèrent différemment la sécheresse : EPACE-1 étant fortement tolérant et IT83-D étant sensible à cette contrainte environnementale (Vasquez-Tello et al., 1990).

2. Conditions de culture et traitements

Les graines de *Vigna unguiculata* ont été stérilisées à l'hypochlorite de calcium $Ca(OCl)_2$ 0,5% (v/v) pendant 5 minutes pour éliminer les agents pathogènes potentiels dans les téguments, puis rincées à l'eau du robinet et à l'eau distillée (3 fois). Les graines décontaminées ont été semées individuellement dans des pots en plastique de 5 L contenant 0,4 kg de terreau enrichi (N/P/K 14/16/18 ; 1,2 kg/m^3, Gramoflor) fertilisé avec 15 g de granulés nutritifs à libération lente (Nutricote T-100, N/P/ K/MgO 13/13/13/2, Fertil). Les plantes ont été cultivées pendant 2 semaines dans des chambres de germination (Figure 11) dans des conditions contrôlées de luminosité (250 µmol/m^2/s au niveau des plantes pendant 14 heures), température (25/20 °C jour/nuit) et humidité (HR 80%) et avec irrigation journalière, pour maintenir le sol à la capacité au champ. L'application de l'eau a été faite de manière à éviter l'arrosage direct des feuilles. Après cette période de développement, les plantes ont été transférées vers les chambres phytotroniques (surface au sol: 1,44 m^2 et 2 m de hauteur) (Figure 12), où elles ont été soumises à une période d'acclimatation d'une semaine dans les mêmes conditions de luminosité, température et humidité que celles décrites plus haut. Ensuite, les plantes âgées de 3 semaines ont été soumises aux traitements suivants pendant 14 jours : contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O) et ozone et sécheresse combinés (OS). Les plantes témoins ont été exposées à l'air ambiant et ont reçu 400 mL d'eau par jour. La sécheresse a été appliquée en retenant l'arrosage et l'ozone a été imposé par l'exposition des plantes à 120 ± 10 ppb d'ozone par fumigations quotidiennes de 12 h (11h-23h). L'ozone a été produit à partir de l'O_2 pur par deux générateurs d'ozone (OZ500; Fischer, Bonn, Allemagne et CMG3-3; Innovatec II, Rheinbach, Allemagne) et surveillé en continu par un analyseur d'ozone (O341M, Environnement SA, Paris, France). Pour les dosages moléculaires et biochimiques, la première feuille trifoliée complètement développée (feuille n° 1,

à partir de la base de la tige) a été recueillie après 7 et 14 jours de traitements, immédiatement congelée dans l'azote liquide et conservée à -80 °C pour les analyses ultérieures.

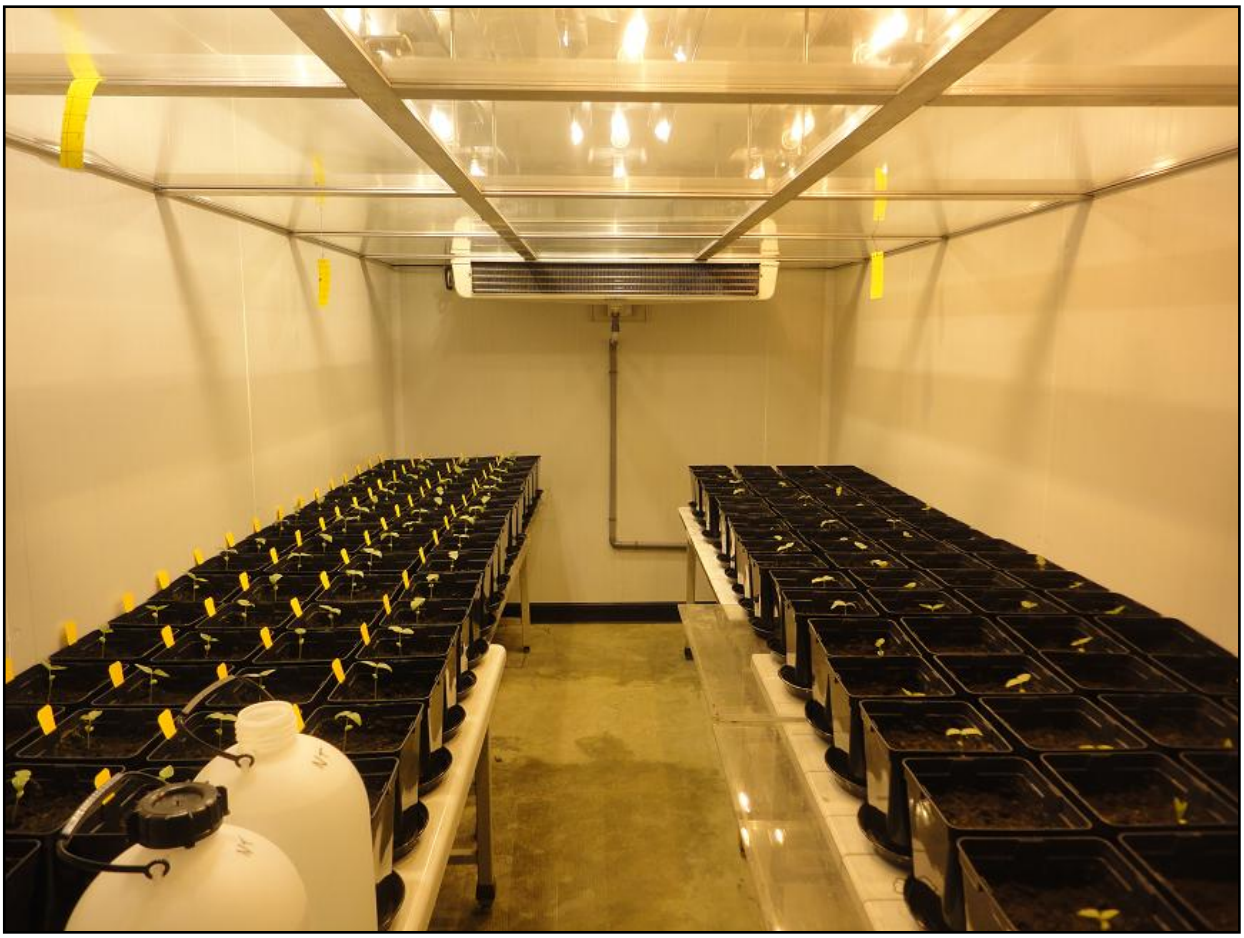


Figure 11 : Chambre de germination où les plantes ont été cultivées pendant deux semaines dans des conditions contrôlées de luminosité (250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ au niveau des plantes pendant 14 heures), température (25/20 °C jour/nuit) et humidité (HR 80%).

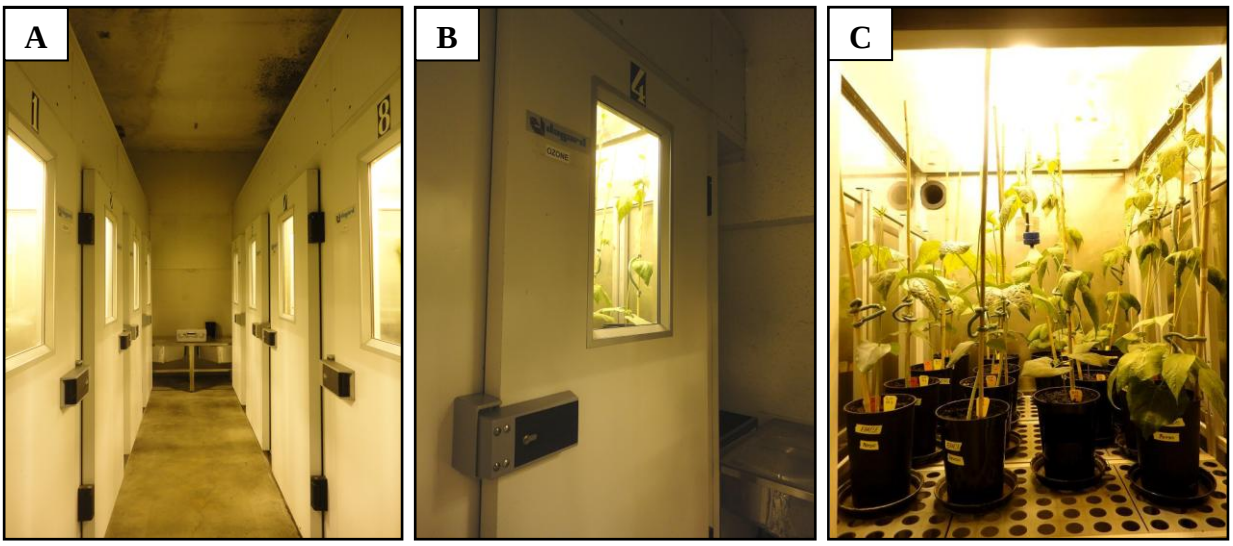


Figure 12 : Chambres phytotroniques où les plantes ont été soumises à une période d'acclimatation d'une semaine et soumises aux différents traitements pour 14 jours. A : Couloir menant aux 8 chambres ; B : Porte d'une chambre avec des plantes à l'intérieur ; C : Culture individuelle de plantes à l'intérieur d'une chambre.

2.1 Procédure de fumigation à l'ozone

Les plantes d'EPACE-1 et d'IT83-D ont été distribuées entre les 8 chambres phytotroniques climatisées et éclairées par 5 lampes à vapeur de sodium (Son-T Agro, Philips) produisant un PPFD de 250 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ au niveau des plantes. Un dispositif de fumigation d'ozone est en fonctionnement dans quatre chambres sur huit. L'ozone est produit par deux générateurs (OZ500 Fischer et CMG3 Innovatec II-3) qui séparent les molécules d'oxygène (O_2) et les réassociaient au hasard, en produisant les molécules d'ozone qui sont injectées dans le système de ventilation des chambres. Les plantes ont été fumigées en continu pendant 14 jours avec une durée de fumigation quotidienne de 12 heures, débutant 2 heures après le début de la photopériode. La concentration d'ozone (120 ± 10 ppb) a été mesurée deux fois par heure par un analyseur UV (O341M, Environnement SA) associé à une station d'acquisition de données informatisée.

3. Analyses physiologiques

3.1 Mesure de la masse sèche de la partie aérienne

L'ensemble de la biomasse aérienne (tiges et feuilles) des plantes EPACE-1 et IT83-D a été séparé des racines, déshydraté à 60 °C pendant 48 h et sa masse a été mesurée sur une balance analytique, après 7 et 14 jours de traitements. Trois plantes par traitement et par cultivar ont été mesurées.

3.2 Mesure de la teneur relative en eau

La teneur relative en eau (TRE) des feuilles de plantes EPACE-1 et IT83-D a été mesurée après 7 et 14 jours de traitements, sur des disques foliaires de 2 cm de diamètre. Le prélèvement a été fait sur une feuille trifoliée développée (troisième ou quatrième), à raison de un disque par foliole. Trois plantes par traitement et par cultivar ont été mesurées. Les disques rapidement pesés pour obtenir leur masse fraîche (MF) sont ensuite déposés sur un papier filtre imprégné d'eau et laissés à 4 °C pendant 12 heures à l'obscurité. Ils sont ensuite délicatement séchés et pesés pour obtenir la masse à pleine turgescence (MT). Le séchage des disques est obtenu en étuve à 60 °C pendant 12 heures, afin d'obtenir les masses sèches (MS). Ainsi, la teneur relative en eau a été calculée avec la formule suivante (Weatherley, 1950) :

$$TRE\% = [(MF-MS) / (MT-MS)] \times 100$$

3.3 Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

L'émission de fluorescence *in vivo* a été mesurée après 7 et 14 jours de traitements, sur l'un des folioles de la première feuille trifoliée pleinement développée (quatre plantes par traitement et par cultivar ont été mesurées), à l'aide d'un fluorimètre d'impulsion modulée (FMS-100, Hansatech). Les données ont été enregistrées en temps réel par le programme Modfluor32.

Tout d'abord, le tissu photosynthétique (feuille) a été maintenu dans l'obscurité pendant une durée minimale de 30 minutes grâce à un système de serrage avec clip « ouverture-fermeture ». Pendant l'adaptation à l'obscurité, tous les centres réactionnels des photosystèmes sont totalement oxydés. L'émission de fluorescence par la chlorophylle est alors minimale et nommée F_0

(émission de lumière par les molécules de chlorophylle *a* excitées, avant que l'énergie soit dissipée vers le centre réactionnel du photosystème II - PSII).

Ensuite, un *flash* de saturation (> 10 000 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ pour 1 s) a été appliqué pour obtenir la fluorescence maximale des feuilles adaptées à l'obscurité (F_m). La lumière actinique (400 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$) a ensuite été allumée pour conduire la photosynthèse. Quand les feuilles ont atteint l'état d'équilibre, la fluorescence à l'état stationnaire (F_s) a été enregistrée. Un *flash* saturant (>10 000 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ pour 1 s) et une impulsion sombre ont ensuite été appliqués pour obtenir la fluorescence maximale (F_m') et minimale (F_0') des feuilles adaptées à la lumière, respectivement. Ainsi, le rapport F_v/F_m, qui indique le rendement quantique maximal du photosystème II, peut être calculé selon la formule suivante :

$$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$$

Le rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}), qui correspond à la fraction d'énergie lumineuse utilisée pour la photochimie dans une feuille adaptée à la lumière, peut être calculé comme indiqué ci-dessous :

$$\Phi_{PSII} = (F_m' - F_o) / F_m'$$

3.4 Mesure de la conductance stomatique à la vapeur d'eau

La conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) a été mesurée après 7 et 14 jours de traitements sur l'un des folioles de la première feuille trifoliée pleinement développée de plantes EPACE-1 et IT83-D, à l'aide d'un poromètre SC-1 portable (Decagon Devices, Inc.). Quatre plantes par traitement et par cultivar ont été utilisées et les mesures ont été systématiquement effectuées dans les premières heures de la matinée (entre 9h et 11h), avant le début de la fumigation d'ozone, à l'intérieur des chambres phytotroniques.

3.5 Indices d'exposition à l'ozone et de dose d'ozone

L'indice AOT40 (dose cumulative d'ozone au-dessus du seuil de concentration d'ozone de 40 ppb, in ppb h sous un éclairement minimum de 50 $W.m^{-2}$) a été calculée en additionnant les différences entre les moyennes horaires de concentration d'ozone (en ppb) dans la partie supérieure de la voilure et un seuil de 40 ppb pour toutes les heures de lumière du jour dans une

période de temps spécifiée (Mapping Manual of the Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution, 2004).

L'absorption instantanée d'ozone a été calculée à partir de la surveillance de la concentration d'ozone et de la conductance stomatique à la vapeur d'eau (g_s) comme décrit dans Bagard et al. (2008). Le flux d'ozone dans le mésophile des feuilles (F_{O3}) est donnée par:

$$F_{O3} = g_{O3} ([O_3]_{atm} - [O_3]_{int})$$

où, g_{O3} est la conductance stomatique à l'ozone, $[O_3]_{atm}$ est la concentration d'ozone dans la chambre et $[O_3]_{int}$ est la concentration d'ozone dans la feuille. L'ozone est pensé pour réagir très rapidement dans la feuille (Laisk, Kull et Moldau, 1989) et $[O_3]_{int}$ est généralement supposé être nul (Grulke, Paoletti et Heath, 2007). La conductance stomatique à l'ozone est liée à g_s par la formule suivante:

$$g_{O3}=0,663\ g_s$$

où 0, 663 est le rapport du coefficient de diffusion dans l'air d'ozone au-dessus de celle de vapeur d'eau (Massman, 1998). A partir des deux équations précédentes, l'absorption instantanée d'ozone (en $nmol.m^{-2}.s^{-1}$) peut être exprimée comme:

$$F_{O3} = 0,663\ g_s\ [O_3]_{atm}$$

Comme les plantes ont été cultivées dans des conditions contrôlées de lumière, humidité et température, nous avons supposé que g_s est restée stable au cours des périodes quotidiennes de fumigation. Par conséquent, une seule valeur de g_s a été utilisée pour calculer les absorptions horaires d'ozone sur un jour donné. La conductance stomatique à la vapeur d'eau a été enregistrée comme décrit dans la section précédente après 7 et 14 jours d'expérience. $[O_3]_{atm}$ a été obtenue à partir de la concentration moyenne horaire d'ozone enregistrée dans les chambres de fumigation. L'absorption horaire d'ozone (en $mmol.m^{-2}.h^{-1}$) a été estimée par l'intégration de l'absorption instantanée (F_{O3}) plus d'une heure. Le flux stomatique accumulé ou dose phytotoxique d'ozone (POD, en $mmol.m^{-2}$) a été déterminé en additionnant les absorptions horaires d'ozone. En absence de relation dose-réponse disponible pour *Vigna* ou espèces apparentées, la POD a été calculée sans seuil de flux instantané d'ozone (Mapping Manual LRTAP, 2004).

3.6 Accumulation de peroxyde d'hydrogène dans les feuilles

L'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les feuilles de plantes EPACE-1 et IT83-D a été étudiée après 14 jours de traitements en utilisant la coloration par 3,3'-diaminobenzidine (DAB). La solution DAB (1 $mg.mL^{-1}$) a été infiltrée dans des disques foliaires de 1 cm de diamètre par vide et les disques ont été laissés à imprégner pendant 24 heures à l'obscurité. Ensuite, les disques ont été décolorés dans trois bains successifs d'éthanol 95% et stockés dans glycérol 30%. Les photos ont été prises avec un microscope stéréoscopique sous 0,8 × de grossissement (Nikon SMZ1000) couplé avec un appareil photo numérique (Nikon D70S).

4. Analyses Biochimiques

4.1 Extraction des lipides totaux à partir de feuilles de haricot niébé

Les lipides totaux de feuilles de plantes d'EPACE-1 et d'IT83-D ont été extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Les feuilles ont été broyées dans de l'azote liquide et environ 1 g de la poudre résultante a été ajouté à 10 mL d'eau distillée en ébullition, pendant 2 minutes pour arrêter les activités des enzymes lipolytiques. L'homogénat ainsi obtenu est transféré dans un tube en verre à centrifuger contenant 10 mL de méthanol et 10 mL de chloroforme. Le tube est agité vigoureusement pour extraire les composants hydrosolubles (phase méthanol/eau) et les composants liposolubles (phase chloroforme). Les mélanges sont centrifugés (centrifugeuse Jouan BR4) à 2000×g pendant 15 minutes, à température ambiante. La phase inférieure chloroformique est recueillie dans un tube en verre et le matériel végétal est extrait de nouveau après ajout de 10 mL de chloroforme, agitation et deuxième centrifugation. La phase chloroformique est recueillie, ajoutée à la première et le chloroforme est évaporé sous courant d'azote. Les lipides sont solubilisés dans 1 mL d'éthanol/toluène (1:4 v/v) et conservés à 4 ˚C. De l'hydroxytoluène butyle (BHT) 0,01% (m/v) a été ajouté aux solvants d'extraction pour prévenir l'oxydation des lipides.

4.2 Séparation des classes lipidiques par chromatographie sur couche mince

300 µL d'extrait lipidique de feuilles de plantes d'EPACE-1 et d'IT83-D ont été utilisés pour la séparation des classes lipidiques par chromatographie sur couche mince (CCM) (phase stationnaire : plaques de silice 20 × 20 cm, G40, Merck), avec 95 mL de solution de Lepage

(1967) [chloroforme/acétone/méthanol/acide acétique/eau (50/20/10/10/5 v/v)] comme phase mobile, à l'intérieur d'une cuve à chromatographie hermétiquement fermée. Les échantillons ont migré pendant environ 2 heures, jusqu'à ce que le front de migration se retrouve à 2 cm du bord supérieur de la plaque. Après la migration, les différentes classes de lipides résolues sont visualisées sous lumière UV après pulvérisation de primuline (10 mg/100 mL d'acétone 80%) (Figure 13). Les bandes correspondant à chaque classe lipidique sur la plaque sont collectées par grattage avec une spatule, pour analyse.

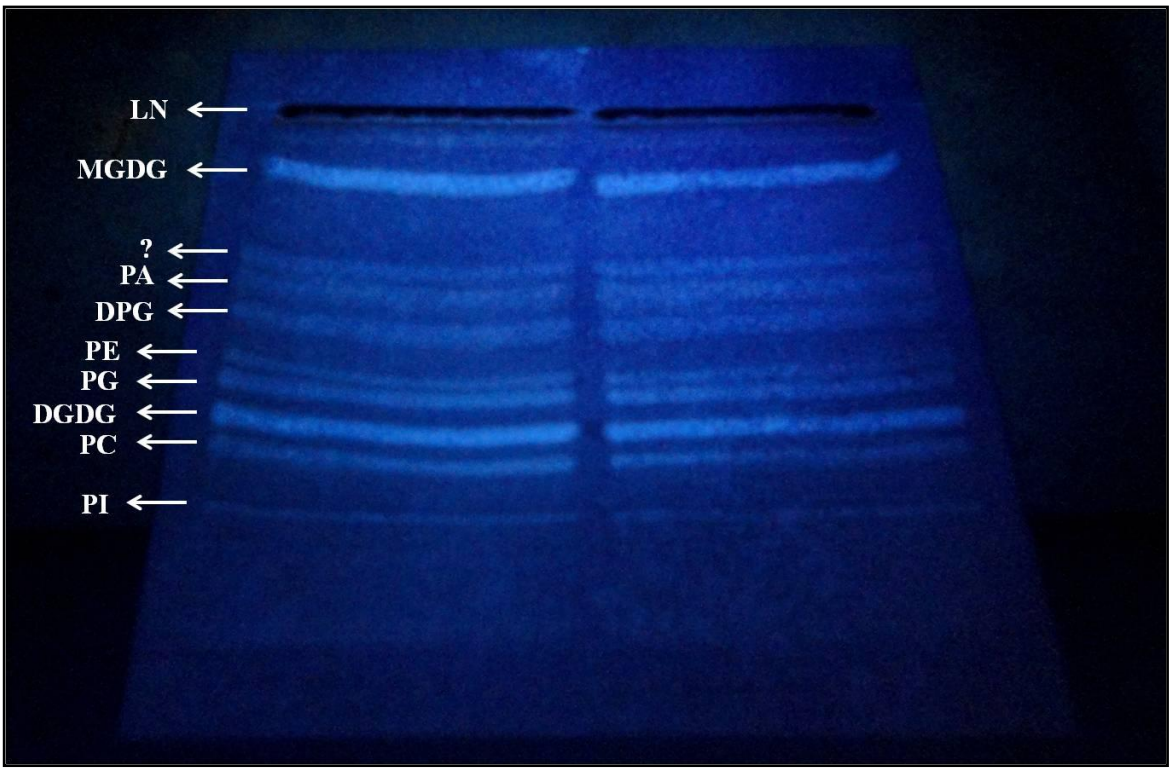


Figure 13 : Les différentes classes de lipides visualisées sous lumière UV après pulvérisation de primuline sur la plaque de CCM. MGDG, monogalactosyl diacylglycérol; DGDG, digalactosyl-diacylglycérol ; PC, phosphatidylcholine ; PG, phosphatidylglycérol ; PI, phosphatidylinositol ; PE, phosphatidyléthanolamine ; PA, acide phosphatidique ; DPG, diphosphatidylglycérol ; LN, Lipides neutres.

4.3 Méthylation des acides gras

Les lipides totaux (200 µL) et les classes lipidiques séparées par CCM sont saponifiés à la soude méthanolique 0,5 N (2 mL par échantillon à traiter) et chauffage à 65 °C pendant 15 minutes dans un bain-marie. Les acides gras obtenus sont méthylés au trifluorure de bore/méthanol (BF_3CH_3OH) (1 mL par échantillon à traiter) et chauffage à 65 °C pendant 15 minutes dans un bain-marie. Un standard interne constitué d'acide heptadécanoïque pur (17:0 ; 0,1% m/v dans du méthanol) est ajouté aux échantillons avant leur méthylation à raison de 100 µL dans les extraits totaux et 50 µL dans les échantillons de classes lipidiques. Les esters méthyliques d'acides gras sont ensuite extraits par l'addition de 10 mL de pentane et 2 mL d'eau distillée, et agitation. La phase supérieure pentanique est recueillie et séchée sous courant d'azote. Après évaporation, les esters méthyliques d'acides gras ont été resuspendus dans 1 mL de pentane et conservés à -20 °C.

4.4 Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) des lipides totaux et des classes lipidiques de feuilles ont été séparés par un chromatographe en phase gazeuse (Clarus 680, Perkin Elmer) équipé d'une colonne capillaire en silice fondue (60 m de longueur × 0,25 mm de diamètre intérieur × 25 mm d'épaisseur, Elite-WAX ETR, Perkin Elmer). 1 µL des échantillons et des standards ont été évaporés à 250 °C dans le chromatographe et introduits dans la colonne par un système d'injection. L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 1 $mL.min^{-1}$. La température du four a été programmée de manière à augmenter de façon continue à partir de 75 °C à 200 °C pendant une durée totale de fonctionnement de 60 min. Les EMAGs ont été séparés en fonction de la longueur de la chaîne aliphatique et du degré d'insaturation. A la sortie de la colonne, les esters méthyliques ont été analysés par ionisation électronique (70 eV) avec un seul spectromètre de masse quadripôle (Clarus 600, Perkin Elmer) et identifiés en comparant les données spectrales obtenues à une base de données NIST (*National Institute of Standards Technology*, Gaithersburg, Maryland). Une solution de pentane a été injectée entre chaque échantillon pour le lavage de la colonne.

Les étalons ont été préparés à partir d'un mélange de standards disponible dans le commerce (F.A.M.E. Mix, C8- C22 unsaturates, Supelco) utilisant de l'acide heptadécanoïque

(17:0) comme standard interne. Les étalons ont été analysés en trois répliquâtes et des courbes standard linéaires ont été établies pour les esters méthyliques des cinq principales acides gras présents dans les lipides membranaires de feuilles de *Vigna* (16:0, 18:0, 18:1; 18:2, 18:3) (Monteiro de Paula et al., 1990).

Pour maximiser la sensibilité et la spécificité, les AMAGs ont été quantifiés en mode d'enregistrement mono-ion (*single-ion-recording*, SIR), où seuls les fragments ioniques d'intérêt, préalablement sélectionnés et enregistrés en fonction de leur temps de rétention, sont retenus pour analyse. Les spectres de masse des AMAGs ont été identifiés en utilisant la bibliothèque des spectres de masse commerciale fournie avec le logiciel du fabricant (TurboMass, Perkin Elmer).

Pour déterminer la concentration en acide gras (em mg/gMS) dans une feuille donnée, les réponses (surfaces des pics) des AMAGs ont été normalisées séparément à la réponse de l'étalon interne 17:0 et quantifiés à l'aide de la relation d'étalonnage correspondant selon la formule suivante :

$$[A.G.] = \sum [(S_{A.G.}/S_{17:0})/a] \times 5 / MS$$

où $S_{A.G}$ correspond à la surface du pic correspondant à l'acide gras d'intérêt, $S_{17:0}$ représente la surface du pic correspondant au 17:0, « a » correspond au pente de la droite étalon : $S_{A.G.}/S_{17:0} = f([A.G.])$, « 5 » est le facteur de dilution de l'extrait total (200 µL utilisés sur 1000 µL d'extrait total) et MS correspond à la masse sèche de la feuille.

Le calcul des concentrations en acides gras dans les classes lipidiques a été effectué à partir de la formule ci-dessus utilisant « 3,33 » comme facteur de dilution, car 300 µL sur un total de 1000 µL ont été utilisés pour la méthylation. Pour déterminer la teneur d'un lipide donné, les quantités d'acides gras ont été additionnées et le résultat a été multiplié par un coefficient de correction selon le lipide : MGDG=1,41; DGDG=1,69 ; PC=1,56 ; PG=1,54 ; PI=1,69 ; PE=1,09 ; PA=1,09 ; DPG=1,09.

5. Analyses moléculaires

5.1 Extraction d'ARNs totaux

L'isolement d'ARN totaux a été réalisé avec le *kit* d'extraction - *RNeasy Plant Mini kit* (Qiagen), suivant les instructions du fabricant. Les feuilles, précédemment congelées dans l'azote

liquide et stockées à -80 °C, ont été broyés dans un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide. Environ 70 mg du broyat est transféré dans un microtube dans lequel 450 µL de tampon RLT (contenant de l'isothiocyanate de guanidine) additionné de β-mercaptoéthanol (1% v/v) sont ajoutés. Le β-mercaptoéthanol inactive les RNases. Les mélanges sont homogénéisés par agitation au *vortex* pendant 2 minutes puis centrifugés (SpinMini Plus, Eppendorf) à 14 500 rpm pendant 6 minutes. Le surnageant est recueilli et placé au sommet d'une mini-colonne du *kit* (*QIAshedder spin column*), couplée à un tube collecteur de 2 mL. Une centrifugation à 14 500 rpm pendant 2 minutes est effectuée et 225 µL d'éthanol 100% sont ajoutés à l'éluât. Le mélange est déposé sur une autre colonne du *kit* (*RNeasy mini spin column*), couplée à un tube collecteur de 2 mL) et centrifugé à 14 500 rpm pendant 1 minute pour éliminer l'éthanol. La colonne est transférée à un tube collecteur propre. Le contenu de la colonne est lavé avec 350 µL de tampon RW1 par centrifugation à 14 500 rpm pendant 1 minute. Les ARN totaux fixés à la résine de la colonne sont traités avec 80 µL de DNase I dans le tampon RDD (1:7 v/v) (*RNase –Free DNase Set*, Qiagen) pendant 15 minutes, à température ambiante. Après un nouveau lavage avec 350 µL de tampon RW1, trois lavages sont réalisés avec 500 µL de tampon RPE. L'élution des ARN totaux est réalisée dans 30 µL d'eau sans RNase ajoutés directement à la colonne et laissés agir 5 minutes à température ambiante avant centrifugation à 14 500 rpm pendant 1 minute pour la première élution. L'éluât est déposé sur la même colonne et élué à nouveau par centrifugation à 14 500 rpm pendant 1 minute. L'éluat final constitue l'extrait d'ARN total.

La concentration en ARN dans les extraits totaux a été mesurée par spectrophotométrie en utilisant un NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Noryx) à la longueur d'onde de 260 nm, à partir d'1µL d'extrait. Le rapport A_{260nm}/A_{280nm}, qui doit être compris entre 1,7 et 2,0, évalue la pureté des extraits. L'intégrité des ARNs extraits est elle évaluée par observation des signaux correspondant aux sous-unités ribosomiques 18S et 28S, après électrophorèse sur gel d'agarose (1,5% m/v) en présence de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL). L'échantillon (0,5 µg d'extrait d'ARN totaux) est mélangé à du tampon de charge (bleu de bromophénol 2,5 $mg.mL^{-1}$, glycérol 60%, eau distillée) et l'électrophorèse est réalisée dans le tampon TAE 0,5× (TAE 50×: Tris-HCl 0,5 M, acide acétique 50 mM, EDTA 5 mM ; pH 7.4), dans une cuve d'électrophorèse couplée à un générateur de courant (Mupid-one, Advance) réglé à 100 V pendant environ 30 minutes. Une échelle de taille (fragments d'ADN de 100 pb à 1000 pb, Smart Ladder, Eurogentec) a été utilisée. La fluorescence du bromure d'éthidium est détectée par exposition du

gel aux rayons ultraviolets et digitalisée par un système d'imagerie moléculaire (GelDoc, BioRad).

5.2 Synthèse de l'ADN complémentaire par transcription inverse

La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse (RT) a été réalisée à partir de 800 ng d'ARN totaux extraits de feuilles à l'aide du *kit SuperScript®* III *Reverse Transcriptase* (Invitrogen), selon les instructions du fabricant.

Le mélange suivant : H_2O sans RNase q.s.p 11 µL, 800 ng d'ARN totaux, 1 µL d'oligo dT18 à 20 pmol.µL^{-1} et 1 µL de dNTP à 10 mM a été placé dans thermocycleur *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) à 65 °C pendant 5 minutes puis refroidi brutalement à 4°C pendant 1 minute. A ce mélange, ont été ajoutés 4 µL de *First Strand Buffer* 5×, 1 µL de DTT à 0,1 µM, 1 µL de *RNase Inhibitor* et 4 unités de *SuperScript* III *Reverse Transcriptase*. Le mélange est incubé dans le thermocycleur à 55 °C pendant 1 heure puis à 70 °C pendant 15 minutes pour la dénaturation de la transcriptase inverse. Ensuite, les tubes ont été stockés à -20 °C.

5.3 Dessin des amorces de la cardiolipine synthase de Vigna unguiculata pour clonage

Les séquences génomiques chez des espèces d'ordre Fabales, proches à *Vigna unguiculata*, ont été obtenues par la recherche dans la base de données WGS (*Whole Genome Sequencing*) du GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) et dans Phytozome (http://www.phytozome.net/) en utilisant l'outil BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) avec la séquence en acides aminés de la cardiolipine synthase (CLS) d'Arabidopsis (numéro d'accès: NP_567273.1) comme appât. Un seul gène codant pour la CLS a été trouvé chez ces plantes. L'annotation des séquences d'exons/introns des gènes codant pour la CLS des espèces *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* et *Cajanus cajan* a été effectuée en comparant ses séquences génomiques obtenues avec des séquences d'ARNm/ESTs disponibles dans GenBank. Les séquences déduites des ADNc ont été obtenues par élimination d'introns et la jonction des exons. Les séquences d'acides aminés déduites ont été obtenues par la traduction des ADNc déduits en utilisant un outil de traduction (http://web.expasy.org/translate/). Ces séquences d'acides aminés chez *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* et *Cajanus cajan* ont été utilisées pour le dessin des amorces afin d'établir la séquence de l'ADNc de la CLS de *Vigna unguiculata*. Pour cela, un alignement des séquences d'acides aminés de la CLS chez *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* et

Cajanus cajan a été réalisé (logiciel ClustalW2 ; https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). A partir des séquences-consensus identifiées, il a été observé que les extrémités N-terminale et C-terminale sont assez conservées, ce qui a permis de concevoir une paire d'amorces au début et à la fin de la séquence, dans le but de cloner la séquence codante complète (dès la première méthionine au codon d'arrêt) chez *Vigna unguiculata*. Les séquences d'oligonucléotides retenues (sense : 5'TAATGGTTCTGTTCCGCAAG3' ; antisense : 5'CAACTAGACCGAGTTTGATACT3') ont été analysées grâce au programme « net primer launch » (www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html) et ensuite envoyées à la société Eurofins MWG Operon pour synthèse. Les critères suivants ont été retenus pour le choix des séquences oligonucléotidiques : pourcentage de résidus de G + C voisin de 50% ; Tm (température d'appariement des oligonucléotides à la matrice d'ADN) comprise entre 50 °C et 60 °C ; probabilité de dimérisation ou polymérisation nulle.

5.4 Amplification de l'ADNc de la cardiolipine synthase par PCR conventionnelle

L'ADNc obtenu à partir de feuilles de plantes d'EPACE-1 après 14 jours de traitement (ozone + sécheresse) a été utilisé comme matrice pour l'amplification par PCR de la séquence codante entière de la cardiolipine synthase. Le *kit PCR Master Mix* (Promega) incluant de l'ADN polymérase de type *Taq* (*Thermus aquaticus* ADN polymérase) à 50 unités.mL^{-1}, dNTP's à 400 µM, $MgCl_2$ à 3 mM et un tampon de réaction (pH 8.5) a été utilisé.

Les mélanges de réactions PCR ont été préparés comme suit : H_2O sans ARNase q.s.p. 25 µL, 2 µL d'amorce sens à 5 µM, 2 µL d'amorce anti-sens à 5 µM, 12, 5 µL de *Master Mix* 2× (*Taq* ADN polymérase à 0, 05 u.μL^{-1}, tampon de réaction, $MgCl_2$ à 4 mM et dNTP à 0, 4 mM) et 1 µL d'ADNc à 50 µg.μL^{-1}. Les réactions PCR ont été conduites dans le thermocycleur *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) avec le programme suivant :

- Dénaturation préliminaire : 95 °C pendant 5 minutes.
- 35 cycles d'amplification incluant des étapes successives de : dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, hybridation à 53 °C pendant 30 secondes, élongation à 72 °C pendant 2 minutes.
- Elongation finale : 72 °C pendant 10 minutes.

Les résultats des amplifications PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose (1% m/v) en présence de bromure d'éthidium (0,5 µg.mL^{-1}) dans le tampon TAE 0,5× (TAE 50×: Tris-HCl 0,5 M, acide acétique 50 mM, EDTA 5 mM ; pH 7.4), dans une cuve d'électrophorèse couplée à un générateur de courant (Mupid-one, Advance) réglé à 100 V pendant environ 30 minutes. Une échelle de taille (fragments d'ADN de 100 pb à 1000 pb, Smart Ladder, Eurogentec) a été utilisée. La fluorescence du bromure d'éthidium est détectée par exposition du gel aux rayons ultraviolets et digitalisée par un système d'imagerie moléculaire (GelDoc, BioRad).

5.5 Clonage et séquençage du cDNA de la cardiolipine synthase

5.5.1 Ligation de produits d'amplification PCR dans un vecteur de clonage plasmidique

Le vecteur plasmidique, pGEM-T, du *kit* de clonage pGEM-T® *easy Vector system* I (Promega, Annexe 1) a été utilisé pour le clonage de l'ADNc amplifié par PCR. La ligation des produits de PCR dans le vecteur a été réalisée dans les conditions suivantes : 5 µL de tampon de ligation 2× (Tris-HCl 60 mM, pH 7.8, $MgCl_2$ 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2 mM, PEG 10%), 1 µL de solution de vecteur plasmidique (concentration non communiquée par le fabricant), 1 µL de l'ADN ligase T4 (3 unités) et 3 µL d'un produit de PCR. L'ensemble a été incubé à 37 °C pendant 30 minutes.

5.5.2 Transformation de bactéries compétentes

Des bactéries compétentes (*Escherichia coli* GT869, Stratagene) ont été transformées avec le plasmide recombiné par choc thermique, en utilisant 10 µL du produit de ligation et 80 µL de bactéries compétentes. Le mélange réalisé à l'aide d'une pointe de pipette est incubé dans la glace pendant 10 minutes, transféré dans un bain-marie réglé à 37 °C pendant 5 minutes puis rapidement refroidi dans la glace pendant 1 minute. Les bactéries transformées sont cultivées dans 400 µL de milieu de culture liquide LB (Luria-Bertani) (bactotryptone 10 g.L^{-1}, extrait de levure 5 g.L^{-1}, NaCl 170 mM ; pH 7) à 37 °C pendant 20 minutes (temps d'une génération), afin d'exprimer le gène de résistance à la carbénicilline (antibiotique similaire à l'ampicilline) présent sur le plasmide. Après centrifugation (centrifugeuse SpinMini Plus, Eppendorf) à 14 500 rpm pendant 2 minutes, 300 µL de surnageant sont éliminés. Le reste de la suspension bactérienne est étalé sur un milieu de culture LB solide, contenant de la carbénicilline (100 mg.mL^{-1}), de l'IPTG

(isopropyl-β-D-tiogalactopiranoside) (100 mM) et de l'X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopiranoside) (4% m/v). Les cultures bactériennes ont été incubées à 37 °C pendant 16 h.

La reconnaissance des colonies bactériennes ayant intégré le vecteur plasmidique recombinant se fait sur la base de leur couleur car le système pGEM-T® *easy Vector system* I (Promega) est un système dit blanc/bleu (Jacob et Monod, 1961). Les colonies blanches sont celles qui potentiellement ont intégré un plasmide recombiné, incluant le produit d'amplification PCR.

5.5.3 Réaction de PCR sur colonies bactériennes

Des réactions de PCR ont été réalisées sur trois colonies blanches afin de vérifier la présence de l'insert. Chacune des colonies supposées positives a été à la fois repiquée sur milieu LB carbénicilline et resuspendue dans 45 µL de H_2O sans ARNase pour concentrer la teneur en ADN plasmidique et augmenter l'efficacité de la PCR. 5 µL ont été utilisés pour effectuer des réactions de PCR dans les conditions suivantes : 1 µL d'amorce sens à 5 µM, 1 µL d'amorce antisens à 5 µM et 7 µL de *Master Mix* 2X (*Taq* ADN polymérase 0,05 $u.\mu L^{-1}$, tampon de réaction, $MgCl_2$ 4 mM et dNTP 0,4 mM) (Promega). Les réactions de PCR ont été conduites dans le thermocycleur *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) avec le programme suivant :

- Dénaturation préliminaire : 95 °C pendant 5 minutes.
- 35 cycles d'amplification incluant des étapes successives de : dénaturation à 95 °C pendant 30 secondes, hybridation à 50 °C pendant 30 secondes, élongation à 72 °C pendant 2 minutes.
- Elongation finale : 72 °C pendant 10 minutes.

Au restant de la solution de bactéries, 1 mL de milieu LB liquide contenant 1 µL de carbenicilline a été ajouté pour incubation à 37 °C pendant 1 heure. L'amplification de l'insert par PCR a été vérifiée sur gel d'agarose 1% avec 8 µL du produit de PCR. 50 µL des clones constatés positifs ont été étalés en boîtes de Pétri et incubés à 37 °C pendant la nuit, puis conservés à 4 °C. Les clones restants ont été remis en culture dans 7, 5 mL de milieu liquide LB avec carbenicilline à 37 °C pendant la nuit.

5.5.4 Minipréparation d'ADN plasmidique

La minipréparation consiste à isoler et purifier de l'ADN plasmidique à partir de bactéries. Pour cette purification, le système *QIAprep Spin Miniprep kit* (Qiagen) a été utilisé (dont la composition des solutions est en Annexe 2). 2 mL de culture bactérienne sont centrifugés à 14 500 rpm pendant 1 minute. Le surnageant est éliminé. Le culot bactérien est resuspendu dans 250 µL de solution de resuspension auxquels on ajoute 250 µL de solution de lyse et 10 µL de protéase alcaline pour inactiver les endonucléases et d'autres protéines libérées au cours de la lyse de cellules bactériennes. Le mélange est agité délicatement par inversion du tube (4 fois) et laissé à température ambiante pendant 5 minutes. La réaction de lyse est arrêtée par l'addition de 350 µL de solution de neutralisation (qui permet la renaturation rapide de l'ADN plasmidique dénaturé pendant la phase de lyse) et agitation douce. Après centrifugation à 14 500 rpm pendant 10 minutes, le surnageant contenant l'ADN plasmidique est transféré dans une colonne du *kit* et centrifugé à 14 500 rpm pendant 1 minute. Le contenu de la colonne est lavé avec 750 µL de solution de lavage contenant de l'éthanol, par centrifugation pendant une minute. L'éluât est éliminé et l'opération est répétée avec 250 µL de solution de lavage et centrifugation pendant 2 minutes. L'ADN plasmidique est élué dans 70 µL de d'H_2O sans ARNase par centrifugation à 14 500 rpm pendant 1 minute, après incubation d'1 minute à température ambiante. La concentration en ADN plasmidique de la solution éluée a été évaluée par spectrophotométrie (NanoDrop™ ND-1000, Noryx) à 260 nm en utilisant 1 µL de l'échantillon.

5.5.5 Séquençage d'ADN

L'ADN plasmidique purifié, contenant potentiellement une séquence nucléotidique codant pour la cardiolipine synthase de *Vigna unguiculata*, a été envoyé à la société Genoscreen (Lille, France) pour séquençage (10 µL, de concentrations variant entre 50 $ng.\mu L^{-1}$ et 200 $ng.\mu L^{-1}$). Le séquençage a été effectué sur les deux brins à partir des amorces universelles T7 et SP6 du plasmide *pGEM-Teasy*. Après analyse manuelle des électrophorégrammes du séquençage, les séquences nucléotidiques ont été étudiées par bioinformatique.

5.6 Analyse des séquences de nucléotides de la VuCLS par bioinformatique

La séquence en acides aminés de la *VuCLS* séquencée a été déduite en utilisant un outil de traduction (http://web.expasy.org/translate/). Un alignement des séquences en acides aminés de la

CLS chez *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* et *Cajanus cajan* a été réalisé et le pourcentage d'identité entre ces espèces a été vérifié en utilisant le logiciel ClustalW2 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Un arbre phylogénétique en utilisant les séquences en acides aminés de la CLS chez une espèce représentative des dicotylédones (*Arabdopsis thaliana*, numéro d'accès Genbank: NP_567273.1), une espèce représentative des monocotylédones (*Oryza sativa*) et des espèces représentatives de l'ordre Fabales a été construit à l'aide d'un algorithme *neighbor-joining* travers le logiciel MEGA 6 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (Tamura et al., 2013). Pour cela, l'annotation des séquences d'exons/introns des gènes codant pour la CLS des espèces *Arachis hypogaea*, *Cicer arietinum*, *Lotus japonus*, *Lupinus angustifolius*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa*, *Trifolium pratense* et *Vigna angularis* a été effectuée en comparant ses séquences génomiques obtenues avec des séquences d'ARNm/ESTs disponibles dans GenBank. Les séquences déduites des ADNc ont été obtenues par élimination d'introns et la jonction des exons. Les séquences d'acides aminés déduites ont été obtenues par la traduction des ADNc déduits en utilisant un outil de traduction (http://web.expasy.org/translate/).

5.7 Dessin des amorces de la cardiolipine synthase de Vigna unguiculata pour PCR en temps réel

Des amorces spécifiques ont été dessinées afin d'étudier l'expression génique de la cardiolipine synthase chez *Vigna unguiculata* par PCR en temps réel (ou PCR quantitative, qPCR). A partir de la séquence de l'ADNc séquencé, un alignement avec les séquences de l'ADNc codant pour la CLS chez *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* et *Cajanus cajan* a été réalisé en utilisant le logiciel ClustalW2 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). Les jonctions exon/exon probables dans la séquence de *VuCLS* ont été cherchées par comparaison avec les séquences des autres espèces. Une séquence génomique a été obtenue par l'insertion des introns hypothétiques pour orienter le logiciel PerlPrimer version 1.1.21 (Marshall, 2004) à dessiner les amorces dans les jonctions exon/exon, ce qui peut garantir que l'amorce ne se lie pas à l'ADN génomique en cas de contamination au cours de l'étape d'extraction d'ARN. Des séquences de 20 nucléotides ont été sélectionnées comme amorces spécifiques pour amplifier un fragment de 116 paires de base (Tableau 1). Ces séquences d'amorces ont été vérifiées: pourcentage de résidus de G + C voisin de 50% ; Tm (température d'appariement des oligonucléotides à la matrice d'ADN) comprise entre 50 °C et 60 °C ; probabilité de dimérisation ou polymérisation nulle. Les

séquences d'oligonucléotides conçues ont été commandées auprès de l'entreprise MWG Biotech AG (Ebersberg, Allemagne).

5.8 Analyse de l'expression de gènes du métabolisme des lipides par PCR en temps réel

L'expression des gènes du métabolisme des lipides de membranes de feuilles a été analysée par PCR en temps réel à l'aide du *kit Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) incluant le tampon de réaction et l'enzyme, sur plaques de 96 puits (MicroAmp, Applied Biosystems) dans le thermocycleur *StepOne Plus Real Time PCR* (Applied Biosystems).

La PCR en temps réel permet une analyse quantitative de l'expression de gènes d'intérêt. La courbe d'amplification PCR en fonction des cycles successifs peut être établie à partir des intensités de fluorescence du *SYBR Green* présent dans le milieu réactionnel. Le *SYBR Green* est un agent qui s'intercale dans l'ADN double brin et qui, après excitation par la lumière émise par le système optique du thermocycleur, émet une fluorescence verte. La détection de la fluorescence à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle de la réaction de PCR permet de mesurer en temps réel la quantité d'ADN synthétisé.

Les produits de RT ont été utilisés comme matrice pour des réactions de qPCR, en utilisant des oligonucléotides spécifiques de *Vigna unguiculata* et correspondant à divers gènes (Tableau 1).

Tableau 1 : Gènes retenus pour les analyses d'expression ; produit génique ; séquences (sens et antisens) des oligonucléotides spécifiques de *V. unguiculata* utilisées comme amorces dans les réactions de qPCR ; taille attendue des fragments amplifiés par réaction de qPCR ; N° d'accession.

Gène d'intérêt	**Produit génique**	***Amorce* sens (s) et *Amorce* antisens (as)**	**Taille du fragment amplifié**	**N° d'accession**
VuCLS	Cardiolipine synthase	(s) 5' CCTTCTCCCGATTACTTTCC 3' (as) 5' GTATCCATCCAGCCAATCAG 3'	116 pb	--
VuMGD1	MGDG synthase	(s) 5' GTCCATCCACTGATGCAGCAC 3' (as) 5' TTGCGCAACATCTGTTGTAGG 3'	165 pb	DQ205521
VuMGD2	MGDG synthase	(s) 5' GTCCATCCACTGATGCAGCAC 3' (as) 5' ATTGACCCTTCACAAGAACC 3'	232 pb	EF466098
VuDGD1	DGDG synthase	(s) 5' GTAATTTGCAATGTTCATGGTGT 3' (as) 5' TCTGAACTTCATTAGCATCCTCTC 3'	235 pb	DQ205523
VuDGD2	DGDG synthase	(s) 5' TGCACAGCCTACTAATGCTGAG 3' (as) 5' TGCAAGGTATGTGGAATAGCAC 3'	243 pb	EF466099
VuFAD7	ω 3 *fatty acid desaturase 7*	(s) 5' GCTTCAATCTTGAGTCCTATGG 3' (as) 5' CCAACCTTGGAGGAGCTGGAC 3'	119 pb	EU180596
VuFAD8	ω 3 *fatty acid desaturase 8*	(s) 5' ACCAGTTCTTGGTCAATATTACCG 3' (as) 5' CAGTGACTTCTCTCAGTCTTC 3'	213 pb	EU180595
VuPAT1	*Patatin-like lipid acyl hydrolase*	(s) 5' TTTGCTTGCTTTCCTCGAAT 3' (as) 5' CGGGAAGATTTTTGGGGTAT 3'	205 pb	AF318315
VuPLD1	Phospholipase D	(s) 5' TCTGCCAACATCAACCAGAG 3' (as) 5' ATGCGGAAACCGTAGACTTG 3'	125 pb	U92656

Les niveaux d'expression de quatre gènes de référence potentiels ont été testés dans des échantillons correspondant à toutes les conditions expérimentales étudiées (Tableau 2). Le gène *VuEF1-α* a été exprimé constitutivement dans toutes les conditions et choisi pour l'interprétation des résultats par le logiciel GeNorm (Vandesompele et al., 2002).

Tableau 2 : Gènes de référence testés ; produit génique ; séquences des oligonucléotides spécifiques de *V. unguiculata* utilisées comme amorces dans les réactions de qPCR ; taille attendue des fragments amplifiés par réaction de qPCR ; N° d'accession.

Gène d'intérêt	**Produit génique**	***Amorce* sens (s) et *Amorce* antisens (as)**	**Taille du fragment amplifié**	**N° d'accession**
VuEF1-α	Facteur d'élongation de la traduction	(s) 5' GTAACAAGATGGATGCCACC 3' (as) 5' CCACTTTCTTCAAATACGAGGAG 3'	90 pb	GH621148
VuACTIN1	Actine	(s) 5' CTCAGCAGAGCGTGAAATTG 3' (as) 5' TTGGATGTCTCCAGCTCTTG 3'	87 pb	FR839671
VuS19	Protéine ribosomique S19	(s) 5' ATTTGGTCACGGAGATCGAC 3' (as) 5' ATGACCCACTTTTCCCTCAG 3'	111 pb	GH619001
VuARN18S	ARN de la sous-unité ribosomal 18S	(s) 5' AATGGTCCGGTGAAGTGTTC 3' (as) 5' CCTACGGAAACCTTGTTACGAC 3'	122 pb	JF430412

Les mélanges réactionnels de 20 µL élaborés dans les puits des plaques contiennent les éléments suivants : 3 µL d'H_2O sans ARNase, 3 µL d'amorce sens à 5µM, 3 µL d'amorce antisens à 5µM, 10 µL de *SYBR Green* 2× et 1 µL de matrice ADNc diluée à 4 ng.µL^{-1} ou d'H_2O sans ARNase (pour le contrôle négatif).

Les conditions d'amplification (40 cycles) retenues sont les suivantes :

- 10 minutes à 95 °C (activation de la *Taq* polymérase)
- 15 secondes à 95 °C (étape de dénaturation)
- 30 secondes à 57-62 °C (hybridation des amorces et du fluorophore)
- 30 secondes à 72 °C (élongation)
- 15 secondes à 95 °C
- 1 minute à 60 °C
- 15 secondes à 95 °C

La courbe standard a été testée. Elle représente les valeurs de Ct (nombre de cycles après lequel la fluorescence atteint une valeur seuil fixée par l'appareil) en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard (ici ADNc de *Vigna unguiculata*). Grâce à la courbe standard, le Ct obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va être traduit en concentration en molécules cibles.

Au total, 18 plaques ont été utilisées pour les analyses par qPCR : 9 plaques réservées pour les échantillons à 7 jours de traitements et 9 plaques pour les échantillons à 14 jours de traitements. Sur chaque plaque, ont été chargés les mélanges réactionnels correspondant à 1 répliquât biologique (sur les 3 répliquâtes obtenus pour chaque point expérimental) en dupliquât technique, à l'un des neuf gènes d'intérêt et au gène de référence choisi (*VuEF1-α*), à l'ADNc calibrateur (de concentration choisie dans les essais précédents de courbe standard) et au contrôle négatif (H_2O sans ARNase). Sur les 96 puits que présente chaque plaque, seuls 80 sont utilisés (Figure 14).

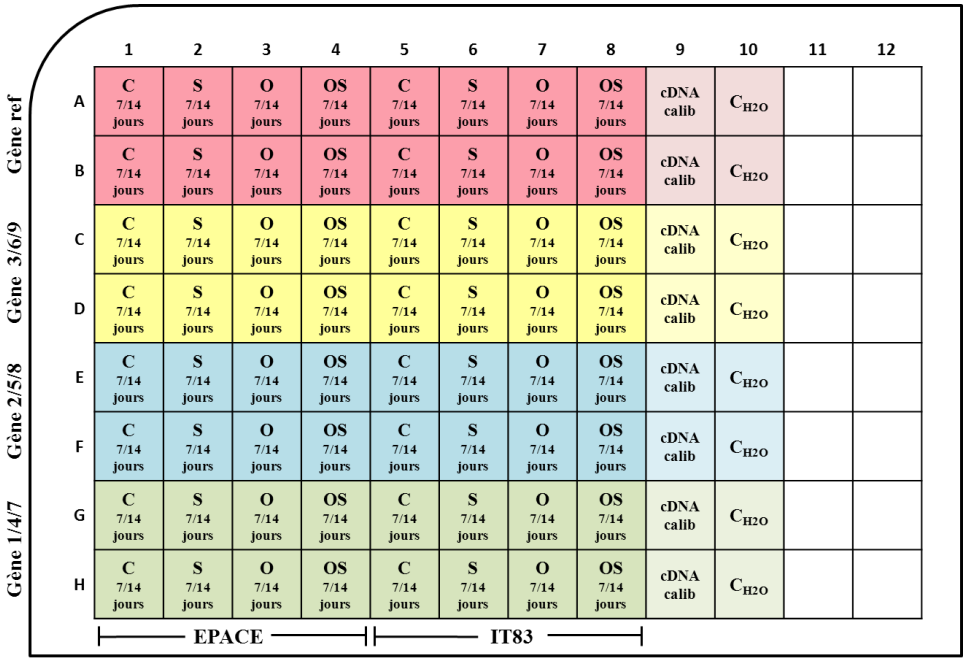


Figure 14 : Aperçu simplifié de la disposition des échantillons sur une plaque de qPCR. Le gène de référence, les gènes d'intérêt et le calibrateur ont été analysés simultanément dans le même *running*. C-contrôle, S-sécheresse, O-ozone, OS-ozone+sécheresse.

Pour le calcul de l'expression relative (E.R.), les deltas (Δ) de Ct (du calibrateur et de l'échantillon) pour le gène d'intérêt ont été normalisés par rapport aux Δ de Ct pour le gène de référence (*VuEF1-α*), selon la formule ci-dessous :

$$\text{E.R.}_{\text{calibrateur}} = \frac{2^{(\text{Ct calibrateur} - \text{Ct échantillon})}}{2^{(\text{Ct calibrateur} - \text{Ct échantillon})}} \begin{array}{l} \text{(pour le gène d'intérêt)} \\ \text{(pour le gène de référence)} \end{array}$$

E.R. = Expression relative

Ct = nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil de détection

5.9 Analyses statistiques

Comme décrit dans les légendes des figures appropriées, les paramètres ont été mesurés sur 3 ou 4 plantes par traitement, considérées comme des répétitions biologiques indépendantes. A chaque point de temps et pour un cultivar donné, les données provenant des différents traitements (contrôle, C; sécheresse, S; ozone, O; ozone + sécheresse, OS) ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) unidirectionnelle, suivie par le teste post-hoc de Tukey (α = 0, 05). Des sous-ensembles homogènes séparés sont indiqués par des lettres appropriées. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R (R Core Team 2013).

Résultats

1. Réponses physiologiques de plantes de Vigna unguiculata à la sécheresse et à l'ozone

Les réponses physiologiques de plantes de *Vigna unguiculata* à la sécheresse et à l'ozone, seuls ou en combinaison, ont été analysées après 7 et 14 jours de traitements (Figures 15 à 18).

Le traitement sécheresse, seule (S) ou combinée à l'ozone (OS), a eu un effet important sur les deux cultivars de niébé au niveau de la plante entière déjà à 7 jours. A cette période, ces traitements ont réduit la production de biomasse, représentée par la masse sèche de la partie aérienne (MSPA), des deux cultivars d'environ 40%, comparé au traitement contrôle, et après 14 jours, la diminution a attendu environ 70%. Chez IT83-D, une réduction significative d'environ 40% de la MSPA a été observée en réponse à l'ozone après 7 jours, comparé au contrôle (Figure 15).

La teneur relative en eau (TRE) des deux cultivars de niébé a été réduite significativement d'environ 20% après 14 jours de traitement à la sécheresse seule et combinée à l'ozone, quand on compare au traitement contrôle. Néanmoins, le traitement à l'ozone seul n'a causé aucun effet significatif sur la TRE des plantes (Figure 16).

La capacité photosynthétique, appelée aussi de rendement quantique maximal du PSII (exprimée comme F_v/F_m), des feuilles des deux cultivars n'a pas été affectée de manière significative par les différents traitements (Figure 17a). Par contre, l'activité photosynthétique (Φ_{PSII}) chez les deux cultivars a été réduite significativement d'environ 35% en réponse à la sécheresse seule ou combinée à l'ozone, après 14 jours, comparé au contrôle (Figure 17b).

La conductance stomatique (g_s), en réponse aux traitements sécheresse et sécheresse + ozone, a été diminuée significativement d'environ 60% chez EPACE-1 à 7 jours et d'environ 90% chez les deux cultivars à 14 jours, comparé au traitement contrôle. En outre, à 7 jours, la conductance stomatique a montré une tendance à la réduction par le traitement ozone de 40 à 50% chez les deux cultivars, comparé au contrôle. Par contre, à 14 jours, ce traitement a causé une tendance à réduire la conductance stomatique seulement chez EPACE-1, car chez IT83-D, la conductance stomatique des plantes soumises à l'ozone était si haute que celle des plantes du contrôle (Figure 18).

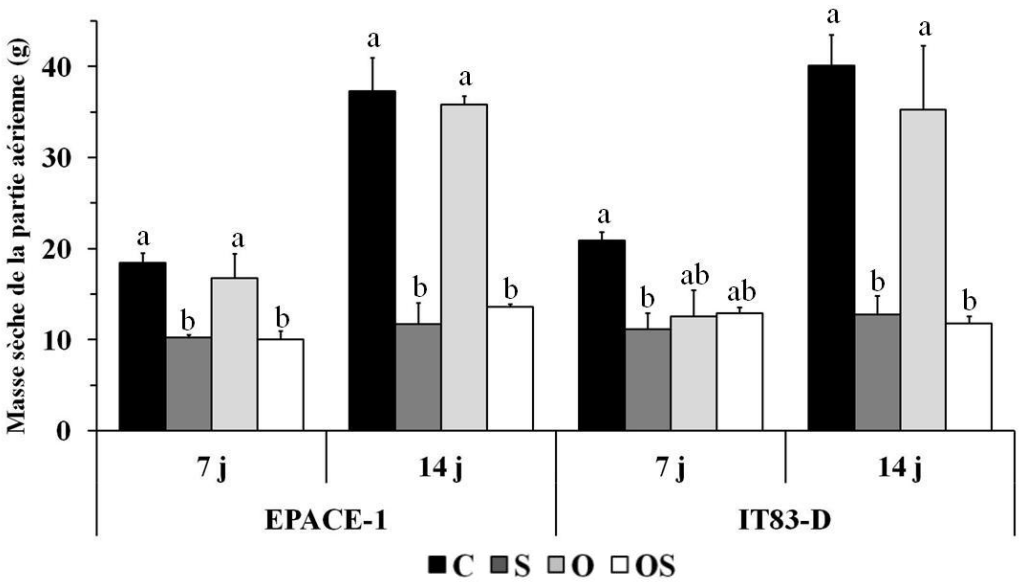


Figure 15 : Masse sèche de la partie aérienne de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3-4). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05).

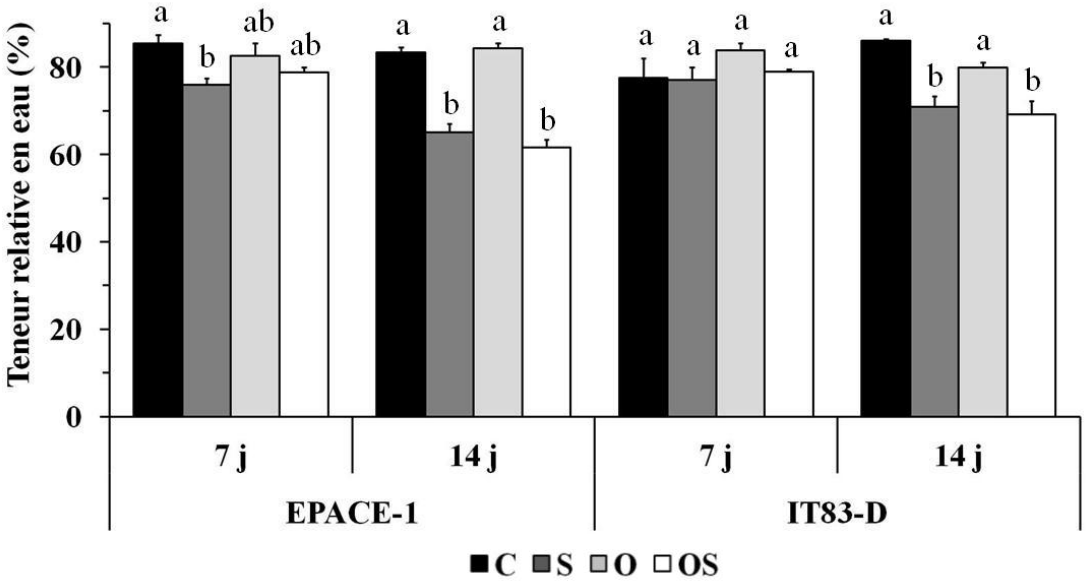


Figure 16 : Teneur relative en eau de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3-4). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05).

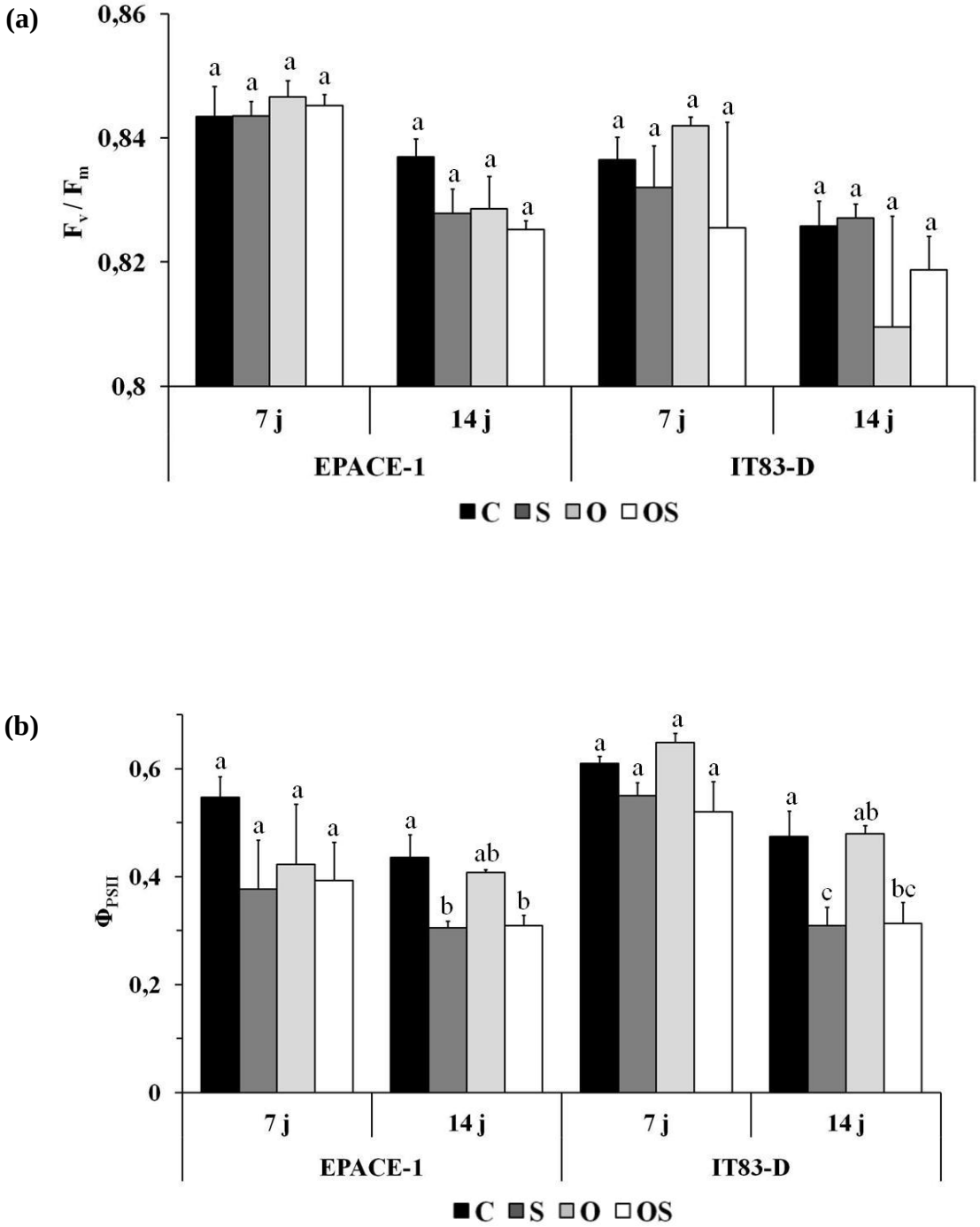


Figure 17 : **(a)**. Rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m) et **(b)**. Rendement quantique du PSII (Φ_{PSII}) de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3-4). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, $\alpha = 0,05$).

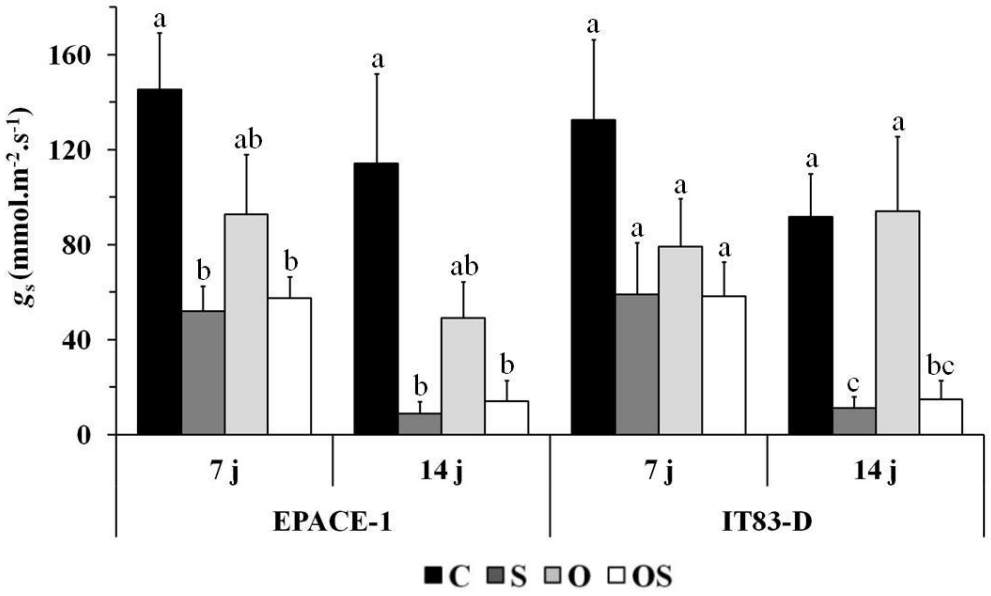


Figure 18 : Conductance stomatique (g_s) de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3-4). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05).

2. Indices d'exposition à l'ozone et de dose d'ozone, lésions foliaires et accumulation de peroxyde d'hydrogène dans les feuilles

Au cours des 14 jours de traitements, la concentration d'ozone (moyenne pendant 12 h de fumigation), ainsi que l'indice d'exposition à l'ozone (AOT40 ; concentrations d'ozone accumulées au-dessus d'un seuil de 40 ppb) ont été analysés dans les quatre chambres de fumigation et la dose phytotoxique d'ozone (POD_0 ; exprimée en tant que flux stomatique d'ozone cumulé) a été également calculée (Tableau 3).

Les plantes de deux cultivars, EPACE-1 et IT83-D, soumises aux traitements à l'ozone seul et combiné à la sécheresse, ont été exposées à une concentration moyenne de 12h d'ozone de 130,4 ppb. A la fin de la période de fumigation, l'indice d'exposition à l'ozone de ces plantes, AOT40, fondé sur les concentrations d'ozone, a attendu une valeur de 16,7 ppm h en moyenne (Tableau 3).

Après 14 jours de traitement à l'ozone seul, l'absorption stomatique d'ozone, POD_0, a été de 3,8 $mmol.m^{-2}$ chez EPACE-1 et de 4,6 $mmol.m^{-2}$ chez IT83-D. Lorsque l'on compare les valeurs de POD_0 de plantes exposées au traitement combiné avec celles de plantes exposées à l'ozone seul, une diminution de 23,7% (de 3,8 $mmol.m^{-2}$ à 2,9 $mmol.m^{-2}$) chez EPACE-1 et de 32,6% (de 4,6 $mmol.m^{-2}$ à 3,1 $mmol.m^{-2}$) chez IT83-D a été observée (Tableau 3).

La perte de l'aspect brillant sur les feuilles, des symptômes visibles de lésions sous la forme de tâches brun-noir sur la face supérieure des feuilles, ainsi que des symptômes d'accumulation de peroxyde d'hydrogène, constatés par la coloration par DAB sur les disques foliaires prélevés à 14 jours, ont été analysés chez les deux cultivars. Ces symptômes ont été observés principalement chez les plantes soumises au traitement à l'ozone, à une plus grande mesure chez IT83-D que chez EPACE-1. L'ampleur de la lésion foliaire était beaucoup moins importante chez les plantes du traitement combiné que chez les plantes traitées à l'ozone seul. En outre, le peroxyde d'hydrogène n'a pas pu être détecté dans les feuilles soumises au traitement combiné (Figure 19).

Les plantes des deux cultivars soumises aux traitements contrôle et sécheresse ont été exposées à l'air de charbon filtré et pourtant ni des lésions nécrotiques visibles sur les feuilles ni de l'accumulation d'H_2O_2 n'ont pas pu être observées (Figure 19).

Tableau 3 : Moyenne de 12h de concentration d'ozone, indice d'exposition à l'ozone (AOT40, les concentrations d'ozone accumulées au-dessus d'un seuil de 40 ppb) et absorption stomatique (POD_0, la dose phytotoxique d'ozone, exprimée en tant que flux stomatique d'ozone cumulé), dans lesquels les plantes de niébé (cultivars EPACE-1 et IT83-D) ont été soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS). Les moyennes ± écart-type sont indiquées (n = 4). La concentration d'ozone et l'AOT40 ont été calculés à partir des valeurs enregistrées dans 4 chambres identiques. L'absorption stomatique d'ozone (POD_0) a été calculée à partir de 4 répliquâtes biologiques. Les plantes du contrôle (C) et de la sécheresse (S) ont été alimentées en air filtré au charbon de bois activé et les concentrations d'ozone étaient proches de zéro.

Cultivar	**Traitement**	**$[O_3]$ (Moyenne 12h)** (ppb)	**AOT40** (ppm h)	**POD_0** ($mmol.m^{-2}.s^{-1}$)
EPACE-1	**C**	-	-	-
	S			-
	O	130,4 ± 5,2	16,7 ± 1,0	3,8 ± 0,7
	OS			2,9 ± 0,5
IT83-D	**C**	-	-	-
	S			-
	O	130,4 ± 5,2	16,7 ± 1,0	4,6 ± 1,2
	OS			3,1 ± 1,4

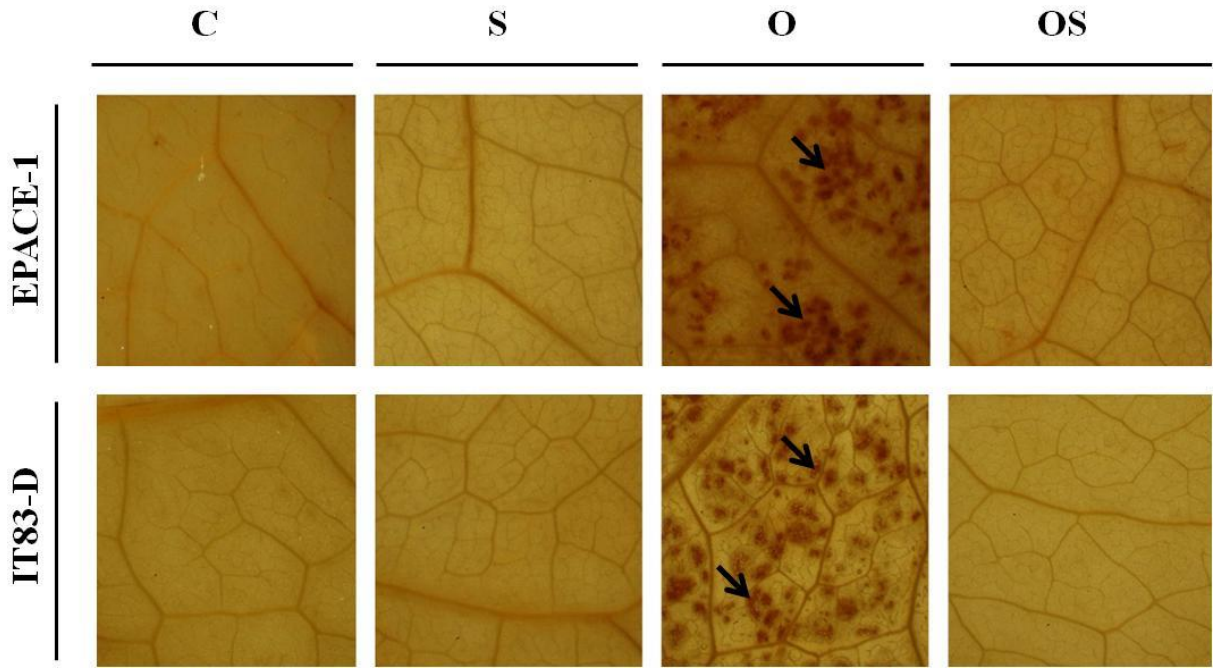


Figure 19 : Détection de peroxyde d'hydrogène à l'aide d'une coloration au DAB dans les feuilles de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) exposées aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS). Des disques foliaires ont été recueillis et colorés après 14 jours de traitement. Les photos sont représentatives de trois répétitions biologiques indépendantes. Les flèches noires indiquent les tâches en brun-noir causées par l'accumulation de peroxyde d'hydrogène. Aucun marquage spécifique n'a été observée chez les feuilles témoins traitées avec de l'acide ascorbique (données non présentées). DAB: 3,3 '-diaminobenzidine.

3. Teneur en lipides totaux dans les feuilles de niébé

Les teneurs en lipides totaux de feuilles de plantes de niébé (cultivars EPACE-1 et IT83-D) en réponse aux différents traitements ont été mesurées. Chez les deux cultivars, aucune modification significative n'a été observée en réponse aux traitements en comparaison au contrôle ni à 7 ni à 14 jours. Par contre, après 14 jours, les plantes du cultivar EPACE-1 ont montré une tendance à augmenter environ 35% sa teneur en lipides totaux en réponse à l'ozone seul, tandis que les plantes du cultivar IT83-D ont montré une tendance à la réduction d'environ 45%, comparé au contrôle (Figure 20).

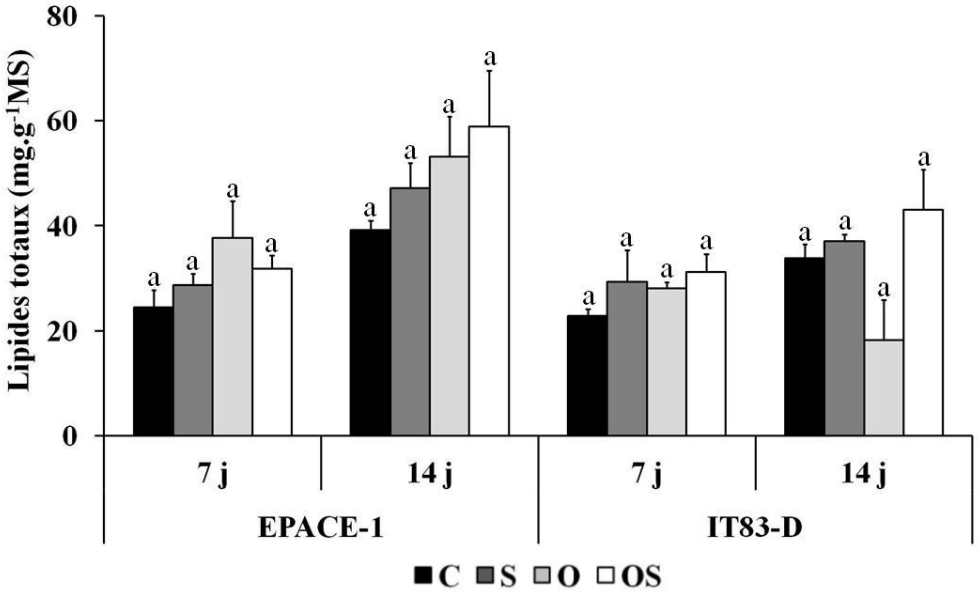


Figure 20 : Teneur en lipides totaux de feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05).

4. Composition en acides gras des lipides totaux

Des changements dans l'ensemble des teneurs en acide gras des lipides totaux des feuilles ont été analysés chez les deux cultivars en réponse aux contraintes sécheresse et ozone, seuls ou en combinaison (Tableau 4).

L'acide gras 18:3 était le plus abondant dans les feuilles de *Vigna unguiculata*, représentant vers 80% des acides gras totaux. Fait intéressant, quand on compare les plantes d'EPACE-1 à 7 jours et à 14 jours de tous les traitements, il est possible observer une diminution marquée de la proportion en 18:3 (qui a passé d'environ 80% à environ 50%) avec le temps, tandis que la teneur en 18:0 montre une augmentation en proportion (qui a passé d'environ 1% à environ 30%). Après 14 jours, les plantes d'EPACE-1 traitées à la sécheresse seule ou en combinaison avec l'ozone ont montré une diminution dans les proportions de l'acide gras insaturé 18:1, qui a passé d'environ 1% chez les plantes contrôle à environ 0,3% chez les plantes traitées. Chez le cultivar IT83-D, ces traitements ont provoqué une réduction des proportions de l'acide gras saturé 18:0 à la même période, comparé au contrôle. Le traitement à l'ozone a provoqué une réduction de

l'acide gras insaturé 18:3 (qui a passé de 84% à 75%), compensée par l'augmentation de la proportion de l'acide gras saturé 16:0 (qui a passé de 8% à 15%) (Tableau 4).

Tableau 4 : Composition en acides gras des lipides totaux dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la teneur totale en acides gras à partir de trois répétitions biologiques indépendantes. Les données en gras appartiennent à des sous-ensembles qui se fondent partiellement à l'ensemble de données de base, les données en gras sur fond gris appartiennent aux sous-ensembles strictement distincts (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05). AGT, acides gras totaux; 16:0, acide hexadécanoïque; 18:0, acide octadécanoïque; 18:1, acide-9-octadécanoïque; 18:2, acide-9,12-octadécadiénoïque; 18:3, acide-9,12,15-octadécatriénoïque.

AGT							
Cultivar	**Temps** (j)	**Traitement**	**%16:0**	**%18:0**	**%18:1**	**%18:2**	**%18:3**
EPACE-1	**7**	**C**	8,0	0,7	0,3	3,5	87,6
		S	8,1	1,0	0,2	4,2	86,5
		O	8,1	0,9	0,2	4,3	86,6
		OS	8,9	1,1	0,3	5,0	84,8
	14	**C**	6,4	36,1	1,0	3,6	52,9
		S	6,0	35,8	0,3	2,6	55,3
		O	5,9	36,7	0,6	3,2	53,5
		OS	5,2	36,7	0,3	2,7	55,1
IT83-D	**7**	**C**	8,8	1,2	0,3	4,1	85,6
		S	9,1	1,2	0,5	4,2	85,0
		O	8,6	1,1	0,5	4,4	85,4
		OS	7,9	1,1	0,2	4,1	86,7
	14	**C**	8,3	3,2	0,6	3,9	84,0
		S	8,5	1,3	0,4	4,4	85,4
		O	15,0	3,9	0,5	5,4	75,2
		OS	7,7	1,3	0,3	4,2	86,6

5. Teneur en galactolipides dans les feuilles de niébé

Les teneurs des galactolipides monogalactosyl-diacylglycérol (MGDG) et digalactosyl-diacylglycérol (DGDG), les classes de lipides dominantes dans les tissus des feuilles de niébé, ont été analysées en réponse aux différents traitements (Figure 21).

Le traitement sécheresse seule n'a eu aucun effet significatif sur le contenu de MGDG, tandis que le traitement à l'ozone a provoqué une réduction de sa teneur chez les deux cultivars. Après 7 jours, le contenu de MGDG a déjà commencé à avoir une tendance à la diminution chez

les deux cultivars en réponse à l'ozone. A 14 jours, les réductions ont été plus remarquables : la teneur de ce galactolipide a été réduite 48% chez EPACE-1 et 77% (significativement) chez IT83-D, comparé au contrôle. En réponse au traitement ozone et sécheresse combinés, la diminution de la teneur de MGDG est moins importante que celle résultant du traitement à l'ozone seul chez les deux cultivars : après 14 jours de traitement, le contenu de MGDG a été réduit 25% chez EPACE-1 et 53% chez IT83-D, en comparaison au contrôle (Figure 21a).

La teneur de DGDG a montré un profil similaire à celle de MGDG en réponse aux traitements, mais avec des réductions dans une moindre mesure. De la même façon, la sécheresse n'a pas eu d'effet sur la teneur de DGDG. Par contre, à 14 jours, l'ozone a provoqué une réduction significative de 32% chez EPACE-1 et de 64% chez IT83-D, comparé au contrôle. Le traitement combiné, à la même période, a réduit la teneur de DGDG de17% chez EPACE-1 et de 50% chez IT83-D, comparé au contrôle (Figure 21b).

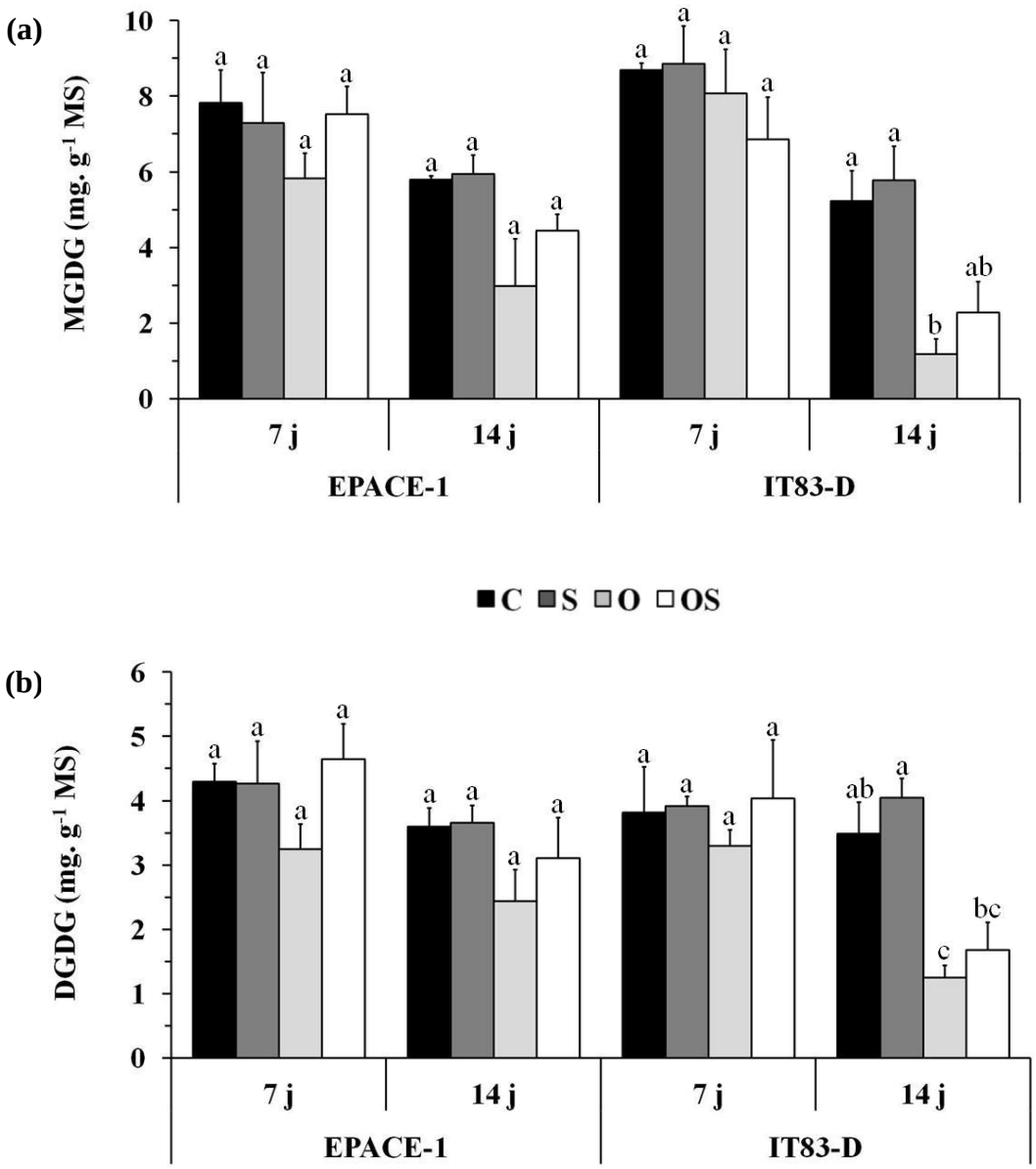


Figure 21 : Teneur de MGDG **(a)** et de DGDG **(b)** dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05). MGDG, monogalactosyl diacylglycérol; DGDG, digalactosyl-diacylglycérol.

6. Rapport DGDG:MGDG

Le rapport des teneurs de DGDG sur les teneurs de MGDG dans les feuilles de niébé a été calculé à partir des résultats de la figure 21 afin d'exprimer l'effet des traitements sur la quantité relative de ces galactolipides chez les deux cultivars (Figure 22).

Chez le cultivar EPACE-1, aucun changement dans le rapport DGDG:MGDG n'a pu être observé en réponse aux différents traitements à 7 ou à 14 jours. Par contre, chez IT83-D, le rapport DGDG:MGDG a augmenté significativement 200% en réponse à l'ozone seul après 14 jours, quand on compare au témoin. Les autres traitements n'ont pas provoqué d'effet significatif chez ce cultivar (Figure 22).

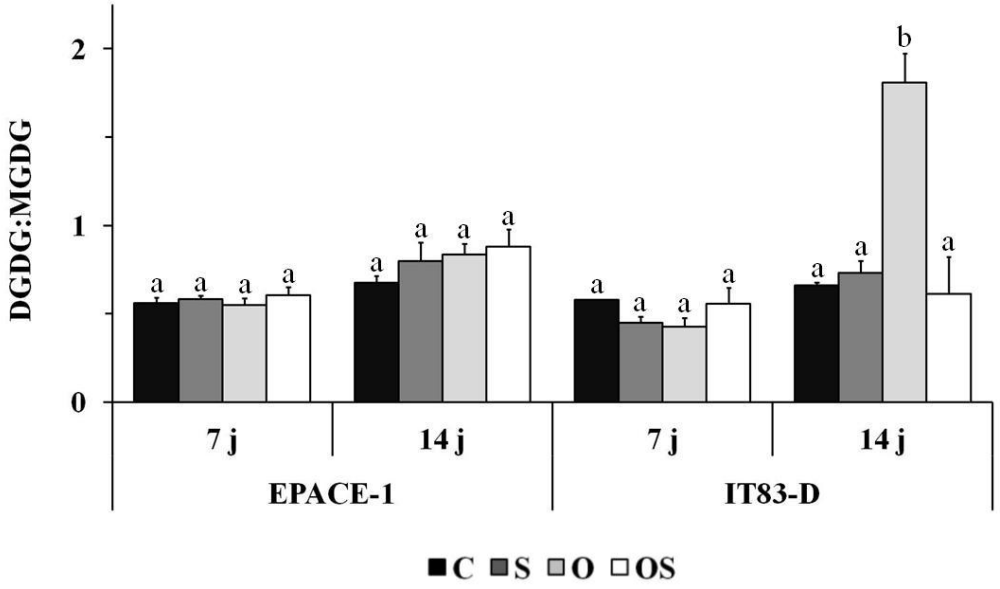


Figure 22 : Rapport DGDG:MGDG dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05). MGDG, monogalactosyl diacylglycérol; DGDG, digalactosyl-diacylglycérol.

7. Composition en acides gras des galactolipides

La composition en acides gras des galactolipides MGDG et DGDG a été analysée en réponse aux différents traitements (Tableau 5). Chez les deux cultivars, l'acide gras polyinsaturé 18:3 était le prédominant dans la composition en acides gras du MGDG (environ 95%) et du DGDG (environ 88%) des chloroplastes des feuilles (Tableau 5a, b).

La composition en acides gras du MGDG, composant majeur des membranes du chloroplaste, a été modifiée principalement par le traitement ozone chez les deux cultivars. Chez EPACE-1, une légère diminution a été observée dans la proportion de 18:3, qui a passé de 96,4% chez les plantes contrôle à 94,2% chez les plantes traitées à l'ozone après 14 jours. Cette diminution a été compensée par une augmentation de 16:0 de 1,6% au contrôle à 2,3% en réponse à l'ozone. Chez IT83-D, le traitement de 14 jours à l'ozone a provoqué une réduction significative de la proportion de 18:3 dans MGDG, qui a diminué de 95,5% au contrôle à 81,6% au traitement. Cette diminution induite par l'ozone dans le pourcentage de 18:3 a été compensée par l'augmentation d'autres acides gras dans MGDG, principalement les acides gras saturés 16:0 (qui a passé de 1,9% à 6,4%) et 18:0 (qui a passé de 1,2% à 7,7%) (Tableau 5a). En ce qui concerne le DGDG, la composition en acides gras est restée remarquablement stable au cours des traitements chez les deux cultivars (Tableau 5b).

Tableau 5 : Composition en acides gras de MGDG **(a)** et de DGDG **(b)** dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la teneur totale en acides gras à partir de trois répétitions biologiques indépendantes. Les données en gras appartiennent à des sous-ensembles qui se fondent partiellement à l'ensemble de données de base, les données en gras sur fond gris appartiennent aux sous-ensembles strictement distincts (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05). MGDG, monogalactosyl diacylglycérol; DGDG, digalactosyl-diacylglycérol ; 16:0, acide hexadécanoïque; 18:0, acide octadécanoïque; 18:1, acide-9-octadécanoïque; 18:2, acide-9,12- monogalactosyl diacylglycéroloctadécadiénoïque; 18:3, acide-9,12,15-octadécatriénoïque.

(a) **MGDG**

Cultivar	**Temps** (j)	**Traitement**	**%16:0**	**%18:0**	**%18:1**	**%18:2**	**%18:3**
EPACE-1	**7**	**C**	1,5	0,8	0,1	1,2	96,3
		S	1,4	1,0	0,1	1,2	96,3
		O	1,9	1,6	0,2	1,2	95,2
		OS	1,5	1,2	0,2	1,2	95,8
	14	**C**	1,6	0,8	0,2	1,0	96,4
		S	1,3	1,2	0,2	1,4	95,9
		O	**2,3**	1,7	0,3	1,5	**94,2**
		OS	1,2	1,2	0,3	1,4	96,0
IT83-D	**7**	**C**	1,6	1,3	0,2	1,6	95,3
		S	1,7	1,2	0,2	1,4	95,5
		O	1,2	0,6	0,1	1,4	96,7
		OS	0,9	0,6	0,1	1,3	97,0
	14	**C**	1,9	1,2	0,3	1,2	95,5
		S	1,7	**2,0**	0,3	1,6	94,5
		O	**6,4**	**7,7**	**1,1**	**3,1**	**81,6**
		OS	**2,1**	**2,4**	**0,4**	**1,8**	**93,4**

(b) **DGDG**

Cultivar	Temps (j)	Traitement	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	**7**	**C**	7,3	1,7	0,2	1,0	89,8
		S	8,1	2,4	0,3	1,1	88,1
		O	7,7	2,9	0,4	1,1	87,9
		OS	8,8	2,8	0,3	1,2	86,9
	14	**C**	7,7	2,2	0,3	1,1	88,7
		S	6,9	2,8	0,3	1,3	88,7
		O	8,1	2,7	0,5	1,2	87,6
		OS	10,5	4,1	0,4	1,4	83,7
IT83-D	**7**	**C**	8,6	2,1	0,3	1,2	87,8
		S	3,7	1,9	0,7	2,1	91,7
		O	8,0	1,5	0,2	1,0	89,3
		OS	6,8	1,6	0,4	1,1	90,1
	14	**C**	8,1	4,0	0,5	1,5	85,9
		S	6,5	3,5	0,4	1,4	88,2
		O	7,2	6,3	1,0	2,0	83,5
		OS	7,8	4,7	0,6	1,6	85,2

8. Proportion de lipides neutres dans les feuilles de niébé

Le rapport du total des acides gras sur les acides gras de la membrane lipidique a été utilisé comme un moyen d'estimer la proportion de lipides neutres, principalement de di- et triacylglycérol, par rapport à celle des lipides polaires (principalement de galactolipides) dans les tissus foliaires de plantes de niébé en réponse aux différents traitements (Figure 23).

Chez le cultivar EPACE-1, le rapport acides gras totaux : acides gras membranaires a augmenté significativement 167% en réponse à l'exposition à l'ozone seul et 108,7% en réponse au traitement combiné sécheresse + ozone, quand on compare au traitement contrôle, après 14 jours. Chez IT83-D, les différents traitements n'ont pas eu d'effet significatif sur ce rapport. Par contre, une tendance à l'augmentation d'environ 90% a été observée après 14 jours d'exposition à l'ozone et à la sécheresse en combinaison, comparé au contrôle. Cette tendance commence déjà à partir de la première semaine de traitement combiné, d'environ 70% (Figure 23).

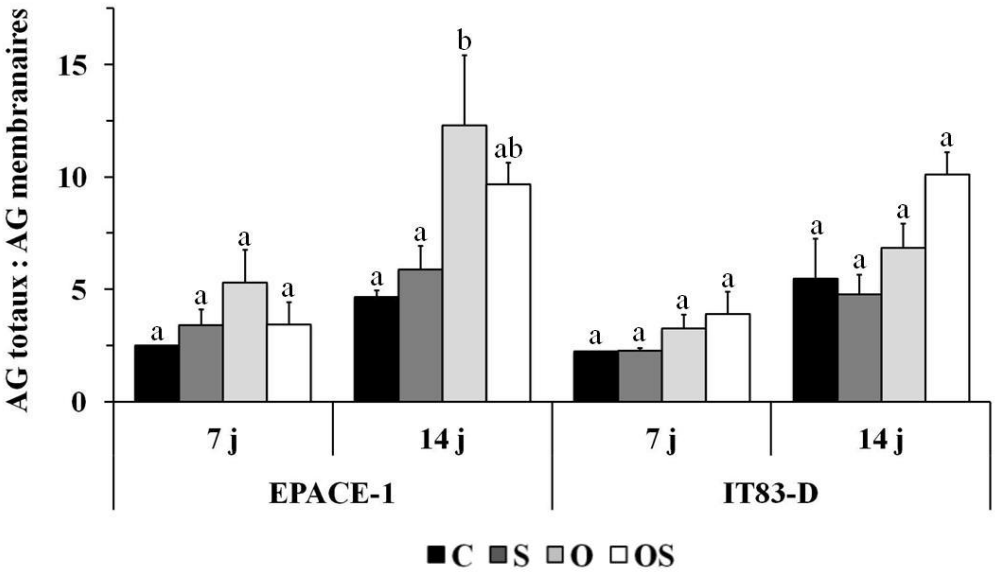


Figure 23 : Rapport AG totaux : AG membranaires dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3). Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05). AG, acides gras.

9. Teneur en phospholipides dans les feuilles de niébé

Les teneurs en phospholipides chez les plantes d'EPACE et d'IT83-D en réponse aux différents traitements ont été analysées (Figure 24). Chez les deux cultivars, PC et PG ont été les phospholipides principaux des membranes cellulaires de la feuille, même si IT83-D a montré une teneur relativement élevée en PA dans les feuilles du contrôle à 7 jours (Figure 24a, b).

Chez EPACE-1, les différents traitements n'ont eu aucun effet significatif sur les phospholipides membranaires PC, PG, PI, PE et PA. Par contre, les trois traitements (sécheresse, ozone et ozone + sécheresse) ont provoqué une tendance à l'augmentation d'environ 110% des niveaux de DPG de feuilles d'EPACE-1 après 14 jours, comparé au traitement contrôle (Figure 24a). Chez IT83-D, l'abondance des phospholipides n'a pas été affectée de manière significative à 7 jours. Cependant, à 14 jours, le traitement à l'ozone seul a provoqué une réduction significative de la teneur en PC d'environ 40%, en PG d'environ 55%, en PI et en PE d'environ 40% et en PA d'environ 15%, comparé au témoin. Aussi, le traitement d'ozone combiné à la sécheresse a causé une diminution significative de la teneur de ces phospholipides : d'environ 50% en PC et en PG,

d'environ 35% en PI, d'environ 20% en PE et d'environ 25% en PA. La teneur en DPG n'a pas été changée en réponse à l'ozone, mais a augmenté environ 65% en réponse à la sécheresse seule et environ 50% en réponse au traitement combiné ozone + sécheresse, après 14 jours, en comparaison au contrôle (Figure 24a).

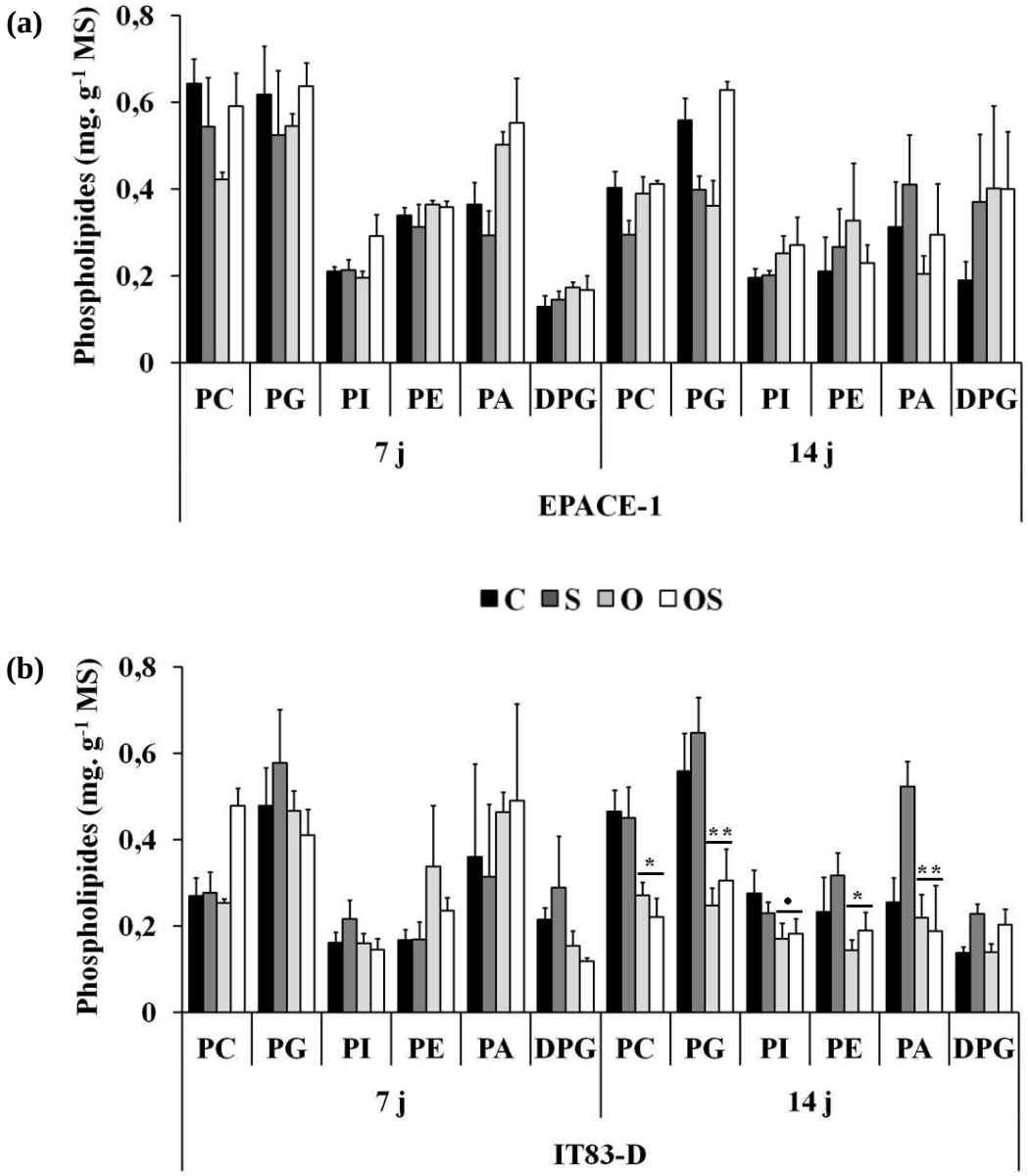


Figure 24 : Teneur de phospholipides dans les feuilles de plantes d'EPACE-1 **(a)** et d'IT83-D **(b)** soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3). Les symboles indiquent l'importance de l'effet de l'exposition à l'ozone comme indiqué par l'analyse de variance multivariée (MANOVA) de l'ensemble de données (• $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycérol; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidyléthanolamine; PA, acide phosphatidique ; DPG, diphosphatidylglycérol.

10. Composition en acides gras des phospholipides

La composition en acides gras des phospholipides PC, PG, PE, PI, PA et DPG a été analysée en réponse aux différents traitements (Tableau 6). Dans les feuilles du contrôle, les plus abondants des acides gras dans les phospholipides ont été le 16:0 et le 18:3, ainsi que le 18:0 dans DPG (Tableau 6a, b, c, d, e, f).

En ce qui concerne le PC, la proportion des acides gras saturés 16:0 et 18:0 a augmenté en réponse à la sécheresse seule et combinée à l'ozone après 14 jours chez le cultivar tolérant EPACE-1, en comparaison au contrôle. Chez IT83-D, les traitements à l'ozone seul et combiné à la sécheresse ont provoqué une réduction des acides gras saturés, qui a été compensée par l'augmentation des acides gras insaturés 18:2 et 18:3, après 7 jours, comparé au contrôle (Tableau 6a).

Chez EPACE-1, les traitements sécheresse et ozone + sécheresse ont induit une réduction de la proportion de 18:3 de PG à 7 jours et une augmentation à 14 jours, quand on compare au traitement contrôle. Cette réduction en 18:3 observée à 7 jours a été pondérée par l'augmentation des proportions des acides gras saturés. Chez IT83-D, aucune modification dans la proportion des acides gras de PG n'a été observée (Tableau 6b).

Le traitement sécheresse a provoqué une augmentation de 18:3 de PI, avec une réduction des acides gras saturés, comparé au contrôle, chez EPACE-1 après 7 jours, alors que la situation inverse a été trouvée après 14 jours de traitements. Chez IT83-D, ce traitement a causé un incrément dans le pourcentage de 18:0 de PI (Tableau 6c).

Dans le PE, le traitement combiné a réduit la proportion de 18:3, en augmentant le pourcentage en 16:0, comparé au contrôle, après 7 jours, chez EPACE-1. A 14 jours, l'ozone a augmenté la proportion de 18:3 au même temps qu'il a diminué le pourcentage en 18:0. Chez IT83-D, après 7 jours de traitement à la sécheresse, les proportions de 18:3 ont été réduites, alors que les proportions des acides gras saturés ont été augmentées, en comparaison au contrôle (Tableau 6d).

Dans le PA, le traitement sécheresse a provoqué une augmentation des proportions de 18:3, compensée par une réduction des niveaux des acides gras saturés 16 :0 et 18 :0, chez les deux cultivars, après 14 jours (Tableau 6e).

En ce qui concerne le DPG, les niveaux proportionnels de l'acide gras insaturé 18:3 chez le cultivar EPACE-1 ont été augmentés en réponse aux différents traitements en comparaison au contrôle, après 14 jours. Ces changements ont été compensés par la réduction des proportions de l'acide gras saturé 18:0. Aussi, à cette période, le traitement à l'ozone seul a provoqué une augmentation du pourcentage des acides gras insaturés 18:1 et 18:2, comparé au contrôle. Chez IT83-D, le traitement combiné a diminué les proportions de l'acide gras 18:3, en augmentant le pourcentage de l'acide gras saturé 18:0, après 7 et 14 jours, comparé au contrôle (Tableau 6f).

Tableau 6 : Composition en acides gras de PC **(a)**, PG **(b)**, PI **(c)**, PE **(d)**, PA **(e)** et DPG **(f)** dans les feuilles de plantes de *Vigna unguiculata* (cultivars EPACE-1 et IT83-D) soumises aux traitements suivants: contrôle (C), sécheresse (S), ozone (O), ozone + sécheresse (OS). Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la teneur totale en acides gras à partir de trois répétitions biologiques indépendantes. Les données en gras appartiennent à des sous-ensembles qui se fondent partiellement à l'ensemble de données de base, les données en gras sur fond gris appartiennent aux sous-ensembles strictement distincts (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, $\alpha = 0,05$). PC, phosphatidylcholine; PG, phosphatidylglycérol; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidyléthanolamine; PA, acide phosphatidique ; DPG, diphosphatidylglycérol ; 16:0, acide hexadécanoïque; 18:0, acide octadécanoïque; 18:1, acide-9-octadécanoïque; 18:2, acide-9,12- monogalactosyl diacylglycéroloctadécadiénoïque; 18:3, acide-9,12,15-octadécatriénoïque.

(a) **PC**

Cultivar	**Temps** (j)	**Traitement**	**%16:0**	**%18:0**	**%18:1**	**%18:2**	**%18:3**
EPACE-1	**7**	**C**	44,6	10,2	2,3	14,2	28,8
		S	**41,6**	13,2	2,2	14,6	28,4
		O	38,7	13,9	2,4	14,4	30,5
		OS	38,0	13,4	2,4	18,9	27,3
	14	**C**	31,8	12,8	3,5	15,6	36,2
		S	35,4	16,3	3,3	10,0	35,1
		O	**31,1**	10,9	3,3	15,5	39,2
		OS	37,8	15,2	2,2	15,1	29,6
IT83-D	**7**	**C**	**47,2**	17,0	3,1	11,0	21,7
		S	**47,6**	20,7	3,2	9,9	18,6
		O	41,4	11,4	3,3	16,1	27,8
		OS	37,7	10,8	2,1	15,9	33,6
	14	**C**	39,9	16,5	4,5	18,7	20,4
		S	37,3	17,7	3,1	20,1	21,8
		O	41,4	17,0	3,7	15,6	22,4
		OS	35,4	21,4	3,7	15,1	24,4

(b) **PG**

Cultivar	Temps (j)	Traitement	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	**7**	**C**	51,1	12,9	1,9	**3,4**	30,7
		S	52,2	20,5	**1,5**	**3,4**	22,3
		O	49,2	15,8	2,0	4,1	28,9
		OS	57,6	16,8	2,4	4,2	19,0
	14	**C**	51,5	12,2	4,1	5,5	26,7
		S	46,3	14,3	2,7	4,2	32,5
		O	51,3	15,1	**4,6**	5,3	23,7
		OS	43,7	15,0	2,2	6,1	33,0
IT83-D	**7**	**C**	49,6	16,6	2,1	5,5	26,2
		S	51,7	16,2	1,8	**7,7**	22,6
		O	49,0	12,5	2,2	4,4	31,9
		OS	53,1	14,7	**1,5**	3,8	26,9
	14	**C**	52,3	18,6	**5,6**	5,0	18,5
		S	53,2	18,8	**4,6**	5,0	18,3
		O	43,3	27,6	4,2	5,1	19,8
		OS	46,8	21,7	2,9	4,2	24,4

(c) **PI**

Cultivar	Temps (j)	Traitement	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	**7**	**C**	39,5	20,3	2,1	7,2	30,9
		S	26,1	15,8	2,2	7,4	48,5
		O	35,3	27,4	1,6	6,8	28,8
		OS	39,7	23,7	2,2	8,0	26,5
	14	**C**	27,6	**11,4**	1,4	4,9	54,6
		S	34,6	24,4	2,3	5,2	33,5
		O	31,4	13,7	3,4	7,4	44,1
		OS	32,9	20,7	1,8	5,9	38,7
IT83-D	**7**	**C**	34,7	26,4	2,9	6,1	29,9
		S	33,7	19,8	2,0	11,5	33,0
		O	35,8	23,8	2,4	7,4	30,6
		OS	31,3	27,8	3,1	10,1	27,7
	14	**C**	31,0	30,7	2,5	5,9	30,0
		S	22,6	**41,9**	2,3	7,6	25,6
		O	31,4	27,5	3,2	6,7	31,2
		OS	32,5	25,7	3,7	7,0	31,1

(d) **PE**

Cultivar	Temps (j)	Traitement	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	**7**	**C**	33,6	13,6	3,1	16,5	33,3
		S	35,7	12,6	2,2	16,8	32,7
		O	29,2	15,7	2,0	16,0	37,1
		OS	40,1	16,7	3,1	**20,3**	19,7
	14	**C**	31,9	21,6	2,9	12,0	31,6
		S	33,3	21,8	1,5	**8,6**	34,7
		O	31,0	12,5	2,4	13,8	40,2
		OS	32,6	22,9	2,9	10,1	31,5
IT83-D	**7**	**C**	29,6	19,3	3,6	15,6	31,8
		S	32,2	30,9	3,4	11,8	21,7
		O	30,1	12,9	2,1	**20,2**	34,7
		OS	30,6	16,2	2,3	13,9	37,1
	14	**C**	32,4	20,6	2,8	13,7	30,5
		S	30,4	22,9	2,6	14,0	30,1
		O	34,8	23,8	2,3	10,6	28,5
		OS	34,5	17,3	2,4	12,0	33,9

(e) **PA**

Cultivar	Temps (j)	Traitement	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	**7**	**C**	33,8	15,1	2,1	12,3	36,7
		S	39,1	19,4	1,0	10,2	30,3
		O	30,4	14,8	1,8	13,5	39,4
		OS	30,9	13,4	2,0	16,4	37,3
	14	**C**	23,6	13,3	2,6	11,7	48,8
		S	20,7	12,0	1,8	12,3	53,3
		O	23,5	13,3	2,3	12,2	48,7
		OS	21,0	23,2	2,4	10,0	43,4
IT83-D	**7**	**C**	34,4	25,6	2,8	11,0	26,2
		S	32,2	24,2	2,9	11,1	29,7
		O	30,7	8,1	1,5	15,2	44,5
		OS	30,6	11,2	1,7	12,4	44,1
	14	**C**	29,4	20,9	3,4	12,0	34,4
		S	26,1	14,9	2,0	14,5	42,5
		O	28,3	19,7	2,6	10,9	38,5
		OS	29,5	28,5	3,0	7,5	31,5

(f) **DPG**

Cultivar	Temps (j)	Traitement	%16:0	%18:0	%18:1	%18:2	%18:3
EPACE-1	**7**	**C**	29,7	32,0	5,3	13,0	20,0
		S	32,1	28,7	4,1	12,8	22,3
		O	27,9	33,3	3,7	12,1	23,1
		OS	28,8	36,3	4,2	11,6	19,1
	14	**C**	26,6	29,2	3,6	10,8	29,8
		S	26,2	25,4	2,3	6,6	39,5
		O	24,2	12,9	13,0	14,1	35,9
		OS	27,9	12,6	2,2	12,4	45,0
IT83-D	**7**	**C**	31,8	19,5	2,8	9,4	36,5
		S	29,3	32,6	2,9	12,6	22,5
		O	25,9	22,2	4,9	16,4	30,6
		OS	27,2	37,3	3,7	10,7	21,2
	14	**C**	26,9	29,8	5,2	14,2	23,9
		S	29,2	28,5	4,9	13,7	23,8
		O	27,6	27,6	5,6	14,4	24,8
		OS	31,8	34,4	5,7	10,7	17,4

11. Identification du gène de Vigna unguiculata codant pour une cardiolipine synthase

L'ADNc complet codant putativement la cardiolipine synthase (CLS) de *V. unguiculata* a été amplifié en utilisant des amorces spécifiques comme sondes (voir Matériels et Méthodes). L'analyse manuelle des électrophorégrammes du séquençage a montré que l'ADNc séquencé présente 981 pb, qui correspond à la phase ouverte de lecture (ou ORF pour *open reading frame*) codant un polypeptide de 326 aa (Figure 25).

La comparaison de la séquence en acides aminés déduite de *VuCLS* a indiqué des niveaux d'identité de 93,52% avec la CLS de *Phaseolus vulgaris*, 87,7% avec la CLS de *Glycine max* et 83,74% avec la CLS de *Cajanus cajan*. L'alignement réalisé entre les séquences de CLS de ces espèces montre les régions-consensus identifiées (Figure 26). Les régions N-terminal (MVLFRKFL) et C-terminal (VVSNSV) du polypeptide sont assez conservées chez les plantes de l'ordre Fabales (*Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* et *Cajanus cajan*). Ces niveaux d'identité et d'homologie avec des séquences connues permettent d'affirmer avec une quasi-certitude que cette séquence code bien pour la cardiolipine synthase chez *Vigna unguiculata*.

L’identification de la séquence de l’ADNc complet et la comparaison avec des séquences connues ont permis de choisir un couple d’amorces spécifiques pour le gène de la cardiolipine synthase afin d’étudier son expression en conditions de sécheresse et d’ozone chez *Vigna unguiculata* ainsi que de faire une étude phylogénétique entre des espèces végétales.

L'arbre phylogénétique construit à l'aide des outils de bioinformatique, en comparant les séquences d’acides aminés chez les plantes de l'ordre Fabales, *Arabidopsis thaliana* (ordre Brassicales) et *Oryza sativa* (ordre Cyperales), représente les relations de parentés entre les espèces (Figure 27). Il montre que la séquence de la CLS chez *Vigna unguiculata* est plus proche de *Phaseolus vulgaris*, suivie par *Vigna angularis*, *Glycine max* et *Cajanus cajan*. Les séquences de la CLS chez *Lupinus angustifolius* et *Arachis hypogaea* sont très proches entre elles, ainsi que les séquences chez *Cicer arietinum*, *Medicago truncatula* et *Trifolium pratense*. En outre, la CLS chez *Arabidopsis thaliana*, étant une dicotylédone, est plus proche de la CLS chez les espèces de l’ordre Fabales, aussi dicotylédones, que chez *Oryza sativa*, une monocotylédone.

```
ATG GTT CTG TTC CGC AAG TTC CTC AGA GCA ATA CTC GCC GAC AAC ACC CAA GCC  54
 M   V   L   F   R   K   F   L   R   A   I   L   A   D   N   T   Q   A   18
CGA GCC AAA GCC CGA ACC TTC CTC ACC TCA ATA TAC GCA TTC CCC TGG TAC GCG 108
 R   A   K   A   R   T   F   L   T   S   I   Y   A   F   P   W   Y   A   36
CCT CAC CAC AAC AAC CGC CAC TCC CGC TCC CCA ACC AAT AAC AGA TTC CTC TCT 162
 P   H   H   N   N   R   H   S   R   S   P   T   N   N   R   F   L   S   54
CCC GGC CCA GGC CCT GGC CCA GGC CCA GGC CCT CTC TTC CTC TCT CGC CCC CCA 216
 P   G   P   G   P   G   P   G   P   G   P   L   F   L   S   R   P   P   72
TGG AAA CTC TCT CAA TCC GCC ACC CCT CTC TAT TTG CAC GAA AAC GCC GTC GTT 270
 W   K   L   S   Q   S   A   T   P   L   Y   L   H   E   N   A   V   V   90
TTC CCC AAG GTC CAC CCC TTC AAT TTG CTT CGC TCC ACT CCT CCT CTC CCT CTC 324
 F   P   K   V   H   P   F   N   L   L   R   S   T   P   P   L   P   L  108
CGC TTC CCT GAT CCG GCT CCC TCC ATT TCC ACC AAC CCT TCT CTT TTC CAC AGC 378
 R   F   P   D   P   A   P   S   I   S   T   N   P   S   L   F   H   S  126
TTC GTC AAT CTC CCC AAT TTC ATA TCC TTC TCC CGA TTA CTT TCC GGT CCT CTT 432
 F   V   N   L   P   N   F   I   S   F   S   R   L   L   S   G   P   L  144
CTC GCA TGG ATG ATC TCC AAC GAG TTC TAT ACT CCA GCA ATT GTA GGG TTG GCA 486
 L   A   W   M   I   S   N   E   F   Y   T   P   A   I   V   G   L   A  162
CTC TCT GGG GCC ACT GAT TGG CTG GAT GGA TAC GTG GCT CGG AAG ATG AAG ATA 540
 L   S   G   A   T   D   W   L   D   G   Y   V   A   R   K   M   K   I  180
GAT TCC GTA GTG GGT TCC TAC CTT GAT CCC CTT GCT GAC AAG GTT CTT ATT GGT 594
 D   S   V   V   G   S   Y   L   D   P   L   A   D   K   V   L   I   G  198
TGC GTT GCT CTT GCC ATG GTG CAT AAA GAT CTA CTG CAT CCT GGG GTT GTT AGT 648
 C   V   A   L   A   M   V   H   K   D   L   L   H   P   G   V   V   S  216
CTT GTT GTG TTT CGG GAC GTC TTC CTT GTT GGG GGT GCA GTA TTT CTA AGA GCA 702
 L   V   V   F   R   D   V   F   L   V   G   G   A   V   F   L   R   A  234
AAT AGC TTG GGT TGG AAG TGG AAA AGC TGG TTT GAT TTT TTT AAC CTT GAT GGA 756
 N   S   L   G   W   K   W   K   S   W   F   D   F   F   N   L   D   G  252
```

```
ACC GCC CGC CAA AAG GTT GAA CCA CTC CTT CTA AGC AAG GTG AAT ACA GTA TTC 810
 T   A   R   Q   K   V   E   P   L   L   L   S   K   V   N   T   V   F  270
CAA TTA GCA CTA GTT GCT GCT GCT CTT CTT CAA CCA GAG TTT GGA ACA CAG GAA 864
 Q   L   A   L   V   A   A   A   L   L   Q   P   E   F   G   T   Q   E  288
ACT CAA CCA TAT ATT ACT TAT TTG AGC TAT TTA GTG GCT TCA ACA ACA GTG GCA 918
 T   Q   P   Y   I   T   Y   L   S   Y   L   V   A   S   T   T   V   A  306
ACT ACT GCA GCA TAT GGA GCA CAA TAC TTT AGG AGA TTT ACA GTA GTA TCA AAC 972
  T   T   A   A   Y   G   A   Q   Y   F   R   R   F   T   V   V   S   N 324
TCG GTC TAG                                                            981
 S   V   -                                                             326
```

Figure 25 : Séquences nucléotidique (en noir) et en aminoacides (en bleu) déduite de l' ADNc de *VuCLS* qui code la cardiolipin synthase chez *V.unguiculata*.

```
VuCLS          MVLFRKFLRAILADNTQARAKARTFLTSIY---AFPWYAPHHN--NRHSRSP-TNNRFLS 54
PvCSL          MVLFRKFLKAILADHTQAQTKARTFLTSIS---AFPWYTPHHS--HRLCRSP-TNNRFLS 54
GmCSL          MVLFRKFLKQILVDNTQTKTKARTFFTSTSTATAFPWCAPHHN--NRLFRS--------- 49
CcCSL          MVLFRKFLKAILRE--KSKGRSRTFLTSTT---AFPWYAPHLNNYNRLFRSPPSNHRLLS 55
               ********: ** :  ::: ::***:**     **** :** .  :*  **

VuCLS          PGPGPG----PGPGPLFLSRPPWKLSQSATPLYLHENAVVFPKV-HPFNLLRSTPP-LPL 108
PvCSL          PGPGPG----PGP--LFLSRPPWKLSQSATPLYLHENAVVFPKV-HSFDLLRSTPP-LPL 106
GmCSL          PGPGPG----PGP--LFLARPPWKLSQSATPLYSHGN---------AFNLLRST---APL 91
CcCSL          PGPGPGPVPVPGPGPLFLTWPPWKLSQSATPLYLHRNAVVFPKVLHPFNLLRSTTVTPPL 115
               ******    ***  ***: ************* * *         .*:*****    **

VuCLS          RFPDPAPSISTNPSLFHSFVNLPNFISFSRLLSGPLLAWMISNEFYTPAIVGLALSGATD 168
PvCSL          RFPDPVPSISTNPSLFHTFVNLPNFISFSRLLSGPLLAWMISNELYTPAIVGLALSGATD 166
GmCSL          QFPDPVPSHSNKPSIFHSFVNLPNFISFTRLLSGPLLAWMISNEFYTSAMVGLALSGATD 151
CcCSL          RFPDPLPSNSNNSPIFHSFVNLPNFISFSRLLSGPLIAWIISNDFYTSAMVGLAISGATD 175
               :**** ** *.:..:**:**********:*******:**:***::**.*:****:*****

VuCLS          WLDGYVARKMKIDSVVGSYLDPLADKVLIGCVALAMVHKDLLHPGVVSLVVFRDVFLVGG 228
PvCSL          WLDGHVARKMKIDSVVGSYLDPLADKVLIGCVALAMVHKDLLHPGLVSLVVFRDVFLVGG 226
GmCSL          WLDGYVARKMKIDSVVGSYLDPLADKVLIGCVALAMVHRDLLHPGLVSLVVFRDVFLVGG 211
CcCSL          WLDGYVARKMKIDSVVGSYLDPLADKVLIGCVALAMVHKDLLHPGLVCLVVLRDVFLVGG 235
               ****:**********************************:******:*.***:********

VuCLS          AVFLRANSLGWKWKSWFDFFNLDGTARQKVEPLLLSKVNTVFQLALVAAALLQPEFGTQE 288
PvCSL          AVFLRANSLGWKWKSWFVFFNLDGTARQKVEPLLLSKVNTVFQLALVAAALLQPEFGTTE 286
GmCSL          AVFLRANSLGWKWESWFDFFNLDGTCRQKVEPLFLSKVNTVFQLALVAAALLQPEFGTQE 271
CcCSL          AVFVRANSLGWKWKSWIDFFNLDGTCRQKVEPLFLSKVNTVFQLVLVAAALLQPEFGTPE 295
               ***:*********:**: *******.*******:**********.************* *

VuCLS          TQPYITYLSYLVASTTVATTAAYGAQYFRRFTVVSNSV 326
PvCSL          TQPYITYMSYLVASTTVATTAAYGAQYFRRFAVVSNSV 324
GmCSL          TQLYVTYLSYLVASTTVASTAAYGAQYFRRLAVVSNSV 309
CcCSL          TKSYITYLSYLVASTTVASTAAYGAQYFRRSVVVSNSV 333
               *: *:**:**********:*********** .******
```

Figure 26 : Alignement de la cardiolipine synthase (CLS) de *Vigna unguiculata* (Vu) et d'autres représentants de l'ordre Fabales : *Phaseolus vulgaris* (Pv), *Glycine max* (Gm) et *Cajanus cajan* (Cc). En jaune sont représentées les séquences conservées de 8 acides aminés (MVLFRKFL) dans la région N-terminal de 6 acides aminés (VVSNSV) dans la région C-terminal de la protéine.

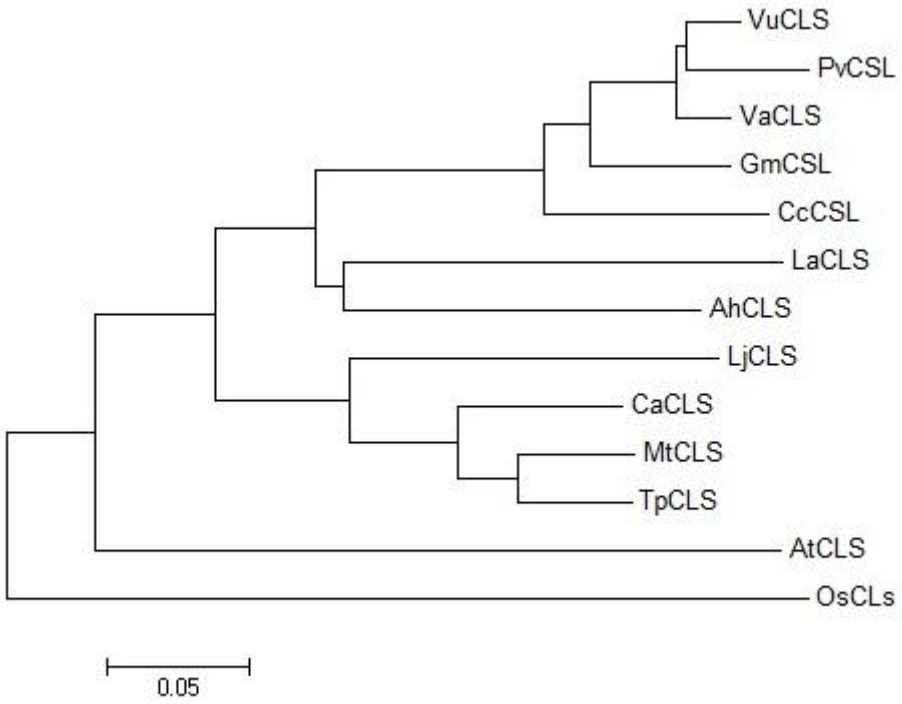


Figure 27 : Arbre phylogénétique des séquences en acides aminés de la cardiolipine synthase (CLS) chez une espèce représentative des dicotylédones (*At* - *Arabdopsis thaliana*), une espèce représentative des monocotylédones (*Os* - *Oryza sativa*) et des espèces représentatives de l'ordre Fabales (Ah - *Arachis hypogaea*, *Cc* - *Cajanus cajan*, Ca - *Cicer arietinum*, Gm - *Glycine max*, Lj - *Lotus japonus*, La - *Lupinus angustifolius*, Mt - *Medicago truncatula*, Pv - *Phaseolus vulgaris*, Tp - *Trifolium pratense*, Va - *Vigna angularis* et Vu - *Vigna unguiculata*).

12. Expression des gènes codants des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides membranaires dans les feuilles de niébé

Des changements dans les niveaux de transcrits codant pour un certain nombre de protéines des voies de biosynthèse et de dégradation des lipides membranaires ont été analysés à l'aide de la PCR quantitative en temps réel (Figure 28). Les gènes codant pour deux protéines de la voie de biosynthèse des galactolipides (MGDG synthase, E.C. 2.4.1.46 : *VuMGD1* et *VuMGD2*; DGDG synthase, E.C. 2.4.1.241 : *VuDGD1* et *VuDGD2*), deux désaturases chloroplastiques d'acides gras ω-3 (E.C. 1.14.19.3, *VuFAD7* et *VuFAD8*), deux lipases (phospholipase D type α, E.C. 3.1.4.4 : *VuPLD1*; *patatin-like* lipide acyl -hydrolase, E.C. 3.1.1.26 : *VuPAT1*) et une protéine de la voie de biosynthèse de la cardiolipine mitochondriale (cardiolipine synthase, E.C. 2.7.8.- : *VuCLS*) ont été étudiés. Les valeurs obtenues pour les gènes cibles ont été normalisées par rapport à l'expression du gène de référence *VuEF1-α* (facteur d'élongation).

Le niveau d'expression des gènes analysés chez les feuilles des contrôles des deux cultivars était plus élevé à 14 jours qu'à 7 jours, en particulier celui de *VuDGD1*, *VuFAD8* et, dans une moindre mesure, de *VuMGD2* (Figure 28).

Chez EPACE-1, les traitements sécheresse seule et combiné à l'ozone, après 7 et 14 jours, ont provoqué une diminution significative de l'expression des gènes *VuMGD1* (d'environ 30% à 7 jours et 65% à 14 jours), *VuMGD2* (d'environ 75% à 7 jours et 90% à 14 jours) et *VuFAD8* (d'environ 60% à 80% à 7 jours et 90% à 14 jours), ainsi qu'une tendance à la diminution de l'expression de *VuDGD1* (d'environ 85%), *VuDGD2* (d'environ 30% et 70%), *VuFAD7* (d'environ 70% et 80%) et *VuPAT1* (d'environ 40% et 70%) après 14 jours, quand comparés au contrôle (Figure 28a, b). Différemment, après 7 et 14 jours, ces traitements ont induit une augmentation de l'expression de *VuPLD1* (de 90% et 225% à 7 jours et 1000% et 650% à 14 jours) comparée au contrôle (Figure 28a, b). Le traitement à l'ozone seul a causé une diminution significative d'environ 20% de l'expression de *VuMGD1* après 7 jours (Figure 28a) et a réprimé l'expression de *VuPAT1* d'environ 40%, après 14 jours, comparé au contrôle (Figure 28b).

Chez IT83-D, les traitements sécheresse seule et combiné à l'ozone ont aussi provoqué une réduction de l'expression de la majorité des gènes étudiés (Figure 28c, d). Une diminution significative a été observée pour les gènes *VuMGD2* après 7 jours (d'environ 70%) et *VuDGD1* après 7 jours (d'environ 55%) et 14 jours (d'environ 90%), comparée au contrôle. Le gène

VuFAD8 a montré une tendance à la diminution d'environ 55% à 7 jours et d'environ 90% à 14 jours (Figure 28c, d). L'expression de *VuMGD1*, *VuDGD2* et *VuFAD7* a montré une tendance à réduire environ 70% et *VuPAT1* environ 90%, comparée au contrôle, après 14 jours (Figure 28d). Cependant, l'expression du gène impliqué dans la dégradation des phospholipides, *VuPLD1*, a été surégulée par ces traitements : d'environ 260% et 480% à 7 jours et d'environ 75% et 650% à 14 jours, comparée au contrôle (Figure 28c, d). Le traitement à l'ozone a stimulé l'expression des gènes de biosynthèse *VuDGD1* (d'environ 70%), *VuDGD2* (d'environ 2700%), *VuCLS* (d'environ 190%) et *VuFAD8* (d'environ 280%) et du gène de dégradation *VuPLD1* (d'environ 3100%), à 14 jours, comparé au contrôle (Figure 28d). Cependant, à la même période de traitement, l'expression de *VuPAT1* a montré une tendance à la réduction d'environ 95%, quand comparée au contrôle (Figure 28d).

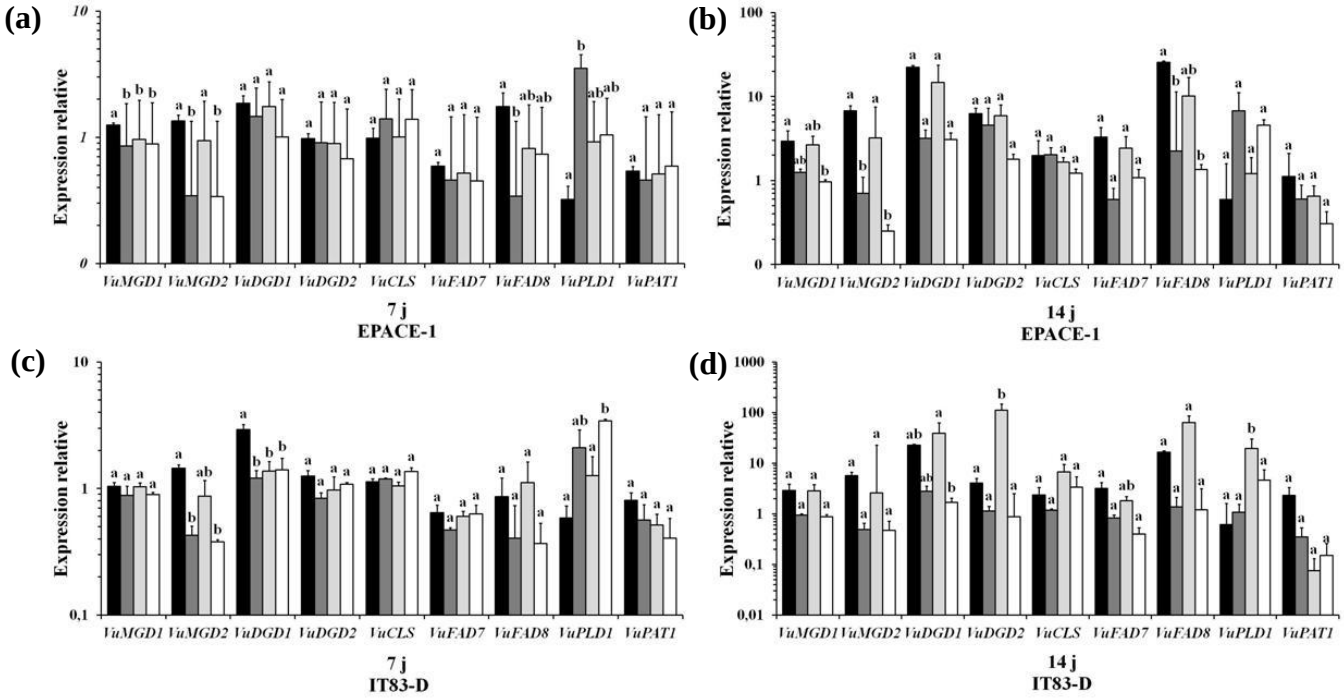


Figure 28 : Expression relative (en Log) de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans les feuilles de plantes d'EPACE-1 **(a,b)** et d'IT83-D **(c,d)** soumises aux traitements suivants: contrôle (C, barres en noir), sécheresse (S, barres en gris foncé), ozone (O, barres en gris clair), ozone + sécheresse (OS, barres en blanc). Les mesures ont été effectuées 7 et 14 jours après le début des contraintes. Les moyennes ± SEM sont indiquées (n = 3). Chaque résultat est la moyenne de deux répétitions techniques. L'expression de gènes cibles a été étalonnée par rapport à l'expression du gène de référence *VuEF-1α*. Les lettres indiquent les sous-ensembles homogènes à chaque point de temps pour un cultivar donné (ANOVA à sens unique et test post-hoc de Tukey, α = 0,05). *VuMGD1*, monogalactosyl diacylglycérol synthase type 1; *VuMGD2*, monogalactosyl diacylglycérol synthase type 2; *VuDGD1*, digalactosyle diacylglycérol synthase type 1; *VuDGD2*, digalactosyle diacylglycérol synthase type 2; *VuCLS*, cardiolipine synthase ; *VuFAD7*, désaturase d'acides gras ω-3 type 7; *VuFAD8*, désaturase d'acides gras ω-3 type 8; *VuPLD1*, phospholipase D type α; *VuPAT1*, *patatin-like* lipide acyl-hydrolase; *VuEF1-α*, facteur d'élongation de la traduction type 1 alpha.

Discussion

Pour mieux comprendre les effets de la sécheresse, de l'ozone et de la combinaison de ces contraintes dans la biosynthèse et dégradation des lipides membranaires de feuilles, galactolipides et phospholipides, nous avons analysé leur teneur et composition en acides gras et nous avons étudié l'expression des gènes codant les enzymes-clés des voies de leur métabolisme. Dans le but de trouver des marqueurs de tolérance à ces contraintes, nous avons travaillé sur deux cultivars de *Vigna unguiculata*, un tolérant et un autre susceptible à la sécheresse. Des résultats importants en ce qui concerne le métabolisme des lipides et les réponses physiologiques des plantes ont été obtenus en comparant les deux cultivars ainsi qu'en comparant les différentes contraintes appliquées. Ces résultats sont discutés ci-dessous.

1. Réponses physiologiques et moléculaires à la sécheresse

Chez les deux cultivars de niébé, EPACE-1 et IT83-D, la sécheresse a provoqué une tôt mais progressive fermeture des stomates (Figure 18). Comme décrit dans une étude précédente (Cruz de Carvalho, Laffray et Louguet, 1998), les deux cultivars ont montré une stratégie d'évitement de la sécheresse par le tôt règlement de l'ouverture des stomates, mais aussi une capacité d'ajustement des stomates car les plantes ont maintenu leurs stomates partiellement ouverts lorsque le stress hydrique a augmenté. Par conséquent, les deux cultivars ont été capables de limiter la perte d'eau et de maintenir leur capacité photosynthétique à un niveau élevé, comme le montrent les réductions modérées sur la TRE et sur le rendement quantique du PSII, respectivement (Figues 2 et 3b). Néanmoins, la régulation stomatique induite par la sécheresse a limité les échanges gazeux et l'assimilation de CO_2, qui a arrêté la production de biomasse aérienne après la première semaine de traitement (Figure 15). Lors d'un stress hydrique, la baisse du taux de fixation du CO_2 est censée dépendre d'une inhibition directe de la photosynthèse (un composant non-stomatique) et d'une fermeture des stomates (le composant stomatique) (Cruz de Carvalho, Laffray et Louguet, 1998).

Malgré cette forte restriction sur la croissance des plantes, les résultats indiquent que les deux cultivars ont été capables de résister à la sécheresse au niveau cellulaire. Tout d'abord, les feuilles des plantes soumises à la sécheresse n'ont pas présenté de symptômes visibles d'injuries ou d'accumulation de H_2O_2 (Figure 19). Deuxièmement, la teneur et la composition des lipides de membrane n'ont pas été modifiées dans les tissus des feuilles de plantes soumises au traitement sécheresse, sauf pour une tendance à l'augmentation du contenu de DPG (ou cardiolipine) (Figures 6, 7 et 10 ; Tableaux 4, 5 et 6). Le fait que (i) les gènes liés à la synthèse des

galactolipides et à la désaturation ont été sous-exprimés en réponse à la sécheresse tandis que le contenu des galactolipides et la composition en acides gras n'ont pas été modifiés et (ii) l'activité photosynthétique (Φ_{PSII}) a été réduite par le traitement sécheresse sans symptômes de lésions foliaires tandis que la teneur en chlorophylle et le rendement quantique maximal du PSII (F_v/F_m) sont restés inchangés, suggère que les deux cultivars ont répondu à la privation d'eau en ajustant convenablement leur activité métabolique.

Contrairement aux résultats des études précédentes (Cruz de Carvalho, Laffray et Louguet, 1998 ; Vasquez-Tello et al., 1990), IT83-D ne semble pas plus sensible au stress hydrique qu'EPACE-1. Il est probable que, dans nos conditions expérimentales, la gravité de la sécheresse n'a pas été suffisante pour révéler les différences de tolérance à la sécheresse entre les deux cultivars. Conformément à cela, quelques éléments sur les réponses du niébé à une sécheresse sévère, tels que la diminution de la teneur des lipides de membrane de feuilles (Monteiro de Paula et al., 1990 ; Torres-Franklin et al., 2007) et l'induction de l'expression de *VuPAT1* (Matos et. al, 2001), n'ont pas été observées dans le présent travail. Les deux cultivars ont maintenu le niveau d'insaturation d'acides gras des lipides membranaires sous stress hydrique (Tableaux 4, 5 et 6), même si *VuFAD7* et *VuFAD8* ont été réprimés (Figure 28), ce qui pourrait indiquer une capacité d'acclimatation au stress (Upchurch, 2008). En outre, la sécheresse a stimulé l'expression de *VuPLD1* chez les deux cultivars (Figure 28). La surexpression de cette PLD type α au niveau transcriptionnel même par un déficit hydrique modéré a été observée chez des feuilles de niébé (El-Maarouf et al., 1999). Le fait que cela s'est produit ici sans les changements attendus dans les phospholipides membranaires suggère un rôle pour *VuPLD1* dans la signalisation plutôt que dans la dégradation de la membrane. En conséquence, PLDα1, la plus abondante phospholipase D chez les plantes, a été montrée être impliquée dans la réponse à la sécheresse légère à travers la promotion de l'effet de l'ABA sur la fermeture des stomates, tandis que la dégradation de la membrane induite par la PLD a eu lieu sous un stress sévère et prolongé (Hong, Zheng et Wang, 2008). La PLDα1 sert de médiateur dans la signalisation de l'ABA en partie par l'intermédiaire de son produit lipidique, l'acide phosphatidique (PA), qui inhibe un régulateur négatif de la fermeture stomatique induite par l'ABA (Zhang et al., 2005). Ici, le contenu de PA a effectivement augmenté, mais cela s'est produit en fin de traitement et n'a pas été bien corrélé à l'expression de *VuPLD1* (Figures 10 et 14). Cet écart pourrait résulter de la présence de quantités de PA distinctes, car le PA est également produit *de novo* comme un précurseur de la synthèse des phospholipides (Testerink et Munnik, 2005).

2. Réponses physiologiques et moléculaires à l'ozone

Le traitement à l'ozone, en contraste avec la sécheresse, a eu un impact limité sur la photosynthèse et la production de biomasse, mais des effets plus importants aux niveaux cellulaire et moléculaire. Certains de ces effets ont été trouvés chez les deux cultivars de niébé.

Tout d'abord, l'exposition à l'ozone a provoqué des symptômes de lésions foliaires et d'accumulation d'H_2O_2 (Figure 19). La mort cellulaire induite par l'ozone a été rapportée chez plusieurs espèces de plantes et est associée à l'accumulation d'EROs (Langebartels et al., 2002). Deuxièmement, le traitement à l'ozone a induit des diminutions dans les galactolipides plastidiaux, MGDG et DGDG, chez les deux cultivars (Figure 21). Des réductions du contenu des galactolipides ont également été signalées chez les feuilles de plantes d'épinards (Sakaki et al., 1990) et de haricot mange-tout (Whitaker, Lee et Rowland, 1990) soumises à l'exposition aiguë à l'ozone, et chez les plantes de pois et de blé soumises à des concentrations modérées d'ozone (Carlsson et al., 1994). Des études sur les effets d'exposition aiguë ont montré que la diminution de galactolipides plastidiaux n'a pas entraîné des dommages oxydatifs directs de l'ozone, mais plutôt des effets secondaires sur le métabolisme lipidique (Fong et Heath, 1981 ; Nouchi et Toyama, 1988). Chez les feuilles d'épinards traitées à l'ozone, la diminution de la teneur de MGDG a été concurrente d'une forte augmentation du taux de triacylglycérols (TAG), synthétisés à partir des produits de dégradation du MGDG (Sakaki, Kondo et Yamada, 1990). Bien que les TAG n'ont pas été mesurés directement dans le présent travail, le rapport des acides gras totaux (y compris les acides gras contenus dans les TAG) aux acides gras membranaires a été utilisé pour estimer la proportion de lipides neutres, principalement de di- et triacylglycérols, par rapport à celle des lipides polaires (principalement de galactolipides). Ce rapport a augmenté en réponse à l'ozone (Figure 23), qui appuie l'hypothèse que l'ozone a induit la conversion de MGDG à TAG chez les feuilles de niébé. Les voies putatives pour cette conversion dans les feuilles traitées à l'ozone impliquent un certain nombre d'enzymes, y compris une ou plusieurs enzymes désacylantes capables d'hydrolyser les galactolipides, probablement les lipides acyle-hydrolases (LAH) (Matos et Pham-Thi, 2009). L'expression de *VuPAT1*, une LAH purifiée inductible par la sécheresse à partir de feuilles de niébé avec une spécificité de substrat élevée pour galactolipides (Matos et al., 2001), était très faible en réponse à l'ozone dans cette étude (Figure 28). Par conséquent, l'enzyme (s) désacylante (s) responsable (s) de la dégradation des galactolipides chez les feuilles de niébé traitées à l'ozone reste à identifier.

Une troisième réponse à l'ozone partagée par les deux cultivars de niébé a été une fermeture stomatique partielle. Les méta-analyses des résultats publiés sur les arbres (Wittig et al., 2009) ou sur le soja (Morgan, Ainsworth et Long, 2003) indiquent qu'une diminution modérée de g_s est une réponse générale des plantes à l'ozone élevé. La régulation de la conductance stomatique joue un rôle important pour limiter les flux entrants d'ozone et ainsi le stress oxydatif induit par celui-ci (Paoletti et Grulke, 2010). Dans cette étude, le traitement à l'ozone n'a eu aucun effet sur Φ_{PSII} (Figure 17b), qui exclut une régulation négative de g_s en raison des taux de photosynthèse réduits. Plutôt, ce qui suggère que l'ozone a affecté directement les cellules de garde (McAinsh et al., 2002). Par contraste avec la réponse des stomates à la sécheresse, la fermeture des stomates induite par l'ozone n'est pas corrélée à l'induction de l'expression de *VuPLD1* (Figures 4 et 14), ce qui suggère que l'activité de la PLD n'a pas été impliquée dans la réponse des stomates à l'ozone.

3. Différences inter-variétés de sensibilité à l'ozone

La plupart des effets de l'ozone observés sur les feuilles de niébé ont été plus prononcés chez le cultivar IT83-D que chez le cultivar EPACE-1, y compris l'étendue de la lésion foliaire et la diminution de la teneur en galactolipides. Chez IT83-D, la charge oxydante dans les tissus foliaires aurait pu être plus forte que chez EPACE-1, en raison d'une POD_0 supérieure (+21%) (Tableau 3). En outre, IT83-D a montré des réponses à l'ozone qui ne figuraient pas chez EPACE-1. Le plus frappant, chez IT83-D, la diminution de la teneur en galactolipides a été corrélée à une augmentation importante du rapport DGDG:MGDG, comme observé chez les cultivars de haricots exposés à l'ozone aiguë (Nouchi et Toyama, 1988 ; Whitaker, Lee et Rowland, 1990). La plus grande diminution relative en MGDG est conforme à son extrême sensibilité aux processus de dégradation activés par les stress environnementaux, tels que rapporté chez *Arabidopsis* (Gigon et al., 2004) et niébé (Torres-Franklin et al., 2007) traités à la sécheresse. En outre, le traitement à l'ozone a réduit l'acide gras 18:3 dans MGDG chez IT83-D (Tableau 5a), que l'on trouve également chez les feuilles de plantes de pois (Carlsson et al., 1994) et de blé (Sandelius et al., 1995) exposées à l'ozone modéré. Une LAH purifiée à partir de feuilles de niébé a eu la spécificité de substrat la plus haute pour (18:3/18:3)-MGDG (Sahsah et al., 1994) et les activités de LAH dans des extraits de feuilles de niébé ont été montrées réduire sélectivement le contenu de 18:3 dans MGDG (Sahsah et al., 1998). Pris ensemble, ces résultats

suggèrent que la réduction de la teneur en 18:3 dans MGDG reflète la dégradation préférentielle de MGDG par les LAHs lors de l'exposition à l'ozone chez le cultivar de niébé sensible IT83-D.

Il a été démontré que des contraintes telles que les blessures, la baisse de température et la sécheresse augmentent l'expression de la désaturase plastidial d'acide gras ω - 3 *FAD8* (Nishiuchi et Iba, 1998 ; Torres-Franklin et al., 2009). En outre, la surexpression de *FAD8* a augmenté le contenu de 18:3 et la tolérance à la salinité et à la sécheresse chez des plantes de tabac transgéniques (Zhang et al., 2005). Dans le présent travail, la stimulation de l'expression de *VuFAD8* trouvée chez IT83-D (Figure 28d) aurait atténuée la perte induite par l'ozone de 18:3 dans les lipides membranaires. Cependant, il n'a pas été efficace dans le maintien de taux d'insaturation du MGDG (Tableau 5a). A côté de leur rôle dans l'ajustement de l'insaturation des acides gras, les FADs ω-3 semblent être impliqués dans la régulation des réponses de défense des plantes par la production d'acides gras triénoïques qui servent de précurseurs pour la synthèse des oxylipines, tels que l'acide jasmonique (JA) (Yaeno, Matsuda et Iba, 2004). Le JA s'accumule lors de l'exposition à l'ozone et agit dans le confinement de la lésion pendant le processus de mort cellulaire induite par l'ozone (Kangasjärvi, Jaspers et Kollist, 2005). Dès que *VuFAD7* a été réprimé par le traitement à l'ozone (Figure 28d), *VuFAD8* pourrait avoir un rôle spécifique dans l'induction de réponses de défense à l'ozone par le JA chez les feuilles du cultivar sensible de niébé.

4. Participation de DGD2 et de PLDα dans le remodelage de la membrane sous ozone chez IT83-D

Chez EPACE-1, l'expression des gènes associés à la synthèse des galactolipides est restée inchangée ou a été réduite par le traitement à l'ozone (Figure 28a, b), qui est en accord avec la diminution induite par l'ozone dans le contenu de MGDG et de DGDG (Figure 21). Une tendance similaire a été observée chez IT83-D pour MGDG et les gènes associés à la biosynthèse (Figures 7a et 14c, d). Cependant, le rapport DGDG:MGDG a augmenté en réponse à l'ozone chez ce cultivar et cela a coïncidé avec une forte surexpression de *VuDGD2* et, dans une moindre mesure, de *VuDGD1* (Figures 8 et 14c, d). Les avantages du remplacement partiel de MGDG par DGDG dans les membranes de thylacoïdes sont que (i) DGDG est moins sensible à la dégradation par LAHs (Sahsah et al., 1998) et (ii) DGDG est un lipide formateur d'une bicouche tandis que MGDG a une tendance à former des structures non lamellaires (Webb et Green, 1991). Sous le traitement à l'ozone, DGDG pourrait donc aider à maintenir les membranes des thylakoïdes dans

un état physique compatible avec le fonctionnement normal des protéines membranaires (Lee, 2000). Sinon, DGDG pourrait remplacer les phospholipides dans les membranes extraplastidiales comme observé dans des conditions de limitation de phosphate (Härtel, Dormann et Benning, 2001). L'accumulation de lipides non-phosphorés au cours de la privation de phosphate conduit à la réduction de phosphoglycérolipides de 90 à 50%. Des études indiquent que les quantités de DGDG augmentent fortement pendant la carence de phosphate. Lorsque le phosphate est limité, les phospholipides membranaires des plantes sont réduits et, au moins en partie, remplacés par des glycolipides. Cette modification de la composition lipidique n'est pas limitée aux plastides, parce que pendant la privation de phosphate, DGDG s'est révélé s'accumuler dans les membranes extraplastidiales (Härtel et al., 2000).

En accordance, les phospholipides principaux (PC, PG, PI et PE) ont diminué chez IT83-D en réponse à l'ozone (Figure 24b). Cependant, le fait que les phospholipides ont diminué tandis que ni le rapport DGDG:MGDG ni l'expression de la *DGDG synthase* ont été modifiés en réponse au traitement ozone+sécheresse (Figures 8 et 14d) suggère que DGDG est principalement impliqué dans le maintien de la structure de la membrane des thylakoïdes en réponse à l'ozone. En outre, DGDG pourrait être impliqué dans le remodelage des membranes extraplastidiales lorsque la dose d'ozone est supérieure à un certain seuil, c'est-à-dire, dans le traitement ozone, pour lequel l'absorption stomatique d'ozone était de 50% plus élevée que dans le traitement ozone+sécheresse. Plusieurs éléments appuient cette hypothèse. Tout d'abord, une forte surexpression de *VuDGD2* a été trouvée chez IT83-D en réponse à l'ozone seul, mais pas pour le traitement ozone+sécheresse (Figure 28d). Considérant que *DGD1* est responsable pour la synthèse de la majeure partie de DGDG plastidial, *DGD2* semble être impliqué dans des conditions de croissance spécifiques telles que la limitation de phosphate (Kelly et Dörmann, 2002) ou la sécheresse sévère (Torres-Franklin et al., 2007). Ensuite, la stimulation de 25 fois de l'expression de *VuDGD2* dans le traitement ozone a coïncidé avec une surexpression équivalente de *VuPLD1* qui a été associée à une diminution dans les phospholipides membranaires (Figures 14d et 10b). Dans le traitement ozone+sécheresse, une induction de 5 fois de *VuPLD1* a été trouvée avec la réduction du contenu de phospholipides, mais *VuDGD2* a été, dans ce cas, fortement réprimé (Figure 28d). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité de la PLDα pourrait jouer un double rôle sous stress d'ozone, principalement dans la dégradation des phospholipides de membrane, comme observé sous stress hydrique sévère (Hong et al., 2008) et aussi, en réponse à des doses élevées d'ozone, dans la régulation de processus de remodelage de

la membrane qui impliqueraient l'expression de *DGD2* et le remplacement des phospholipides par DGDG.

5. Rôle de la cardiolipine dans la tolérance à l'ozone chez EPACE-1

Après 14 jours de traitement, nous avons observé une réponse spécifique du cultivar EPACE-1 identifiée comme une caractéristique potentielle de la tolérance à l'ozone, à savoir, une augmentation de 110% dans les niveaux de DPG (cardiolipine) (Figure 24a). Le fait que l'exposition à l'ozone a provoqué une réduction de la teneur en galactolipides et leur conversion probable en TAG chez les feuilles de niébé suggère que les plantes ont répondu au stress en ajustant convenablement leurs teneurs en cardiolipine. Toutefois, l'augmentation du contenu de la cardiolipine ne peut pas être associée à l'expression du gène de la cardiolipine synthase (*VuCLS*), qui n'a pas été modifiée en réponse à l'ozone (Figure 28b). Ces résultats suggèrent que la cardiolipine, à côté de son rôle dans la stabilité des complexes respiratoires, peut également jouer un rôle dans les processus de remodelage de la membrane pour la tolérance des plantes de niébé à l'ozone, ce qui pourrait impliquer le replacement des galactolipides par cardiolipine.

Des études récentes ont mis en évidence l'importance de la cardiolipine ou de la cardiolipine synthase dans les réponses de plantes d'*Arabidopsis* à des contraintes (Pan, Jones et Hu, 2014 ; Pineau et al., 2013). Pineau et al. (2013) ont montré que la cardiolipine est nécessaire à la fonction mitochondriale et au bon développement de plantes d'*Arabidopsis*, en particulier dans des conditions de stress. Pour cela, ils ont caractérisé trois mutants déficients dans le gène de la cardiolipine synthase, nommés mutants *cls*. Ils ont rapporté que la germination des semis se développe seulement dans des conditions de lumière faible et que les semis ne sont pas fertiles lors de leur transfert à la terre, montrant les changements dans le transport d'électrons mitochondriale. En outre, le système antioxydant et la mort cellulaire programmée sont également exacerbés chez les mutants *cls*, indiquant une perturbation globale de la réponse au stress. Pan, Jones et Hu (2014) ont utilisé *Arabidopsis thaliana* pour examiner la distribution subcellulaire de la cardiolipine et de la cardiolipine synthase et ont analysé la perte de fonction chez les mutants *cls* pour défaut de morphogenèse mitochondriale et réponse au stress. Ils ont montré que les mutants *cls* présentent une altération significative de la croissance ainsi qu'une intégrité structurale et morphogenèse des mitochondries altérées. En outre, ils ont révélé que la cardiolipine joue également un rôle dans la réponse de la plante à la chaleur et à l'obscurité prolongée, des contraintes qui induisent la mort cellulaire programmée.

6. Atténuation par la sécheresse des effets de l'ozone à travers la réduction de son absorption stomatique

En plus de réduire la conductance stomatique, l'ozone est connu pour modifier les réponses des stomates à une variété de stimuli environnementaux (Dumont et al., 2013). En cas de sécheresse, l'ozone est pensé perturber la voie de transduction du signal induite par l'ABA pour un contrôle stomatique qui nuit à la capacité des plantes à répondre au stress hydrique (Wilkinson et Davies, 2010). Dans cette étude, le taux et l'intensité de la fermeture des stomates provoqués par le déficit hydrique n'ont pas été modifiés par l'ozone dans le traitement ozone+sécheresse (Figure 28d), ce qui suggère que l'ozone n'a pas interféré avec la réponse stomatique à la sécheresse induite par ABA/PLD chez les feuilles de niébé. D'autre part, la fermeture des stomates induite par le déficit hydrique a diminué l'absorption d'ozone chez EPACE-1 et chez IT83-D lorsque la sécheresse et l'ozone ont été appliqués en combinaison (Tableau 3). En conséquence, des effets de l'ozone observés dans le traitement ozone ont été moins prononcés dans le traitement ozone+sécheresse, y compris les blessures de la feuille, l'accumulation d'H_2O_2 et l'épuisement des galactolipides (Figures 7 et 5). En outre, certains effets de l'ozone sont introuvables dans le traitement combiné ozone+sécheresse, tels que l'augmentation spécifique à l'IT83-D du rapport DGDG:MGDG et la surexpression coordonnée de *VuDGD2*, *VuPLD1* et *VuFAD8* (Figures 8 et 14d). Enfin, plusieurs effets en commun sont observés en réponse à la sécheresse et à la combinaison ozone+sécheresse chez les deux cultivars : la réduction de la masse sèche de la partie aérienne (Figure 15), de la teneur relative en eau (Figure 16) et du rendement quantique du PSII (Figure 17b), et l'augmentation de la teneur en DPG (ou cardiolipine) (Figure 24). Prises ensemble, ces données suggèrent que la fermeture des stomates induite par la sécheresse a atténué les effets néfastes de l'ozone sur les tissus de feuilles de niébé, ce qui est cohérent avec les résultats de méta-analyses des effets de l'ozone sur les arbres (Wittig et al., 2007) et les cultures (Feng et Kobayashi, 2009). Cependant, il serait intéressant de montrer si des résultats similaires sont observés lorsque la contrainte ozone est appliquée avant la sécheresse. Cette situation, probable dans des conditions naturelles, pourrait conduire à modifier la réponse des stomates à la sécheresse et/ou la capacité antioxydante des cellules et mettre ainsi en évidence un impact éventuel de l'ozone sur la réponse des plantes à la sécheresse (Wilkinson et Davies, 2009).

Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, aucune différence n'a pu être observée entre les deux cultivars en termes de tolérance à la sécheresse. Certains des paramètres analysés ici ont été affectés par l'ozone, indépendamment de la dose ou du cultivar. Chez le cultivar tolérant (EPACE-1), ces réponses comprennent la conversion présumée des galactolipides en TAG et leur remplacement par cardiolipine, ce qui pourrait contribuer à la tolérance du cultivar à l'ozone. Chez le cultivar sensible (IT83-D), l'exposition à l'ozone a stimulé l'expression de la PLDα, une explication possible de l'altération observée dans les phospholipides membranaires. En outre, cette étude fournit la preuve que PLDα, à côté de ses rôles reconnus dans la dégradation des phospholipides et à la régulation de la réponse stomatique au déficit d'eau, pourrait aussi contribuer au remodelage de la membrane sous exposition à l'ozone grâce à des processus qui pourraient impliquer le remplacement partiel de phospholipides par DGDG. Les deux contraintes en combinaison ont conduit à des résultats similaires à ceux observés en réponse au traitement de la sécheresse seule. Cela reflète probablement la restriction sévère de l'absorption d'ozone résultant de la fermeture des stomates induite par la sécheresse. Ensemble, ces résultats soulignent le rôle important des lipides membranaires dans les processus de signalisation et des ajustements métaboliques qui se produisent chez les plantes soumises à des contraintes environnementales.

Références

A

Ahuja, I., De vos, R.C.H., Bones, A.M., Hall, R.D., 2010. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends of Plant Science* 15, p.664–674.

Ainsworth, E.A., Rogers, A., Leakey, A.D.B., 2008. Targets for crop biotechnology in a future high-CO_2 and high-O_3 World. *Plant Physiology* 147, 13–19.

Asada, K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology* 141,391-396.

Ashmore, M.R., 2005. Assessing the future global impacts of ozone on vegetation. *Plant, Cell & Environment* 28, 949–964.

Awai, K., Maréchal, E., Block, M.A., Brun, D., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., Joyard, J., 2001. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16:3 and 18:3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10960–10965.

B

Bagard, M., Le Thiec, D., Delacote, E., Hasenfratz-Sauder, M.-P., Banvoy, J., Gérard, J., Dizengremel, P., Jolivet, Y., 2008. Ozone-induced changes in photosynthesis and photorespiration of hybrid poplar in relation to the developmental stage of the leaves. *Physiologia Plantarum* 134, 559–574.

Beisson, F., Koo, A.J., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J.J., Paddock, T., Salas, J.J., Savage, L., Milcamps, A., Mhaske, V.B,. Cho, Y., Ohlrogge, J.B., 2003. *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Physiology* 132, 681-697.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. *Ottawa* 37(8), 911-917.

Block, M.A., Douce, R., Joyard, J., Rolland, N., 2007. Chloroplast envelope membranes: a dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynthesis Research* 92, 225–244.

Blokhina, O., Fagerstedt, K.V., 2010. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (5), 359-373.

Bohler, S., Sergeant, K., Jolivet, Y., Hoffmann, L., Hausman, J-F., Dizengremel, P., Renaut, J., 2013. A physiological and proteomic study of poplar leaves during ozone exposure combined with mild drought. *Proteomics* 13, 1737–1754.

Bolognese, C.P., McGraw, P., 2000. The isolation and characterization in yeast of a gene for *Arabidopsis* S-adenosylmethionine:phospho-ethanolamine N-methyltransferase. *Plant Physiology* 124, 1800-1813.

Booker, F., Muntifering, R., McGrath, M., Burkey, K., Decoteau, D., Fiscus, E., Manning, W., Krupa, S., Chappelka, A., Grantz, D., 2009. The ozone component of global change: potential effects on agricultural and horticultural plant yield, product quality and interactions with invasive species. *Journal of Integrative Plant Biology* 51, 337–351.

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

C

Calatayud, A., Barreno, E., 2001. Chlorophyll a fluorescence, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in tomato in response to ozone and benomyl. *Environmental Pollution* 115, 283–289.

Calatayud, A., Barreno, E., 2004. Response to ozone in two lettuce varieties on chlorophyll a fluorescence, photosynthetic pigments and lipid peroxidation. *Plant Physiology* Biochem. 42, 549–555.

Campos, P.S., Pham Thi, A.T., 1997. Effects of an abscisic acid pretreatment on membrane leakage and lipid composition of *Vigna unguiculata* leaf discs subjected to osmotic stress. *Plant Science* 130, 11–18.

Carlsson, A.S., Hellgren, L.I., Selldén, G., Sandelius, S., 1994. Effects of moderately enhanced levels of ozone on the acyl lipid composition of the leaves of garden pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* 91, 754-762.

Carlsson, A.S., Wallin, G., Sandelius, S., 1996. Species- and age-dependent sensitivity to ozone in young plants of pea, wheat and spinach: effects on acyl lipid and pigment content and metabolism. *Physiologia Plantarum* 98, 271-280.

Castillo, F.J., Greppin, H., 1988. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany* 28, 231–238.

Chen, L.J., Li, H.M., 1998. A mutant deficient in the plastid lipid DGD is defective in protein import into chloroplasts. *Plant Journal* 16, 33-39.

Choi, Y.H., Lee, J.K., Lee, C.H. Cho, S.H.. 2000. cDNA cloning and expression of an aminoalcoholphosphotransferase isoform in *Chinese cabbage*. *Plant Cell Physiology* 41, 1080-1084.

Citadin, C. T., Ibrahim, A.B., Aragão, F.J., 2011. Genetic engineering in cowpea (*Vigna Unguiculata*): history, status and prospects. *GM Crops* 2(3), 144–149.

Conde, A., Chaves, M.M., Gerós, H., 2011. Membrane transport, sensing and signaling in plant adaptation to environmental stress. *Plant Cell Physiology* 52, 1583–1602.

Contour-Ansel, D., Torres-Franklin, M.L., Cruz de Carvalho, M.H., D'Arcy-Lameta, A., Zuily-Fodil, Y., 2006. Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of two cDNAs, expression and enzymatic activity under progressive drought stress, desiccation and abscisic acid treatment. *Annals of Botany* 98, 1279–1287.

Cruz de Carvalho, M.H., 2008. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behavior* 3, 156–165.

Cruz de Carvalho, M.H., Laffray, D., Louguet, P., 1998. Comparison of the physiological responses of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata* cultivars when submitted to drought conditions. *Environmental and Experimental Botany* 40, 197–207.

D

D'Arcy-Lameta, A., Ferrari-Iliou, R., Contour-Ansel, D., Pham-Thi, A.-T., Zuily-Fodil, Y., 2006. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cdnas responsive to water deficit in cowpea leaves. *Annals of Botany* 97, 133–140.

Dai, A., 2011. Drought under global warming: a review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change* 2, 45–65.

Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B., 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141, 330-335.

Delhaize, E., Hebb, D.M., Richards, K.D., Lin, J.M., Ryan, P.R., Gardner, R.C., 1999. Cloning and expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) phosphatidylserine synthase cDNA. Overexpression in plants alters the composition of phospholipids. *Journal of Biological Chemistry* 274, 7082-7088.

Dewey, R.E., Wilson, R.F., Novitzky, W.P., Goode, J.H., 1994. The AAPT1 gene of soybean complements a cholinephosphotransferase-deficient mutant of yeast. *Plant Cell* 6, 1495-1507.

Dghim, A.A., Dumont, J., Hasenfratz-Sauder, M.P., Dizengremel, P., Thiec ,D.L., Jolivet Y., 2012. Capacity for NADPH regeneration in the leaves of two poplar genotypes differing in ozone sensitivity. *Physiologia Plantarum*. doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01686.x.

Didyk, N.P., Blum, O.B., 2011. Natural antioxidants of plant origin against ozone damage of sensitive crops. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 25–34.

Dizengremel, P., 2001. Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiology and Biochemistry* 39 (9), 729-742.

Dörmann, P., Balbo, I., Benning, C., 1999. *Arabidopsis* galactolipid biosynthesis and lipid trafficking mediated by DGD1. *Science* 284, 2181-2184.

Dörmann, P., Benning, C., 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends of Plant Science* 7, 112–118.

Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I., Benning C., 1995. Isolation and Characterization of an *Arabidopsis* Mutant Deficient in the Thylakoid Lipid Digalactosyl Diacylglycerol. *Plant Cell* 7, 1801-1810.

Dumont, J., Spicher, F., Montpied, P., Dizengremel, P., Jolivet, Y., Le Thiec, D., 2013. Effects of ozone on stomatal responses to environmental parameters (blue light, red light, CO_2 and vapour pressure deficit) in three *Populus deltoides* x *Populus nigra* genotypes. *Environmental Pollution* 173, 85-96.

Dutra, A.S., Teófilo, E.M., 2006. Envelhecimento acelerado para avaliar o vigor de sementes de feijão caupi. *Revista Brasileira de Sementes*. doi: 10.1590/S0101-31222007000100027.

E

El-Maarouf, H., D'Arcy-Lameta, A., s, Gareil, M., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.-T., 2001. Cloning and expression under drought of cDNA scoding for two PI-PLCs in cowpea leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 39, 167–172.

El-Maarouf, H., Zuily-Fodil, Y., Gareil, M., d' Arcy-Lameta, A., Pham-Thi, A.T., 1999. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L.Walp. differing in drought tolerance. *Plant Molecular Biology* 39, 1257–1265. doi:10.1023/A:1006165919928.

F

Fangmeier, A., Brunschön, S., Jäger, H.-J., 1994. Time course of oxidant stress biomarkers in flag leaves of wheat exposed to ozone and drought stress. *New Phytologist* 126, 63–69.

Feng, Z., Kobayashi, K., 2009. Assessing the impacts of current and future concentrations of surface ozone on crop yield with meta-analysis. *Atmospheric Environment* 43, 1510-1519.

Fery, R., 2002. Development of improved southern pea varieties for the southern United States: an update on the USDA effort. *Vegetable Association Yearbook (North Carolina Vegetable Growers Association)*, 53.

Finlayson-Pitts, B.J., Pitts, J.N., 1993. Atmospheric chemistry of tropospheric ozone formation: scientific and regulatory implications. *Air & Waste* 43, 1091–1100.

Fiscus, E.L., Booker, F.L., Burkey, K.O., 2005. Crop responses to ozone: uptake, modes of action, carbon assimilation and partitioning. *Plant, Cell & Environment* 28, 997–1011.

Fong, F., Heath, R.L.,1981. Lipid-content in the primary leaf of bean (*Phaseolus vulgaris*) after ozone fumigation. *Zeitschrift Fur Pflanzenphysiologie* 104, 109-115.

França, M.G.C., Matos, A.R., D'Arcy-Lameta, A., Passaquet, C., Lichtlé, C., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T., 2008. Cloning and characterization of drought-stimulated phosphatidic acid phosphatase genes from *Vigna unguiculata*. *Plant Physiology and Biochemistry* 46, 1093–1100.

Frentzen, M., 2004. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 270-276.

Frentzen, M., Griebau, R., 1994. Biosynthesis of cardiolipin in plant mitochondria. *Plant Physiology* 106, 1527–1532.

Froehlich, J.E., Benning, C., Dörmann, P., 2001. The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31806–31812.

G

Gigon, A., Matos, A.-R., Laffray, D., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.-T., 2004. Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia). *Annals of Botany*. 94, 345–351.

Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N., 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science* 5, Article 151. doi: 10.3389/fpls.2014.00151.

Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Zarrouk, M., 2008. Changes in lipid composition, water relations and gas exchange in leaves of two young “Chemlali” and “Chetoui” olive trees in response to water stress. *Plant Soil* 311, 121–129.

Guidi, L., Degl'Innocenti, E., Soldatini, G.F., 2002. Assimilation of CO_2, enzyme activation and photosynthetic electron transport in bean leaves, as affected by high light and ozone. *New Phytologist* 156, 377–388.

Guidi, L., Di Cagno, R., Soldatini, G.F., 2000. Screening of bean cultivars for their response to ozone as evaluated by visible symptoms and leaf chlorophyll fluorescence. *Environmental Pollution* 107, 349–355.

Guo, L., Devaiah, S.P., Narasimhan, R., Pan, X., Zhang, Y., Zhang, W. and Wang, X., 2012a. Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase Dδ to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress. *Plant Cell* 24, 2200–2212.

H

Härtel, H., Dörmann, P., Benning, C., 2000. DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids following phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10649–10654.

Härtel, H., Dörmann, P., Benning, C., 2001. Galactolipids not associated with the photosynthetic apparatus in phosphate-deprived plants. *Journal of Photochemistry and Photobiology* B 61, 46-51.

Härtel, H., Lokstein, H., Doörmann, P., Grimm, B., Benning C., 1997. Changes in the composition of the photosynthetic apparatus in the galactolipid-deficient *dgd1* mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 115, 1175-1184.

Harwood, J.L., 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochemistry & Biophysica Acta* 1301, 7–56.

Hellgren, L.I., Selldén, G., Sandelius, A.S., 2001. Effects of moderately enhanced levels of ozone on the acyl lipid composition and dynamical properties of plasma membranes isolated from garden pea (*Pisum sativum*). *Physiologia Plantarum* 111, 165–171.

Holland, M., Kinghorn, S., Emberson, L., Cinderby, S., Ashmore, M., Mills, G.E., Harmens, H., 2006. Development of a framework for probabilistic assessment of the economic losses caused by ozone damage to crops in Europe (Report). *NERC/Centre for Ecology and Hydrology*.

Hong Y., Zheng S., Wang X., 2008a. Dual functions of phospholipase D alpha1 in plant response to drought. *Molecular Plant* 1, 262-269.

Hong, Y., Devaiah, S.P., Bahn, S.C., Thamasandra, B.N., Li, M., Welti, R. and Wang, X., 2009. Phospholipase Dε and phosphatidic acid enhance *Arabidopsis* nitrogen signaling and growth. *Plant Journal*. 58, 376–387.

Hong, Y., Zhang, W., Wang, X., 2010. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, Cell & Environment* 33, 627–635.

Hong, Y.Y., Pan, X.Q., Welti, R., Wang, X.M., 2008b. Phospholipase D alpha 3 is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 803–816.

Horemans, N., Foyer, C.H., Asard, H., 2000. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends of Plant Science* 5, 263–267.

I

Inatsugi, R., Nakamura, M., Nishida, I.., 2002. Phosphatidylcholine biosynthesis at low temperature: differential expression of CTP:phosphorylcholine cytidylyltransferase isogenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 43, 1342-1350.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2001. *Levantamento sistemátivo da produção agrícola*. Rio de Janeiro. Disponible sur http://www.ibge.gov.br.

J

Jacob, F., Monod, J., 1961. Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *Journal of Molecular Biology* 3,318-3356.

Jarvis, P., Dörmann, P., Peto, C.A., Lutes, J., Benning, C., Chory, J., 2000. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis MGD synthase 1* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 8175-8179.

Jenkin, M.E., Clemitshaw, K.C., 2000. Ozone and other secondary photochemical pollutants: chemical processes governing their formation in the planetary boundary layer. *Atmospheric Environment* 34, 2499–2527.

Júnior, R.R.M., Oliveira, M.S.C., Baccache, M.A., Monteiro de Paula, F., 2008. effects of water deficit and rehydration on the polar lipid and membranes resistance leaves of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51 (2), 361-367.

K

Kangasjärvi, J., Jaspers, P., Kollist, H., 2005. Signalling and cell death in ozone-exposed plants. *Plant, Cell & Environment* 28, 1021-1036.

Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M., Karjalainen, R., 1994. Plant defence systems induced by ozone. *Plant, Cell & Environment* 17, 783–794.

Kar, R.K., 2011. Plant responses to water stress. Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* 6 (11), 1741-1745.

Karlsson, P.E., Medin, E.-L., Wickström, H., Sellden, G., Wallin, G., Ottosson, S., Skärby L., 1995. Ozone and drought stress: interactive effects on the growth and physiology of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.).*Water, Air and Soil Pollution* 85, 1325– 1330.

Katayama, K., Sakurai, I., Wada, H., 2004. Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene for cardiolipin synthase located in mitochondria. *FEBS Letters* 577, 193–198.

Kelly, A.A., Dörmann, P., 2002. *DGD2*, an *Arabidopsis* gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions. *Journal of Biological Chemistry* 277, 1166-1173.

Kelly, A.A., Froehlich, J.E., Dörmann, P., 2003. Disruption of the Two Digalactosyldiacylglycerol Synthase Genes *DGD1* and *DGD2* in *Arabidopsis* Reveals the Existence of an Additional Enzyme of Galactolipid Synthesis. *Plant Cell* 15, 2694-2706.

Khan, S., Soja, G., 2003. Yield responses of wheat to ozone exposure as modified by drought-induced differences in ozone uptake. *Water, Air, and Soil Pollution* 147, 299–315.

Kinney, A.J., 1993. Phospholipid head groups. In Lipid metabolism in plants. Ed. T.S. Moore, 259-284. Boca Raton. *CRC Press*.

Kissoudis, C., Van de Wiel,C., Visser R.G.F., Van der Linden G., 2014. Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Plant Science* doi: 10.3389/fpls.2014.00207.

Kobayashi, K., Awai, K., Takamiya, K., Ohta, H., 2004. *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiology* 134, 640-648.

Kreuzwieser, J., Gessler, A., 2010. Global climate change and tree nutrition: influence of water availability. *Tree Physiology* 30, 1221–1234.

L

Langebartels, C., Schraudner, M., Heller, W., Ernst, D., Sandermann, H., 2002. Oxidative stress and defense reactions in plants exposed to air pollutants and UV-B radiation. In Inze, D., Van Montagu, M., eds, *Oxidative Stress in Plants*. Taylor and Francis, London, pp 105–135.

Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grun, S., Sandermann, H., 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 567-575.

Larsson, K.E., Nystrom, B., Liljenberg, C., 2006. A phosphatidylserine decarboxylase activity in root cells of oat (*Avena sativa*) is involved in altering membrane phospholipid composition during drought stress acclimation. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 211–219.

Lauriano, J.A., Lidon, F.C., Carvalho, C.A., Campos, P.S., Matos, M. do C., 2000. Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica* 38, 7–12.

Le Comte, D., 1997. 1996 Weather highlights: around the world. *Weatherwise* 50, 25–27.

Lee A.G., 2000. Membrane lipids: it's only a phase. *Current Biology* 10, R377-380.

Leitao, L., Delacôte, E., Dizengremel, P., Le Thiec, D., Biolley, J.-P., 2007. Assessment of the impact of increasing concentrations of ozone on photosynthetic components of maize (*Zea mays* L.), a C4 plant. *Environmental Pollution* 146, 5–8.

Levitt, J., 1980. Responses of plants to environmental stresses. In: Chilling, freezing, and high temperature stresses, Vol. I, 2nd ed. *Academic Press*, New York, NY.

Li, H., Sherman, L.A., 2000. A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in thecyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Jounal of Bacteriology* 182, 4268-4277.

Li, M., Welti, R., Wang, X., 2006b. Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases Dζ1 and Dζ2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiology* 142, 756–761.

Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., et al., 2013. Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis book* 11, e0133.

Lombardozzi, D. L., Sparks, J. P., Bonan, G. B., Levis, S., 2012. Ozone exposure causes a decoupling of conductance and photosynthesis: implications for the Ball-Berry stomatal conductance model. *Oecologia* 169, 651–659.

Los, D.A., Murata, N., 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1394, 3–15.

Luwe, M., Takahama, U., Heber, U., 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiology* 101, 969–976.

M

Mahajan, S., Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139–158.

Maréchal, E., Block, M.A., Joyard, J., Douce, R., 1994a. Kinetic properties of monogalactosyldiacylglycerol synthase from spinach chloroplast envelope membranes. *Journal of Biological Chemistry* 269, 5788-5798.

Maréchal, E., Block, M.A., Joyard, J., Douce, R., 1994b. Comparison of the kinetic properties of MGDG synthase in mixed micelles and in envelope membranes from spinach chloroplast. *FEBS Letters* 352, 307-310.

Marshall, O.J., 2004. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics* 20(15), 2471-2472.

Matos, A.R., D' Arcy-Lameta, A., França, M., Pêtres, S., Edelman, L., Kader, J.-C., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T., 2001. A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid acyl hydrolase. *FEBS Letters* 491, 188–192.

Matos, A.R., Gigon, A., Laffray, D., Pêtres, S., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.-T., 2008. Effects of progressive drought stress on the expression of patatin-like lipid acyl hydrolase genes in *Arabidopsis* leaves. *Physiologia Plantarum* 134, 110–120.

Matos, A.R., Pham-Thi, A.-T., 2009. Lipid deacylating enzymes in plants: Old activities, new genes. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 491–503.

Matyssek, R., Le Thiec, D., Löw, M., Dizengremel, P., Nunn, A.J., Häberle, K.-H., 2005. Interactions between drought and O_3 stress in forest trees. *Plant Biology* 1, 11-17.

McAinsh, M.R., Evans, N.H., Montgomery, L.T., North, K.A., 2002. Calcium signalling in stomatal responses to pollutants. *New Phytologist* 153, 441-447.

McCartney, A.W., Dyer, J.M., Dhanoa, P.K., Kim, P.K., Andrews, D.W., McNew, J.A., Mullen, R.T., 2004. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted cotranslationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *Plant Journal* 37, 156–173.

Mekhedov, S., Ilarduya, O.M., Ohlrogge, J., 2000. Toward a functional catalog of the plant genome. A survey of genes for lipid biosynthesis. *Plant Physiology* 122, 389–401.

Meyer, S., Genty, B., 1998. Mapping intercellular CO_2 mole fraction (Ci) in *Rosa rubiginosa* leaves fed with abscisic acid by using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 116, 947–957.

Miège, C., Maréchal, E., Shimojima, M., Awai, K., Block, M.A., Ohta, H., Takamiya, K., Douce, R., Joyard, J., 1999. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *European Jounal of Biochemistry* 265, 990-1001.

Mills, G., Buse, A., Gimeno, B., Bermejo, V., Holland, M., Emberson, L., Pleijel, H., 2007. A synthesis of AOT40-based response functions and critical levels of ozone for agricultural and horticultural crops. *Atmospheric Environment* 41, 2630–2643.

Mills, G., Pleijel, H., Büker, P., Braun, S., Emberson, L., Harmens, H., Simpson, D., et al., 2011. Chapter 3: Mapping Critial Levels for Vegetation Recent. *Mapping Manual* 2004, 0–114.

Mishra, A.K., Singh, V.P., 2010. A review of drought concepts. *Journal of Hydrology* 391, 202–216.

Mittler, R., 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends of Plant Science* 11, 15–19.

Monks, D.E., J.H. Goode, R.E. Dewey, 1996. Characterization of soybean choline kinase cDNAs and their expression in yeast and *Escherichia coli*. *Plant Physiology* 110, 1197-1205.

Monteiro de Paula, F., Pham-Thi, A.T., Zuily-Fodil, Y., Ferrari-Iliou, R., Vieira da Silva, J., Mazliak, P., 1993. Effect of water stress on the biosynthesis and degradation of polyunsaturated lipid molecular species in leaves of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiology and Biochemistry* 31, 707–715.

Monteiro de Paula, F.M., Thi, A.T.P., De Silva, J.V., Justin, A.M., Demandre, C., Mazliak, P., 1990. Effects of water stress on the molecular species composition of polar lipids from *Vigna unguiculata* L. leaves. *Plant Science* 66, 185–193.

Moore, T.S., 1982. Phospholipid biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* 33, 325-359

Morgan, P.B., Ainsworth, E. a., Long, S.P., 2003. How does elevated ozone impact soybean? A meta-analysis of photosynthesis, growth and yield. *Plant, Cell & Environment* 26, 1317–1328.

Mudd, J.B., McManus, T.T., Ongun, A., McCullogh, T.E., 1971. Inhibition of glycolipid biosynthesis in chloroplasts by ozone and sulfhydryl reagents. *Plant Physiology* 48, 335-339.

Mudd, S.H., Datko, A.H., 1989. Synthesis of ethanolamine and its regulation in *Lemna paucicostata*. *Plant Physiology* 91, 587-597.

Müller, F., Frentzen, M., 2001. Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 509, 298-302.

Munné-Bosch, S., Alegre, L., 2004. Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology* 31, 203-216..

N

Nelson, D. L.; Cox, M.M., 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. 3rd edition, Worth Publishers: New York, ISBN 1-57259-9316. 1255 pp.

Nishiuchi, T., Iba K.,1998. Roles of plastid omega-3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *Journal of Plant Research* 111, 481-486.

Nouchi, I., Toyama, S., 1988. Effects of ozone and peroxyacetyl nitrate on polar lipids and fatty acids in leaves of morning glory and kidney bean. *Plant Physiology* 87, 638–646.

Nowicki, M., Müller, F., Frentzen, M., 2005. Cardiolipin synthase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 579, 2161–2165.

Nuccio, M.L., Ziemak, M.J., Henry, S.A., Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D., 2000. cDNA cloning of phosphoethanolamine N-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 275; 14095-14101.

O

Ohlrogge, J., Browse, J., 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7, 957–970.

Oltmans, S.J., Lefohn, A.S., Harris, J.M., Galbally, I., Scheel, H.E., Bodeker, G., Brunke, E., Claude, H., Tarasick, D., Johnson, B.J., Simmonds, P., Shadwick, D., Anlauf, K., Hayden, K., Schmidlin, F., Fujimoto, T., Akagi, K., Meyer, C., Nichol, S., Davies, J., Redondas, A.,

Cuevas, E., 2006. Long-term changes in tropospheric ozone. *Atmospheric Environment* 40, 3156–3173.

Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L.S., 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* 13 (5) 86.

P

Pääkkönen, E., Vahala, J., Pohjola, M., Holopainen, T., Kärenlampi, L., 1998. Physiological, stomatal and ultrastructural ozone responses in birch (*Betula pendula* Roth.) are modified by water stress. *Plant, Cell & Environment* 21, 671–684.

Pan, R., Jones, A.D., Hu, J., 2014. Cardiolipin-mediated mitochondrial dynamics and stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 26, 391-409.

Paoletti, E., Grulke, N.E., 2010. Ozone exposure and stomatal sluggishness in different plant physiognomic classes. *Environmental Pollution* 158, 2664-2671.

Paoletti, E., Manning, W.J., 2007. Toward a biologically significant and usable standard for ozone that will also protect plants. *Environmental Pollution* 150, 85–95.

Parrish, D. D., Law, K. S., Staehelin, J., Derwent, R., Cooper, O. R., Tanimoto, H., Volz-Thomas, A., Gilge, S., Scheel, H.-E., Steinbacher, M., Chan, E., 2012. Long-term changes in lower tropospheric baseline ozone concentrations at northern mid-latitudes. *Atmospheric, Chemistry and Physics* 12, 11485–11504.

Pell, E. J., Schlagnhaufer, C.D., Arteca, R.N., 1997. Ozone-induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiologia Plantarum* 100, 264–273.

Pell, E.J., Eckardt, N.A., Glick, R.E., 1994. Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynthesis Research* 39, 453–462.

Pham-Thi, A.T., Borrel-Flood, C., Vieira da Silva, J., Justin, A.M., Mazliak, P., 1985. Effects of water stress on lipid metabolism in cotton leaves. *Phytochemistry* 24, 723–727.

Pineau, B., Bourge,M., Marion, J., Mauve, C., Gilard, F., Maneta-Peyret, L., Moreau, P., Satiat-Jeunemaitre, B., Brown, S.C., De paepe, R., Danon, A., 2013. The importance of cardiolipin synthase for mitochondrial ultrastructure, respiratory function, plant development, and stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25, 4195-4208.

Q

Qin, C., Wang, X., 2002. The *Arabidopsis* phospholipase D family. Characterization of a calcium-independent and phosphatidylcholine-selective PLDζ1 with distinct regulatory domains. *Plant Physiology* 128, 1057–1068.

Quartacci, M.F., Pinzino, C., Sgherri, C., Navari-Izzo, F., 1995. Lipid composition and protein dynamics in thylakoids of two wheat cultivars differently sensitive to drought. *Plant Physiology* 108, 191–197.

Quin, F. M., 1997. Introduction. In Sing, B. B., Mohan Raj, D. R., Dashiel, K. E., Jackai, L. E. N. *Advances in cowpea research* (Ibadan: II., p. ix–xv).

R

Reddy, A.R., Chaitanyaa, K.V., Vivekanandan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 161, 1189–1202.

Renaut, J., Bohler, S., Hausman, J.-F., Hoffmann, L., Sergeant, K., Ahsan, N., Jolivet, Y., Dizengremel, P., 2009. The impact of atmospheric composition on plants: a case study of ozone and poplar. *Mass Spectrometry Reviews* 28, 495–516.

Repellin A., Thi A.T.P., Tashakorie A., Sahsah Y., Daniel C., Zuily-Fodil Y., 1997. Leaf membrane lipids and drought tolerance in young coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *European Journal of Agronomy* 6, 25–33.

Rontein, D., Rhodes, D., Hanson, A.D., 2003a. Evidence from engineering that decarboxylation of free serine is the major source of ethanolamine moieties in plants. *Plant Cell Physiology* 44, 1185-1191.

Rontein, D., Wu, W.I., Voelker, D.R., Hanson, A.D., 2003b. Mitochondrial phosphatidylserine decarboxylase from higher plants. Functional complementation in yeast, localization in plants, and overexpression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 132, 1678-1687.

Rowland, F.S., 2006. Stratospheric ozone depletion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 361, 769–790.

Rudolphi-Skorska, E., Filek, M., Zembala, M., 2014. Physicochemical aspects of reaction of ozone with galactolipid and galactolipid–tocopherol layers. *Journal of Membrane Biology* 247, 639–649.

S

Sahsah, Y., Campos, P., Gareil, M., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.T., 1998. Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiologia Plantarum* 104, 577–586.

Sahsah, Y., Pham Thi, A.T., Roy-Macauley, H., D'Arcy-Lameta, A., Repellin, A., Zuily-Fodil, Y., 1994. Purification and characterization of a soluble lipolytic acylhydrolase from cowpea (*Vigna unguiculata* L.) leaves. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1215, 66-73.

Sairam, R.K., Deshmukh, P.S., Saxena, D.C., 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotype tolerance to water stress. *Biologia Plantarum* 41(3), 387-394.

Sakaki, T, Kondo, N., Yamada, M., 1990. Pathway for the synthesis of triacylglycerols from monogalactosyldiacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. *Plant Physiology* 94, 773–780.

Sakaki, T., Kato, T., Saji, H., 2007. Lipid acyl-hydrolase in leaves of different kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars: Purification and characterization of a kidney bean lipid

acyl-hydrolase, and foliar lipid changes in the cultivars with ozone exposure. *Plant Science* 172, 462–472.

Sakaki, Takeshi, Saito, K., Kawaguchi, A., Kondo, N., Yamada, M., 1990. Conversion of monogalactosyldiacylglycerols to triacylglycerols in ozone-fumigated spinach leaves. *Plant Physiology* 94, 766–772.

Sandelius, A.S., Näslund, K., Carlsson, A.S., Pleijel, H., Selldén, G., 1995. Exposure of spring wheat (*Triticum aestivum*) to ozone in open-top chambers. Effects on acyl lipid composition and chlorophyll content of flag leaves. *New Phytologist* 131, 231-239.

Sang, Y., Zheng, S., Li, W., Huang, B., Wang, X., 2001. Regulation of plant water loss by manipulating the expression of phospholipase Dα. *Plant Journal* 28, 135–144.

Scherer, G.F.E., Ryu, S.B., Wang, X., Matos, A.R., Heitz, T., 2010. Patatin-related phospholipase A: nomenclature, subfamilies and functions in plants. *Trends of Plant Science* 15, 693–700.

Sharma, P., Dubey, R.S., 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46, 209–221.

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey,R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, Article ID 217037, 26 pages.

Sharma, Y.K., Davis, K.R., 1997. The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine* 23, 480–488.

Shimojima, M., Watanabe, T., Madoka, Y., Koizumi, R., Yamamoto, M. P., Masuda, K., et al., 2013. Differential regulation of two types of monogalactosyldiacylglycerol synthase in membrane lipid remodeling under phosphate-limited conditions in sesame plants. *Frontiers in Plant Science* 4:469. doi: 10.3389/fpls.2013.00469

Silva, G.S., 2005. Nematóides. In: Freire Filho, F.R., Lima, J.A.A., Ribeiro, V.Q. (Ed.). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: EMBRAPA, cap. 13, 487-497.

Singh, B. B., Tarawali, S. A., 1997. Cowpea and its improvement: key to sustainable mixed crop/livestock farming systems in West Africa. In C. Renard (Ed.), *Crop residues in sustainable mixed crop/livestock farming system* 79–100.

Slama, A., Salem M.B., Naceur, M.B., Zid, E., 2005. Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Sécheresse* 16 (3), 225-229.

Smirnoff, N., Conklin, P.L., Loewus, F.A., 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology* 52, 437–467.

Solomon, S., 1999. Stratospheric ozone depletion: a review of concepts and history. *Reviews of Geophysics* 37, 275–316.

Sprent, J.I., Odee, D.W., Dakora, F.D., 2010. African legumes: a vital but under-utilized resource. *Journal of Experimental Botany* 61 (5), 1257–1265.

Stanford, N. P., Santos, D. R., Silva, V. M., Santos, C. E. R. ., Monteiro, M. C., 1990. Fixação do N_2 e matéria seca do caupi em dois solos do semi-árido brasileiro submetidos à deficiência hídrica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 14, 283–290.

Sun, Y., Solomon, S., Dai, A., Portmann, R.W., 2006. How often does it rain? *Journal of Climate* 19, 916–934.

T

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725-2729.

Tasseva, G., Richard, L., Zachowski, A. 2004. Regulation of phosphatidylcholine biosynthesis under salt stress involves choline kinase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 566, 115-120.

Testerink, C., Munnik, T., 2005. Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends in Plant Science* 10, 368–375.

Torres-Franklin, M.-L., Gigon, A., de Melo, D.F., Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.-T., 2007. Drought stress and rehydration affect the balance between MGDG and DGDG synthesis in cowpea leaves. *Physiolia Plantarum* 131, 201–210.

Torres-Franklin, M.-L., Repellin, A., Huynh, V.-B., D'Arcy-Lameta, A., s, Zuily-Fodil, Y., Pham-Thi, A.-T., 2009. Omega-3 fatty acid desaturase (*FAD3*, *FAD7*, *FAD8*) gene expression and linolenic acid content in cowpea leaves submitted to drought and after rehydration. *Environmental and Experimental Botany* 65, 162–169.

Tropospheric (ground level) ozone In: Climate Change and Food Security
Disponible sur: //www.climatechange-foodsecurity.org/trop_ozone.html

U

Upchurch, R.G., 2008. Fatty acid unsaturation, mobilization, and regulation in the response of plants to stress. *Biotechnology Letters* 30, 967–977.

V

Van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 112–124.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, RESEARCH0034.

Venegas-Calerón, M., Muro-Pastor, A.M., Garcés, R., Martínez-Force, E., 2006. Functional characterization of a plastidial omega-3 desaturase from sunflower (*Helianthus annuus*) in cyanobacteria. *Plant Physiology & Biochemistry* 44, 517–525.

Vercourt, B., 1970. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the "Flora of Tropical East. Africa" IV. *Kew Bulletin* 24 (3) , 507-569.

Vingarzan, R., 2004. A review of surface ozone background levels and trends. *Atmospheric Environment* 38, 3431–3442.

Von Gunten, U., 2007. The basics of oxidants in water treatment. *Part B: ozone reactions*.

W

Wagg, S., Mills, G., Hayes, F., Wilkinson, S., Cooper, D., Davies, W.J., 2012. Reduced soil water availability did not protect two competing grassland species from the negative effects of increasing background ozone. *Environmental Pollution* 165, 91–99.

Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W., Welti, R., 2006. Signaling functions of phosphatidic acid. *Progress in lipid research* 45, 250–278.

Wang, X.M., Moore, T.S., 1990. Phosphatidylcholine biosynthesis in castor bean endosperm. *Plant Physiology* 93, 250-255.

Webb, M.S., Green B.R., 1991. Biochemical and biophysical properties of thylakoid acyl lipids. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1060, 133-158.

Whitaker, B.D., Lee, E.H, Rowland, R.A., 1990. EDU and ozone protection: foliar glycerolipids and steryl lipids in snapbean exposed to O_3. *Physiologia Plantarum* 80, 286-293.

Wilkinson, S., Davies, W.J., 2009. Ozone suppresses soil dryingand abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism. *Plant, Cell & Environment* 32, 949–959.

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

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

Wilkinson, S., Mills, G., Illidge, R., Davies, W.J., 2012. How is ozone pollution reducing our food supply? *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/err317

Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Long, S.P., 2007. To what extent do current and projected increases in surface ozone affect photosynthesis and stomatal conductance of trees? A meta-analytic review of the last 3 decades of experiments. *Plant, Cell & Environment* 30, 1150–1162.

Wittig, V.E., Ainsworth, E.A., Naidu, S.L., Karnosky, D.F., Long S.P., 2009. Quantifying the impact of current and future tropospheric ozone on tree biomass, growth, physiology and biochemistry: a quantitative meta-analysis. *Global Change Biology* 15, 396-424.

Wolfenden, J., Wellburn, A.R., 1991. Effects of summer ozone on membrane lipid composition during subsequent frost hardening in Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst]. *NeK Phytologist* 118, 323-329.

Y

Yaeno, T., Matsuda, O., Iba, K., 2004. Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *The Plant Journal* 40, 931-941.

Yu, L., Nie, J., Cao, C., Jin, Y., Yan, M., Wang, F., Liu, J., Xiao, Y., Liang, Y., Zhang, W., 2010. Phosphatidic acid mediates salt stress response by regulation of MPK6 in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytology* 188, 762–773.

Z

Zhang, M., Barg, R., Yin, M., Gueta-Dahan, Y., Leikin-Frenkel, A., Salts, Y., Shabtai, S., Ben-Hayyim, G., 2005. Modulated fatty acid desaturation via overexpression of two distinct omega-3 desaturases differentially alters tolerance to various abiotic stresses in transgenic tobacco cells and plants. *Plant Journal* 44, 361–371.

Zhang, W., Wang, C., Qin, C., Wood, T., Olafsdottir, G., Welti, R., Wang, X., 2003. The oleate-stimulated phospholipase D, PLDd, and phosphatidic acid decrease H_2O_2-induced cell death in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 2285–2295.

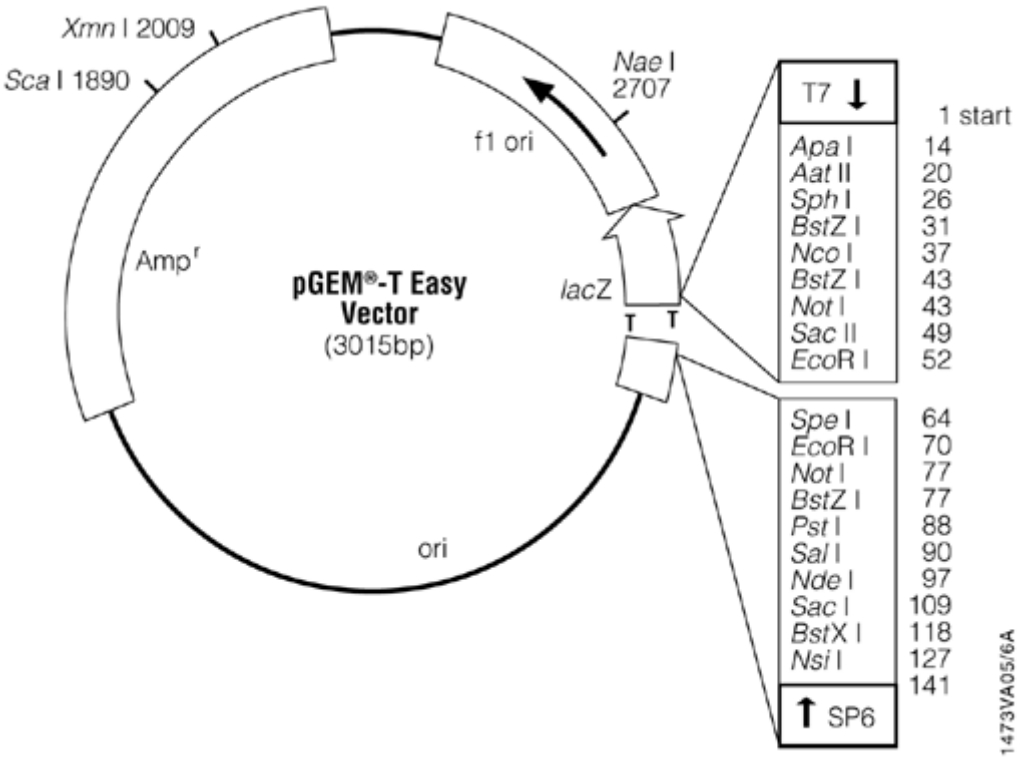
Zhang, Y.Y., Zhu, H.Y., Zhang, Q., Li, M.Y., Yan, M., Wang, R., Wang, L.L., Welti, R., Zhang, W.H., Wang, X.M., 2009. Phospholipase D alpha 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21, 2357–2377.

Annexes

Annexe 1 :

Détails sur le vecteur de clonage plasmidique pGEM-TEasy et son mode de fonctionnement

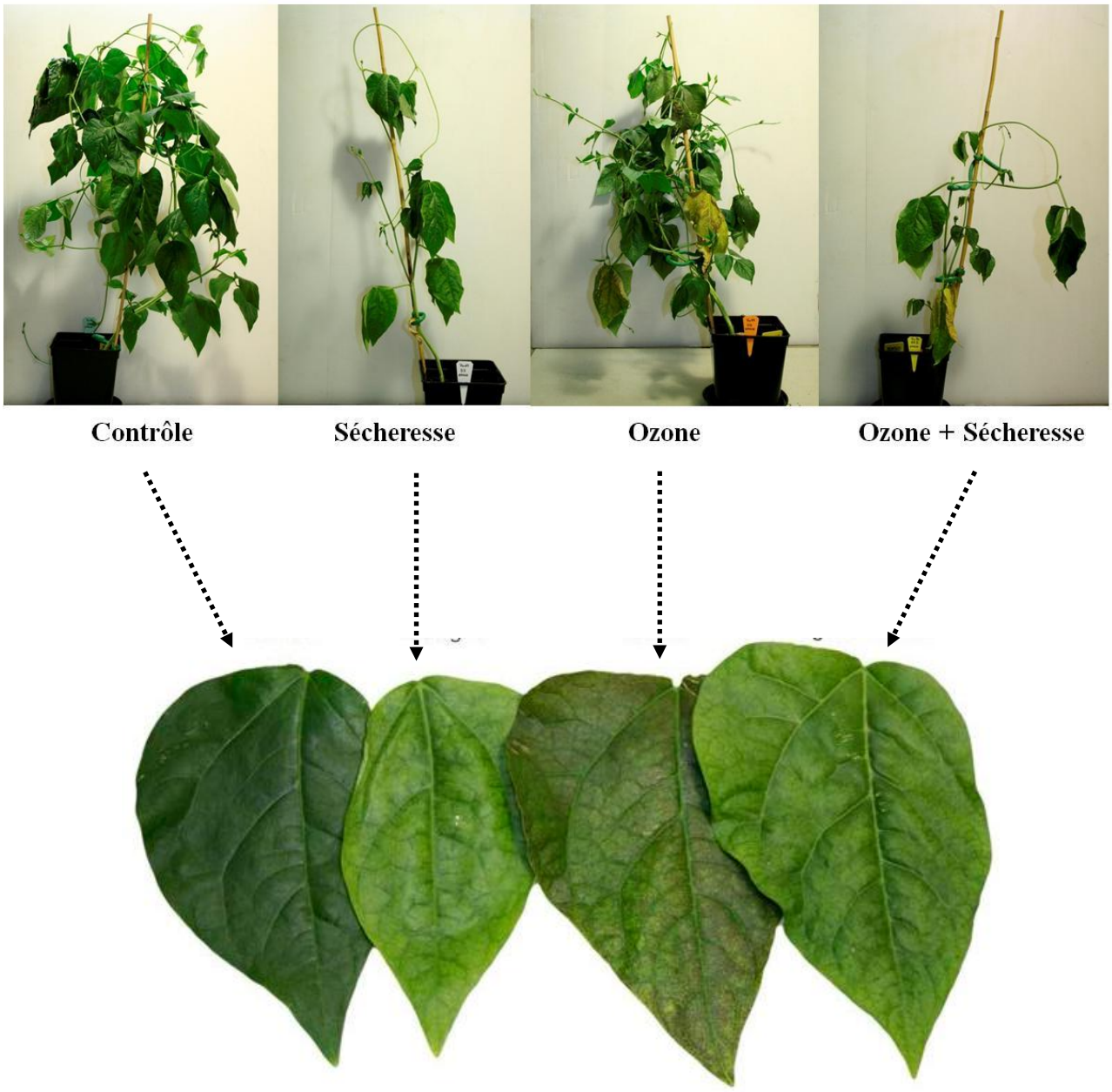
Le vecteur de clonage plasmidique pGEM-TEasy (Promega, France) comprend 3015 pb, incluant un gène de résistance à l'ampicilline, et son mode de sélection est basé sur la rupture du cadre de lecture du gène *lacZ* quand le fragment d'ADNc est présent, en obtenant une β-galactosidase inactive. Le plasmide a une thymine libre en chaque extrémité 3', tandis que l'amplicon a une adénosine à l'extrémité 5', ajoutée par l'ADN polymérase utilisée dans les réactions de PCR, ce qui permet la liaison de l'amplicon au plasmide grâce à la complémentarité des bases A et T par l'action d'une ligase.



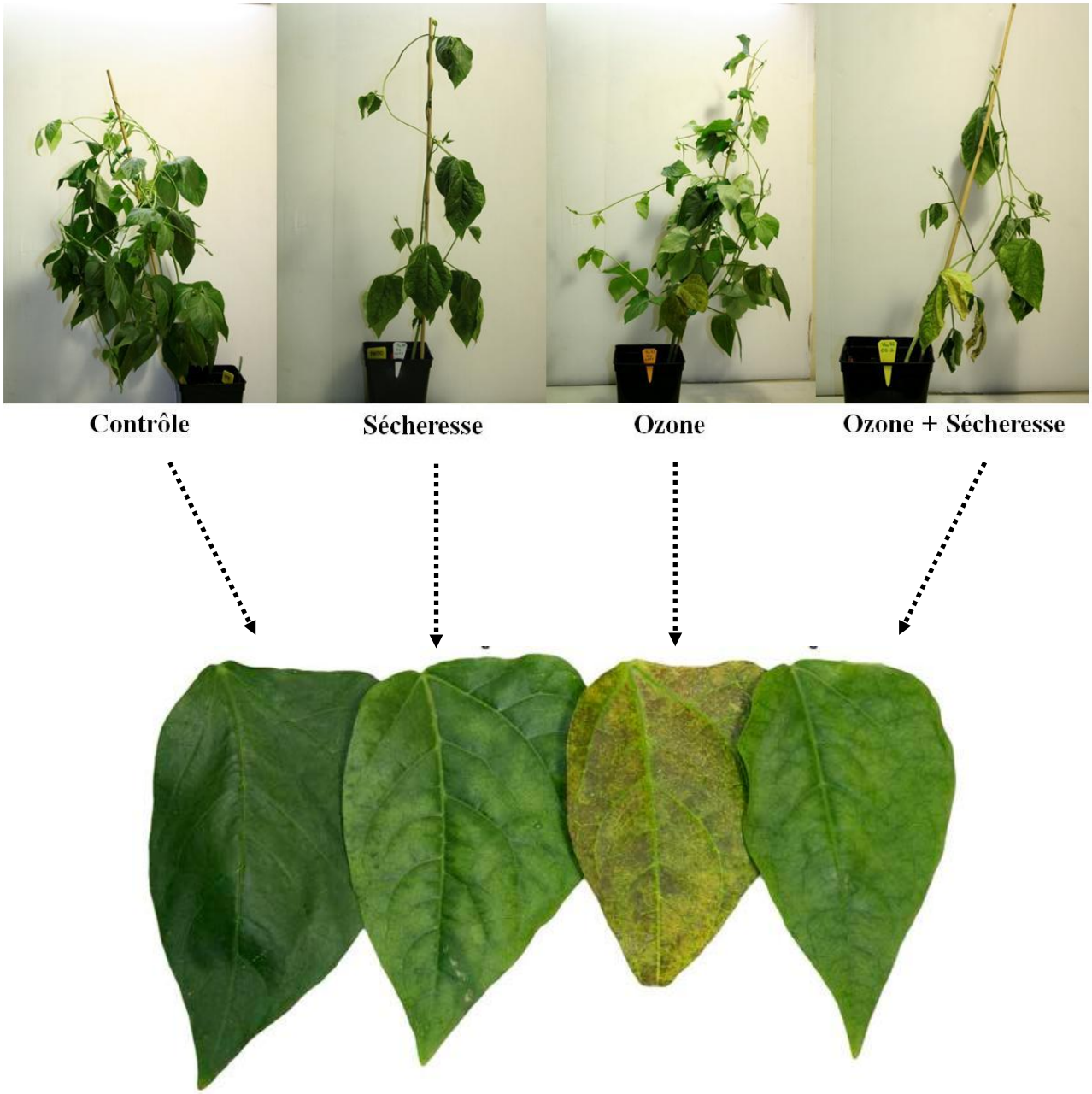
Annexe 2 :

Photos des plantes et des feuilles à 14 jours de traitements :

EPACE-1

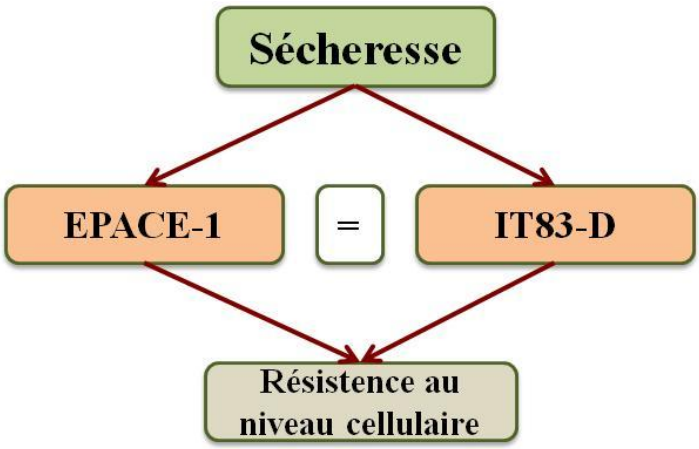


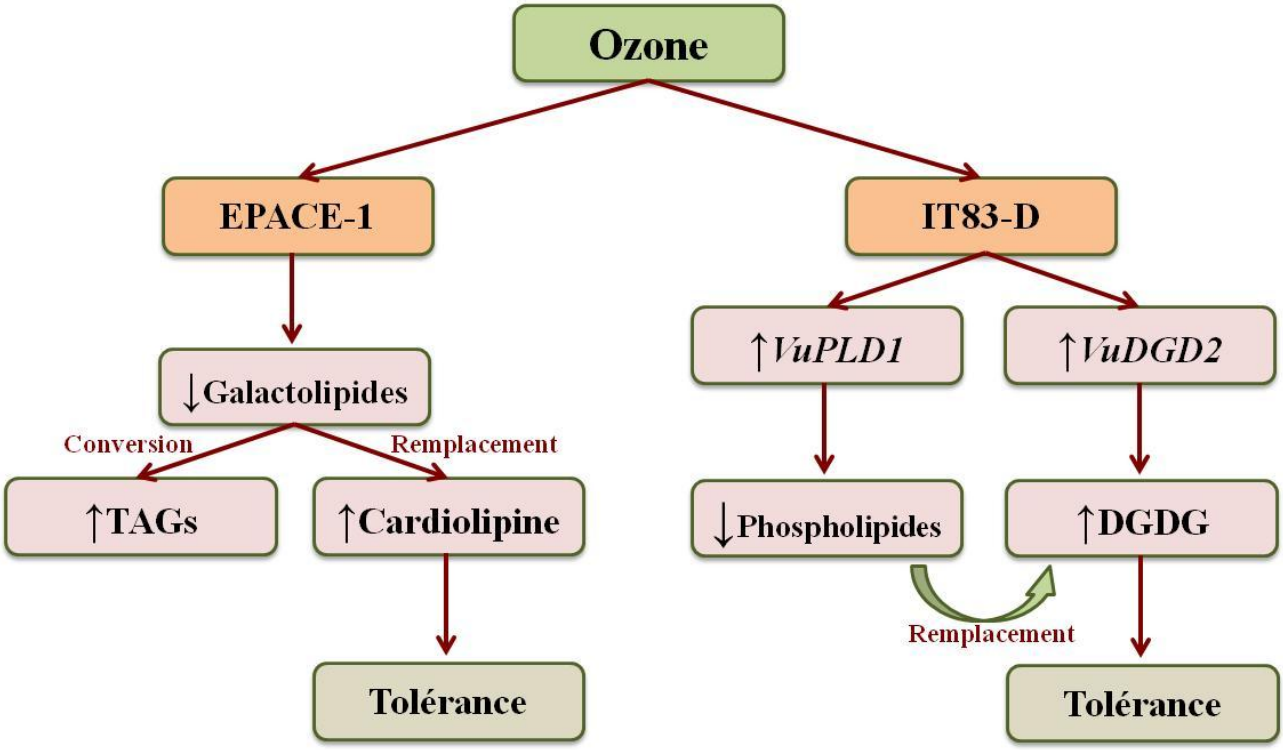
IT83-D

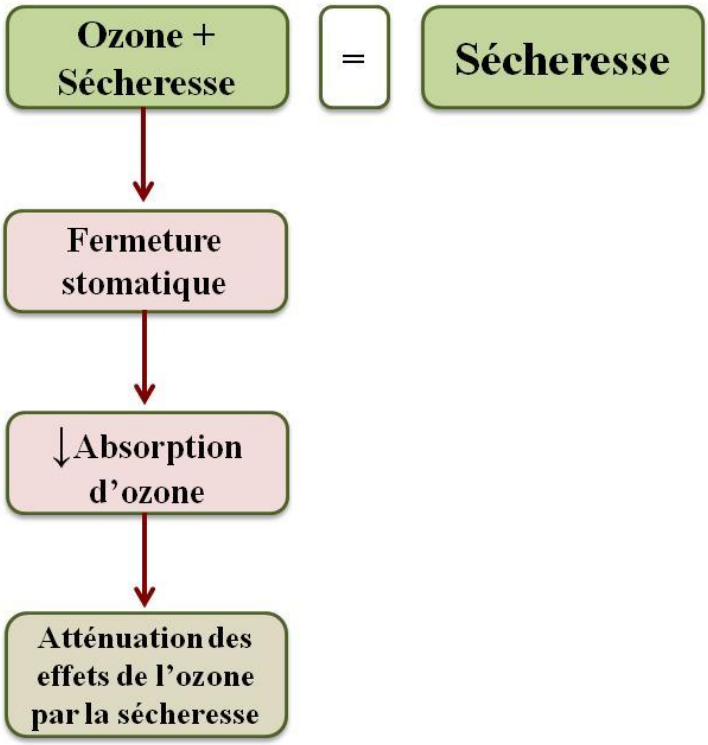


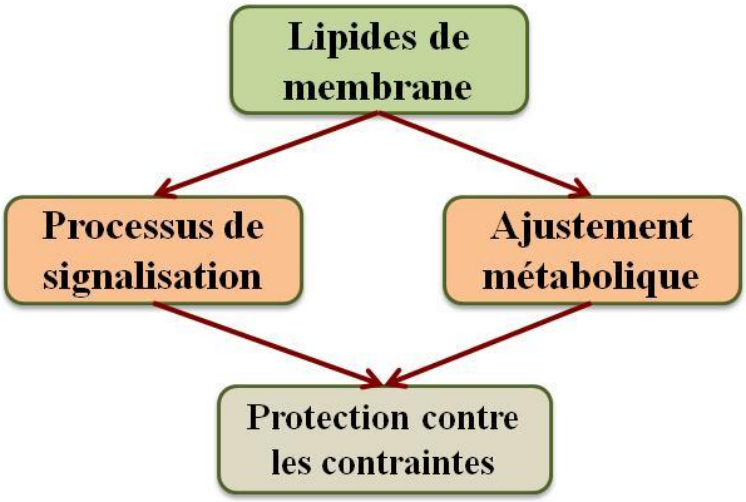
Annexe 3 :

Résumé schématique des résultats et discussion :






Ozone + Sécheresse
=
Sécheresse
Fermeture stomatique
↓Absorption d'ozone
Atténuation des effets de l'ozone par la sécheresse


Lipides de membrane
Processus de signalisation
Ajustement métabolique
Protection contre les contraintes

Annexe 4 :

Liste des articles :

1- Titre : **Membrane remodeling and lipid signaling in leaves of two cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivars exposed to a combination of drought and ozone treatments**

Autheurs : **Deborah Moura Rebouças** ; Yuri Maia de Sousa ; Matthieu Bagard ; Jose Helio Costa ; Yves Jolivet ; Dirce Fernandes de Melo ; Anne Repellin.

Soumis à *Plant, Cell & Environment* le 9 avril 2014 (Refusé).

Soumis à *Environmental and Experimental Botany* le 10 septembre 2014 (Refusé).

2- Titre : **Involvement of plastidial terminal oxidase (PTOX) and mitochondrial proteins (AOX and pUCP) in the response of *Vigna unguiculata* to combined drought stress and ozone exposure**

Autheurs : Yuri Maia ; Matthieu Bagard ; José Hélio Costa ; Marie-Noëlle Vaultier ; **Deborah Moura Rebouças** ; Neuza Felix Gomes ; Pierre Dizengremel ; Anne Repellin ; Dirce Fernandes de Melo ; Yves Jolivet.

Soumis à *Plant, Cell & Environment* le 1er octobre 2012 (Refusé).

Soumis à *Environmental and Experimental Botany* le 14 mars 2014 (Refusé).

Étude du métabolisme des lipides membranaires et des gènes associés chez *Vigna unguiculata* (L.) Walp sous contraintes abiotiques combinées (sécheresse/ozone)

Les changements climatiques globaux sont responsables de l'augmentation de la fréquence des épisodes de sécheresse et de fortes concentrations d'ozone troposphérique, qui peuvent se produire simultanément, en réduisant la croissance des plantes, en limitant la production agricole et en affectant la fourniture de nourriture pour une population mondiale croissante. Ces contraintes environnementales peuvent conduire à la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène en favorisant le stress oxydatif et provoquant un déséquilibre métabolique. Les membranes cellulaires sont les premières cibles des dommages induits par le stress et la préservation de l'intégrité cellulaire par le remodelage des lipides membranaires est essentielle pour la survie des plantes dans des conditions défavorables. L'objectif de cette étude était d'étudier les effets de la sécheresse, de l'ozone et des contraintes combinées chez deux cultivars de haricot niébé dotés de différents degrés de tolérance à la sécheresse: EPACE-1 (tolérante) et IT83-D (sensible) par des réponses physiologiques et par une étude portée sur la teneur et la composition des lipides de membrane, ainsi que dans l'expression de gènes liés à la biosynthèse et la dégradation des ces lipides. La sécheresse et l'ozone (120 ppb), seuls ou en combinaison, ont été appliqués aux plantes après trois semaines de germination pendant deux semaines. Après 7 et 14 jours de traitements, des paramètres physiologiques ont été déterminés. Les lipides extraits de feuilles ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse. L'accumulation de transcrits (*VuMGD1*, *VuMGD2*, *VuDGD1*, *VuDGD2*, *VuCLS*, *VuFAD7*, *VuFAD8*, *VuPLD1* et *VuPAT1*) a été détecté chez les feuilles par PCR en temps réel. Chez les deux cultivars, la sécheresse a limité la croissance et la photosynthèse par la fermeture des stomates, ce qui a semblé impliquer l'expression génétique de la phospholipase D (*VuPLD1*). L'ozone a causé des dommages foliaires et de la dégradation des galactolipides, principalement chez IT83-D. Chez ce cultivar, les dommages ont impliqué dans l'augmentation du ratio DGDG:MGDG et de l'expression de *VuDGD2*. De plus, une diminution partielle de la teneur en phospholipides en réponse à l'ozone a été associée à une augmentation de l'expression de *VuPLD1*, ce qui suggère un remplacement des phospholipides par DGDG. Contrairement, le cultivar EPACE-1 en présence d'ozone, en même temps que la dégradation des galactolipides, a montré une augmentation de la teneur en lipides de réserve et en DPG (cardiolipine). La combinaison des contraintes a conduit à des résultats similaires à ceux de la sécheresse appliquée séparément, chez les deux cultivars, ce qui reflète probablement la forte restriction de l'absorption de l'ozone en raison de la fermeture des stomates induite par la sécheresse. En conclusion, les présents résultats mettent en évidence le rôle important des lipides membranaires dans les ajustements métaboliques qui se produisent pour régler la tolérance des plantes à la sécheresse et à l'ozone.

Study of the membrane lipid metabolism and associated genes in *Vigna unguiculata* (L.) Walp under combined abiotic stress (drought/ozone)

Global climate changes are responsible for the increased frequency of episodes of drought and high concentrations of tropospheric ozone, which can occur simultaneously reducing plant growth, limiting agricultural production and affecting the food supply for an increasing world population. These environmental stresses can lead to the overproduction of reactive oxygen species, promoting oxidative stress and causing metabolic imbalance. Cell membranes are the primary targets of damage induced by stresses and the preservation of cell integrity through remodeling of membrane lipids is essential for plant survival under adverse conditions. The objective of this study was to investigate the effects of drought, ozone and the combined stresses in two cowpea cultivars with different degrees of drought tolerance: EPACE-1 (tolerant) and IT83-D (susceptible) through physiological responses and a study focused on the content and composition of membrane lipids, as well as on the expression of genes related to the biosynthesis and degradation of these lipids. Drought and ozone (120 ppb), isolated or in combination, were applied on three-week-old seedlings during two weeks. After 7 and 14 days of treatments, physiological parameters were determined. Lipids extracted from leaves were analyzed by gas chromatography/mass spectrometry. Transcript accumulation (*VuMGD1*, *VuMGD2*, *VuDGD1*, *VuDGD2*, *VuCLS*, *VuFAD7*, *VuFAD8*, *VuPLD1* and *VuPAT1*) was detected in leaves by real time PCR. In both cultivars, drought inhibited the plant growth and photosynthesis through stomatal closure, which appeared to involve the gene expression of phospholipase D (*VuPLD1*). Ozone caused foliar injury and degradation of galactolipids, mainly in IT83-D. In this cultivar, the damage resulted in an increase in DGDG:MGDG ratio and in *VuDGD2* expression. Furthermore, a partial decrease in the phospholipids content in response to ozone was associated with an increase in *VuPLD1* expression, suggesting a replacement of phospholipids by DGDG. Differently, EPACE-1 cultivar in the presence of ozone, concomitantly with the degradation of galactolipids, showed an increase in storage lipids and DPG (cardiolipin) contents. The two stresses in combination led to results similar to those observed in response to the drought treatment alone, in both cultivars, which likely reflected the severe restriction of ozone uptake resulting from drought-induced stomatal closure. In conclusion, the present results highlight the prominent role of membrane lipids in the metabolic adjustments that occur for the plant tolerance to drought and ozone.