



Biotraçabilité – Biodétection - Biodiversité

Université Montpellier II – *Sciences et Techniques du Languedoc*

Stage de Master professionnel – Première année – Bioingénierie

Priscilla TOTO

Etude biochimique du métabolisme des glucides en appui à la compréhension des mécanismes d'allocation des carbohydrates chez le riz sous contraintes hydriques : Etude des invertases acides et quantification des carbohydrates

Stage effectué de février 2008 à juin 2008 au CIRAD



**CENTRE DE COOPERATION INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT**

Avenue d'Agropolis

Montpellier – France

Responsable de stage : Anne CLEMENT – VIDAL

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	5
A. MISSION ET ORGANISATION DU CIRAD	5
B. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE.....	5
1. <i>Problématique – cadre de l'étude</i>	5
2. <i>Etat de l'art</i>	6
3. <i>Objectif du stage</i>	9
II. MATERIELS ET METHODES.....	10
A. ETUDE DE L'ACTIVITE DES INVERTASES ACIDES	10
1. <i>Conditions de culture du riz</i>	10
2. <i>Extraction et dosage des proteines</i>	10
3. <i>Dosage des activités invertases vacuolaires et parietales</i>	11
4. <i>Etudes cinétiques</i>	12
5. <i>Influence du mode de preparation de l'échantillon</i>	12
6. <i>Influence des conditions de stockage des échantillons apres prelevement</i>	13
B. REPARTITION DES CARBOHYDRATES ET ACTIVITES INVERTASES EN FONCTION DE L'INTENSITE DU STRESS HYDRIQUE	13
1. <i>Conditions de culture et méthodes generales</i>	13
2. <i>extraction et dosage des sucres solubles et de l'amidon</i>	13
3. <i>Dosage des activités invertases vacuolaires et parietales</i>	14
III. RESULTATS	15
A. ETUDE DES INVERTASES ACIDES	15
1. <i>Etudes cinétiques</i>	15
2. <i>Influence du mode de preparation de l'échantillon</i>	16
3. <i>Influence du mode de stockage des échantillons</i>	17
B. INFLUENCE DU STRESS HYDRIQUE SUR LA REPARTITION DES ASSIMILATS ET LES ACTIVITES INVERTASES ACIDES	17
1. <i>Les sucres solubles</i>	18
2. <i>L'amidon</i>	19
3. <i>Les invertases acides dans les limbes</i>	19
IV. DISCUSSION.....	21
OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DOSAGE DES ACTIVITES INVERTASES.....	21
INFLUENCE DU STRESS HYDRIQUE SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE	22
<i>Comparaison IR64 - Azucéna</i>	22
<i>Adaptation de la plante au stress hydrique</i>	22
V. CONCLUSION	25

VI.	BIBLIOGRAPHIE ET WEBOGRAPHIE	26
VII.	ANNEXES	28
	ANNEXE 1 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DES PROTEINES ET DES INVERTASES	29
	ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES PROTEINES TOTALES	30
	ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES ACTIVITES INVERTASES	31
	ANNEXE 4 : ELEMENTS DE CINETIQUE ENZYMATIQUE.....	33
	ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE PURIFICATION DE L'EXTRAIT	35
	1. <i>Précipitation par sulfate d'ammonium à 80% de saturation</i>	35
	2. <i>Purification par passage sur colonne sephadex G25</i>	35
	ANNEXE 6 : PROTOCOLE GENERAL DE L'ETUDE DU STRESS HYDRIQUE.....	36
	ANNEXE 7 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES ET DE L'AMIDON.....	37
	1. <i>Dosage des sucres solubles</i>	37
	2. <i>Dosage de l'amidon</i>	37

Table des abréviations :

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

ATP: Adénosine Tri - Phosphate

RuBP: Ribulose Bis - Phosphate

APG: Acide Phosphoglycérique

HK: Hexokinase

ADP: Adénosine Di - Phosphate

SPS: Sucrose – 6 – Phosphate Synthase

UDPG: Uridine Diphosphoglucose

UDP: Uridine Diphosphate

SUSY: Sucrose Synthase

G6PdH: Glucose – 6 – Phosphate Déshydrogénase

I. INTRODUCTION

A. MISSION ET ORGANISATION DU CIRAD

Le CIRAD est le Centre de Coopération Internationale pour la Recherche Agronomique et le Développement. Il s'agit d'un institut de recherche agronomique au service du développement des pays du Sud et de l'Outre-mer français. C'est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC), créé en 1984 et privilégiant la recherche en partenariat. Il a pour vocation de contribuer au développement durable des régions tropicales et subtropicales à travers des travaux de recherche et des réalisations expérimentales. Ces recherches s'appliquent aux secteurs de l'agriculture, de la forêt, de l'élevage, de la gestion des ressources naturelles, de l'agroalimentaire, des écosystèmes et des sociétés. Cet établissement a également pour mission la formation et la diffusion d'informations scientifiques et techniques (1).

Le CIRAD comprend trois départements dans lesquels sont réparties cinquante six unités de recherche (Figure 1).

Il est présent dans plus de 50 pays du monde, à savoir la France métropolitaine et d'Outre-mer, l'Amérique latine, l'Afrique et l'Asie (Figure 2).

B. CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE

1. PROBLEMATIQUE – CADRE DE L'ETUDE

L'agriculture représente un moyen de développement et de réduction de la pauvreté pour les pays en développement, pays devant parfois faire face à des conditions environnementales peu favorables aux cultures. L'un des enjeux de la recherche agronomique est donc de concevoir des plantes adaptées à leur milieu biophysiques et résistantes aux facteurs biotiques (insectes, maladies, etc.) et abiotiques telle que la sécheresse.

Pour cela, il est nécessaire de mettre en adéquation le génotype des plantes avec leur milieu environnemental. En effet, un génotype donné exprime un phénotype différent en fonction de l'environnement dans lequel il se trouve : on parle de plasticité phénotypique pour définir cette interaction Génotype – Environnement (G x E). Ce sont la croissance et le développement de la plante qui déterminent le phénotype de celle – ci et qui sont à l'origine de l'adaptation des cultures aux conditions du milieu biophysique. La croissance et le développement de la plante étant directement dépendants de la disponibilité en assimilats carbonés, il est alors possible de suivre les adaptations mises en œuvre par la plante sous contrainte, au travers de l'étude du métabolisme des glucides et des activités enzymatiques qui y sont associées.

Cet axe est prioritaire pour l'Unité Propre de Recherche 59 : Modélisation intégrative - Plasticité phénotypique et performances des cultures qui a pour objectif l'amélioration des performances des cultures se basant sur une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation des plantes aux facteurs environnementaux. L'objectif, à plus ou moins long terme, est d'optimiser les stratégies de sélection variétale voire de participer à la création d'idéotypes (variétés optimales pour un milieu environnemental donné) et prévoir les impacts du milieu sur les cultures. Dans cette optique, l'UPR a développé et utilise un modèle quantitatif de simulation de la plasticité phénotypique : EcoMeristem (Luquet, 2006). Le travail de l'unité s'intègre dans le cadre de l'Action Thématique Programmée et Dirigée «Orytage» consacrée au phénotypage et à la diversité des caractères d'adaptations aux contraintes hydriques et thermiques du riz. Cette ATP dirigée s'inscrit dans le contexte du « Generation Challenge Program », un réseau international de recherche sur les ressources génétiques des cultures tropicales en relation à la tolérance à la sécheresse. Dans les conditions actuelles de réchauffement climatique, la plasticité phénotypique du riz sous l'effet du stress hydrique est désormais la priorité de recherche de l'équipe car sa culture requiert une forte consommation en eau.

2. ETAT DE L'ART

a. Le riz : un modèle d'étude

Le riz est la deuxième céréale alimentaire produite dans le monde. Sa production demeure concentrée géographiquement, provenant à plus de 90 % de l'Asie orientale et méridionale. Il s'agit d'une plante semi-aquatique dont la culture nécessite un climat humide et chaud, c'est pourquoi elle est cultivée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes.

Le riz appartient à la famille des *Poacées* ou *Graminées* et au genre *Oryza L.* Il est composé de plusieurs tiges, émises à partir d'un méristème apical unique et formant des talles (Figure 3). Il en existe plus d'une vingtaine d'espèces, dont seulement deux sont cultivées du fait de leur intérêt agricole pour l'Homme, et plusieurs milliers de variétés (2) (3).

Le riz s'est révélé être un modèle d'étude intéressant pour diverses raisons. En effet, il est un acteur économique important dans les pays en voie de développement tant, en terme de production, de consommation et d'emplois. Il présente également un attrait pour la recherche en raison de sa grande diversité variétale, fruit des adaptations acquises suite à sa culture dans des milieux très variés. Enfin, de part la petite taille de son génome (430Mb) et sa bonne synthénie, le riz peut permettre la caractérisation d'autres céréales.

b. Les assimilats dans la plante

La photosynthèse est un mécanisme biochimique permettant aux plantes de synthétiser de la matière organique à partir d'eau et de CO₂ en présence de lumière et de sels minéraux. Elle s'effectue au sein des chloroplastes, organites cellulaires, qui contiennent des pigments assimilateurs capables d'absorber les photons lumineux, il s'agit des pigments chlorophylliens. Les photons lumineux absorbés vont permettre la synthèse de molécules fortement réductrices, le NADPH et de molécules riches en énergie, l'ATP. Le NADPH et l'ATP vont être utilisés ensuite pour réduire le CO₂ atmosphérique au cours du cycle de Calvin et permettre de produire du triose – phosphate (Figure 4). Ainsi, les végétaux sont autotrophes pour le carbone car ils produisent des hydrates de carbone ou glucides, nécessaire à leur développement. A partir de ce squelette carboné, ils synthétiseront l'ensemble de leurs constituants (3) (4).

Les principaux glucides élaborés par les plantes et qui seront analysés dans notre étude sont :

- les glucides solubles :

Le glucose et le fructose, deux hexoses produits de la photosynthèse qui également interviennent sous forme phosphatés dans le métabolisme énergétique et sont à la base de la synthèse de nombreux composés.

Le saccharose est un disaccharide formé de la condensation d'une molécule de glucose et de fructose, c'est la forme de transport des glucides dans la plante par les tissus du phloème.

- les glucides de réserve :

L'amidon est un polyholoside constitué de chaînes plus ou moins ramifiées de maillons glucose, il est stocké dans les amyloplastés et va permettre aux tissus chlorophylliens de temporiser la synthèse de saccharose au cours de la journée.

Les sucres jouent également le rôle de molécules « signal » pouvant influencer sur le développement de la plante. En effet, les hexoses favoriseraient la division cellulaire et l'expansion tandis que le saccharose favoriserait la différenciation et la maturation (Koch, 2004).

c. Relations entre organes sources et organes puits

Chez la plante, il faut distinguer deux types d'organes : les organes sources et les organes puits (Figure 5), en fonction de leur rôle métabolique vis – à vis des assimilats carbonés.

En effet, les organes sources autotrophes, sont généralement photosynthétiques et vont exporter les assimilats qu'ils produisent vers les organes puits principalement sous forme de

saccharose. Il s'agit d'organes matures tels que les feuilles, les tiges et les graines (Foyer et Paul, 2001).

Les organes puits sont hétérotrophes et importent les assimilats essentiellement pour leur croissance, leur maintenance, le stockage sous forme d'amidon et l'ajustement osmotique qui permet à la plante en cas de stress hydrique de maintenir sa turgescence. Il s'agit des organes immatures comme les jeunes feuilles, les racines, les fruits et les méristèmes (Foyer et Paul, 2001).

Ainsi, les glucides sont transportés des organes sources vers les puits engendrant un flux d'assimilats carbonés qui dépend de la distance entre eux, des connections vasculaires qui les lient et de la force du puits (Taille du puits x Activité du puits). Tout changement dans la disponibilité en hydrates de carbone déclenche des mécanismes de sensing et de signalisation en cascade permettant de moduler l'expression de certains gènes et les activités d'enzymes liés au métabolisme glucidique (Winter et Huber, 2000).

d. Les activités invertases

Le saccharose est la molécule clé du métabolisme des glucides du fait de son implication dans les mécanismes de translocation des sucres à travers la plante, de mise en réserve, de son rôle de ressource énergétique et de molécule signal. L'utilisation du saccharose par la plante est possible grâce à l'intervention d'enzymes spécifiques à sa synthèse ou à son hydrolyse (Figure 6). L'hydrolyse du saccharose est principalement réalisée par les invertases, enzymes auxquelles nous nous sommes intéressés en priorité car elles semblent impliquées dans les mécanismes d'adaptation des plantes au stress hydrique (Sturm, 1999) (Roitsch et al. 2003) (Roitsch et Gonzalez, 2004) (Pelleschi et al. 1997) (Trouverie et al. 2003).

L'invertase (β - fructosidase) est une enzyme primordiale liée à la mobilisation et à la répartition des glucides dans la plante. Elle est responsable de la réaction irréversible d'hydrolyse du saccharose en glucose + fructose. Il existe trois types d'invertases caractérisées selon leur pH optimal, leur localisation et leur fonction (Figure 7).

L'invertase acide soluble ou invertase vacuolaire (VIN), de pH optimal 4.5 – 5, est localisée dans les tissus et joue un rôle dans la mise en réserve des sucres intravacuolaires, l'expansion des organes puits et la régulation de la turgescence de la plante (Koch 2004) (Winter et Huber, 2000) (Tymowska – Lalanne et Kreis, 1998).

L'invertase acide insoluble ou invertase pariétale (CWI), de pH optimal 3.5 – 4, est localisée au niveau des sites de transport des assimilats, elle est impliquée dans la répartition des

sucres, la croissance des puits, la signalisation par les sucres et la décharge du phloème vers les organes puits en établissant un gradient de concentration en saccharose (Koch, 2004) (Winter et Huber, 2000) (Tymowska – Lalanne et Kreis, 1998) (Roitsch et al. 2000).

L'invertase alcaline cytosolique, de pH 7.5 – 8, est localisée dans les organes matures, elle intervient dans le métabolisme du saccharose intracellulaire des cellules différenciées (Winter et Huber, 2000) (Tymowska – Lalanne et Kreis, 1998).

Il a également été montré que les invertases jouent un rôle dans la réponse au stress (Roitsch et Gonzalez, 2004) (Roitsch et al. 2003) (Sturm, 1999) (Pelleschi, 1997) (trouverie et al. 2003).

3. OBJECTIF DU STAGE

L'un des objectifs de ce stage a été d'optimiser les méthodes de quantification des activités des invertases vacuolaires et pariétales chez le riz. Ces mises au point permettront d'utiliser le dosage des activités invertases en appui à la compréhension des mécanismes physiologiques qui régissent des relations offre/demande entre les différents organes et ceux impliqués dans l'adaptation de la plante au stress hydrique. Elles serviront également de support pour le prochain projet de recherche de l'unité dans le cadre de l'ATP dirigée « Orytage » et du projet GCP.

Parallèlement à ce travail, une expérimentation sur deux génotypes a été menée afin d'étudier la plasticité phénotypique du riz en phase végétative, soumis à un stress hydrique. L'expérimentation a eu pour but une caractérisation phénotypique en fonction de différents paramètres écophysiologiques en lien avec l'organogenèse et la morphogenèse mais aussi en fonction de paramètres biochimiques liés à la répartition des sucres, volet de l'expérimentation dans lequel je me suis investie. Les résultats obtenus à l'issue de cette étude ont pour vocation de venir optimiser les paramètres utilisés par le modèle EcoMeristem développé par l'unité.

II. MATERIELS ET METHODES

A. ETUDE DE L'ACTIVITE DES INVERTASES ACIDES

1. CONDITIONS DE CULTURE DU RIZ

Des graines du génotype IR64 sont placées à l'étuve de germination sous lumière fluorescente et à 31°C pendant cinq jours. Au stade une feuille, les plants ayant germés sont repiqués dans des pots de 1 litre contenant du terreau spécifique et de l'engrais retard, à raison de trois plants par pots et placés en phytotron. Ils sont irrigués avec de l'eau acidifiée à pH 5. Ces plants sont démariés au stade 3 feuilles.

Les prélèvements en fonction de l'étude réalisée sont effectués sur les plants de riz au stade végétatif, sur la dernière feuille ligulée du brin maître (la dernière feuille ayant achevé sa croissance, feuille source), sur la gaine correspondante (puits aérien, organe de transport des assimilats entre les sources et les puits) et les puits (feuille en croissance) en relation avec cette même feuille.

2. EXTRACTION ET DOSAGE DES PROTEINES

a. Extraction des protéines et des invertases

La plante est disséquée afin de prélever les organes d'intérêt puis la matière fraîche est pesée précisément avant d'être immédiatement broyée dans un mortier en présence d'azote liquide. Une quantité de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) équivalente à 10 % de la masse de l'échantillon est ajoutée au cours du broyage pour éliminer les tannins.

Le broyat est placé dans un tube et mis en contact avec un volume de tampon d'extraction pour l'invertase vacuolaire (Annexe 1) représentant 5 fois la masse fraîche de l'échantillon. L'échantillon est ensuite centrifugé 15 minutes à 10 000 g et à 10° C, le surnageant est récupéré et conservé à 4° C pour le dosage de l'activité de l'invertase vacuolaire.

A trois reprises, le culot est lavé avec la même quantité du même tampon d'extraction puis centrifugé 15 minutes à 10 000 g à 10° C. Le surnageant est isolé et le culot est ensuite remis en suspension pendant une nuit à 4° C dans le même volume de tampon d'extraction pour l'invertase pariétale (Annexe 1). L'échantillon est centrifugé 15 minutes à 10 000 g à 10° C puis le surnageant est récupéré pour effectuer le dosage de l'activité de l'invertase pariétale.

b. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales est réalisé afin de déterminer l'activité spécifique des enzymes présentes dans l'extrait et de pouvoir ainsi comparer l'activité des extraits entre eux. La méthode de Bradford (Bradford, 1976) est utilisée pour ce dosage, il s'agit d'une méthode de colorimétrie très sensible par le Coomassie brilliant blue G250 (Annexe 2). Le bleu de

activité est divisée par la concentration en protéines (en masse moléculaire) pour obtenir l'activité spécifique exprimée en μg ou nmole de glucose/min/mg de protéines.

4. ETUDES CINÉTIQUES

Nous avons étudié l'influence du temps d'incubation sur l'activité invertase. Un extrait unique de limbe est utilisé selon le protocole précédemment décrit mais avec plusieurs temps d'incubation (15, 30, 45 et 60 minutes) à 30° C. La réaction est alors stoppée et le dosage de l'activité est réalisé par quantification du glucose libéré (voir ci – dessus).

Une étude du K_m (la constante de Michaelis – Menten représente l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (Annexe 4)) de l'invertase vacuolaire a été réalisée pour déterminer la concentration saturante en saccharose pour l'enzyme. L'extrait protéique de limbe est mis à incuber 30 minutes dans des tampons d'activités de concentration en saccharose variant de 2 à 100 mM. Le dosage de l'activité est ensuite réalisé dans les mêmes conditions que précédemment.

Le pH optimal du fonctionnement de l'invertase a été évalué. Une gamme de tampon d'activité de pH variant de 4,5 à 8,5 et comportant neuf points a été utilisée. Le temps d'incubation était de soixante minutes.

5. INFLUENCE DU MODE DE PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Influence du nombre de lavage : L'activité de l'enzyme a été quantifiée dans le surnageant récupéré après chacun des trois lavages du protocole d'extraction, sur trois organes distincts : le limbe, la gaine et le puits.

Séparation des protéines : Nous avons, par ailleurs, purifié un extrait réalisé à partir de limbe par précipitation au sulfate d'ammonium entre 0 – 80 % de saturation afin de dissocier l'enzyme de ses substrats sans altérer l'activité. Cette étape permet de précipiter les protéines de l'extrait.

300 mg de limbe sont prélevés et broyés, le broyat est réparti dans deux tubes puis l'extraction est réalisée. Le premier extrait est analysé selon le protocole habituel. Le second extrait est précipité par le sulfate d'ammonium 0 – 80 % (soit 561 mg/mL d'extrait). Le surnageant est éliminé après centrifugation, le culot ainsi formé est dissous dans le tampon d'extraction, enfin l'activité est dosée (Annexe 5).

Une expérience de purification partielle a été faite par passage d'un extrait de limbe sur une colonne Sephadex G25 (4 mL de gel, éluant : tampon d'extraction). Il s'agit d'une chromatographie liquide d'exclusion sur gel (débit 2 mL/min) permettant de séparer les protéines des substrats contenus dans l'échantillon (Annexe 5). Sur les différentes fractions recueillies à la sortie de la colonne, les protéines et les activités invertases ont été mesurées.

6. INFLUENCE DES CONDITIONS DE STOCKAGE DES ECHANTILLONS APRES PRELEVEMENT

Enfin, une étude axée sur l'évolution de l'activité de l'invertase suite à la congélation et à la lyophilisation d'un échantillon frais a été réalisée. Des limbes et des gaines ont été prélevés sur une même plante et répartis en trois pools : un pool pour une analyse immédiate, un pool a été congelé et le dernier a été lyophilisé, pour être tous deux analysés ultérieurement. Chaque pool a été extrait et l'activité invertase quantifiée dans les conditions déjà décrites.

B. REPARTITION DES CARBOHYDRATES ET ACTIVITES INVERTASES EN FONCTION DE L'INTENSITE DU STRESS HYDRIQUE

1. CONDITIONS DE CULTURE ET METHODES GENERALES

L'étude est réalisée sur deux géotypes de riz en phase végétative : IR64 et Azucéna cultivés en serre (Annexe 6). L'expérimentation comporte une phase irriguée suivie d'une phase non irriguée à partir de l'apparition de la sixième feuille du brin maître. Les pots qui subissent le stress hydrique sont fermés hermétiquement et placés sur des balances automatisées afin de suivre l'évolution de la fraction d'eau transpirable du sol (FTSW), ratio caractérisant le degré d'avancement du stress.

FTSW = ASW (Eau du sol réellement disponible) / TTSW (Eau maximale disponible dans le sol pour la transpiration)

Les glucides solubles et l'amidon sont quantifiés sur des échantillons de limbes et de feuilles en croissance (puits) prélevés à quatre dates correspondant à des FTSW comprises entre 1 (pas de stress hydrique : plantes témoins) et 0 (état critique de stress hydrique) pour suivre la cinétique de répartition des assimilats au cours de l'installation du stress. Les activités invertases ont été dosées aux mêmes dates sur les limbes uniquement car pour les feuilles puits le matériel végétal était insuffisant.

Les teneurs en glucides comme les activités invertases sont exprimées en pourcentage de la moyenne de trois plantes témoins prélevées à la même date.

2. EXTRACTION ET DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES ET DE L'AMIDON

a. Extraction des sucres solubles

Les échantillons sont prélevés par dissection de la plante suivant les différents organes étudiés : limbes sources, feuilles puits ou gaines, placés dans des piluliers et immédiatement conservés dans l'azote liquide avant d'être stockés au congélateur à -30°C.

Les échantillons sont broyés dans un broyeur à billes puis séchés à l'étuve à 65° C pendant deux heures. 10 à 30 mg de matière sèche sont pesées puis placées dans un micro – tube.

L'extraction se fait par l'ajout de 1 mL d'éthanol 80 % (v/v) pendant trente minutes au bain marie à 80° C. L'échantillon est centrifugé à 10 000 g puis le surnageant est récupéré.

Le culot est repris dans l'éthanol 80 % et centrifugé, puis l'opération est répétée avec de l'éthanol 50 %. Il est une dernière fois repris dans 0,5 mL d'éthanol 80 % avant d'être congelé dans l'attente du dosage de l'amidon.

Les surnageants sont filtrés sur une mini – colonne contenant du PVPP et du charbon actif afin d'éliminer les pigments et les polyphénols. La colonne est lavée à deux reprises avec 0,5 mL d'éthanol 80 %. Le filtrat est récupéré puis évaporé avec un évaporateur sous vide (Jouan RC-1022) pendant cinq heures et repris dans 1 mL d'eau ultra pure. L'échantillon est congelé en attendant le dosage des sucres solubles.

b. Dosage des sucres solubles et de l'amidon

1) *Dosage des sucres solubles*

Le dosage des sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) est réalisé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en ampérométrie pulsée de type Dionex (Annexe 7). L' HPLC est étalonnée à l'aide de six solutions standards de glucose, fructose et saccharose de concentrations comprises entre 1 et 50 mg/L. Les échantillons décongelés sont dilués dans de l'eau ultra – pure (10 à 50 fois). Un volume de 10 µL d'échantillon dilué est injecté sur la colonne et est élué par de la soude (NaOH) 150 mM avec un débit d'élution de 1 mL/min. Régulièrement, les solutions standards ainsi qu'un étalon biologique (du jus d'orange Joker dilué 2000 fois) sont intercalés entre les échantillons pour pouvoir remédier à toute dérive au cours d'une série d'analyses qui dure plusieurs heures.

2) *Dosage de l'amidon*

Le dosage de l'amidon est réalisé sur les culots stockés au congélateur (Annexe 7). Ce dosage consiste à hydrolyser l'amidon solubilisé en glucose par l'amyloglucosidase puis à quantifier le glucose par spectrophotométrie dans les mêmes conditions que lors du dosage de l'invertase (Figure 8). Le résultat est exprimé en mg équivalent glucose/g de matière sèche.

3. DOSAGE DES ACTIVITES INVERTASES VACUOLAIRES ET PARIETALES

Les échantillons de limbes sont prélevés en suivant le même protocole que pour le dosage des assimilats. Après stockage à – 30 °C, les activités invertases vacuolaires et pariétales sont évaluées sur des échantillons à partir de 120 mg environ de matière fraîche pesée précisément et 600 µL de tampon d'extraction en suivant le protocole décrit plus haut.

III. RESULTATS

A. ETUDE DES INVERTASES ACIDES

Cette expérimentation a pour but d'optimiser la méthode de quantification des activités invertases acides et de mieux comprendre leurs conditions de fonctionnement. Les activités spécifiques sont exprimées en nmol de glucose/min/mg de protéines afin de pouvoir comparer entre eux les résultats.

1. ETUDES CINÉTIQUES

Les études cinétiques ont été essentiellement accomplies sur l'invertase vacuolaire car au vu de la littérature, l'invertase pariétale a des caractéristiques cinétiques très proches (Kock, 2004) (Winter et Huber, 2000) (Tymowska – Lalanne et Kreis, 1998) (Sturm, 1999).

La linéarité de la réaction en fonction du temps a été évaluée à partir d'un échantillon de limbe. Nous observons que l'activité en nmoles/mg de protéines est proportionnelle au temps d'incubation (Figure 9). Ainsi un temps d'incubation de 60 minutes a été utilisé pour la suite des expérimentations. En effet, les absorbances mesurées sont suffisamment importantes pour une bonne sensibilité du dosage tout en se situant dans la zone de linéarité entre activité et temps d'incubation.

L'étude de l'affinité de l'invertase vacuolaire pour le saccharose consiste à quantifier l'activité de l'enzyme à différentes concentrations en substrat. La vitesse de la réaction augmente fortement entre 0 et 20 mM de saccharose jusqu'à atteindre un maximum à 100 mM (Figure 10A). La représentation graphique des données selon la courbe de Lineweaver – Burk permet de situer le K_m (constante de Michaelis – Menten ou constante d'affinité) de l'invertase vacuolaire à 5 mM dans nos conditions d'expérience (Figure 10B). Pour évaluer l'activité, il est nécessaire de se situer à sa vitesse maximale, pour cela il faut être à une concentration en substrat équivalente à 10 fois le K_m , soit 50 mM. Ainsi l'utilisation de 100 mM de saccharose dans le tampon d'activité permet effectivement à l'enzyme d'hydrolyser le saccharose dans les conditions de saturation en substrat.

Le pH optimum de fonctionnement de l'invertase vacuolaire dans le tampon d'activité a également été déterminé. Ainsi l'activité de l'enzyme a été mesurée à différent pH. Nous avons pu constater que la courbe d'activité de l'invertase en fonction du pH forme un plateau à pH 4,5 – 5 puis l'activité diminue fortement jusqu'à devenir nulle à pH 7,5 (Figure 11). Ce résultat démontre que le fonctionnement de l'invertase vacuolaire est optimal à pH 4,5 – 5 et a conforté notre choix pour un tampon d'activité à pH 5. Nous observons également un léger

décrochage de la courbe à pH 6.5 – 7.5 qui pourrait correspondre à la présence de l'invertase neutre.

2. INFLUENCE DU MODE DE PREPARATION DE L'ECHANTILLON

a. Lavages successifs de l'extrait

Nous nous sommes intéressés à la répartition de l'activité des invertases en fonction du nombre de lavages réalisés au cours de l'extraction, sur des échantillons de limbe, de gaine et de puits. L'activité invertase pariétale a été dosée ensuite sur le culot résiduel. La figure 12 permet de constater que le premier extrait contient 75 % (limbe) à 83 % (feuilles puits) de l'activité, ce qui justifie notre choix de quantifier l'activité sur un extrait ayant subi un seul lavage. Au troisième lavage, l'activité VIN dans les limbes est à 8% de l'activité initiale. Dans ce cas, l'activité de l'enzyme est exprimée en fonction de la matière fraîche pour faire un bilan des différentes étapes de lavages, l'activité spécifique exprimée en fonction des protéines extraites est elle constante au cours des lavages.

A partir du culot récupéré lors du dernier lavage, l'activité de l'invertase pariétale est mesurée en fonction des organes considérés. La figure 13 souligne que l'invertase pariétale a une activité nettement plus forte que celle de l'invertase vacuolaire au dernier lavage, dans les trois organes étudiés, de plus elle ne se trouve pas dans les mêmes proportions ainsi cela renforce l'idée que ce n'est pas un reliquat d'invertase vacuolaire qui est mesuré.

b. Purification partielle

Nous avons comparé l'activité invertase d'un extrait brut de limbe et d'un extrait purifié par précipitation au sulfate d'ammonium. Cette technique permet d'isoler les protéines des substances solubles de l'extrait. Nous constatons que l'extrait précipité présente sensiblement la même activité invertase que l'extrait brut (Figure 14). La précipitation n'apportant pas un avantage significatif sur le plan de l'activité, nous n'avons pas jugé nécessaire de purifier systématiquement les échantillons avant de doser l'activité. Par ailleurs, la teneur en glucose initiale dans l'extrait assez faible n'altère pas le dosage de l'activité.

Une purification de l'extrait par passage sur une colonne Sephadex G25 d'exclusion a été réalisée également dans le but de séparer les protéines des autres molécules contenues dans l'extrait. Cette étape est appelée « dessalage », elle est réalisée dans de nombreuses publications bien qu'elle ne peut être effectuée sur un grand nombre d'échantillon (Albertson, 2001) (Trouverie, 2003).

La quantification des protéines et de l'activité invertase vacuolaire dans chacune des fractions a été suivie (Figure 15). La concentration en protéines est faible dans la fraction 4 puis

augmente fortement dans la fraction 5 et diminue progressivement dans les fractions suivantes : la fraction 5 est la fraction enrichie en protéines, c'est dans cette fraction et la suivante que se trouve l'essentiel de l'activité de l'invertase vacuolaire.

L'activité de l'invertase pariétale n'a pas été analysée après purification partielle car la quantité de protéines est trop faible pour être correctement suivie, le passage sur colonne entraînant une dilution de l'extrait.

3. INFLUENCE DU MODE DE STOCKAGE DES ECHANTILLONS

La conservation des activités invertase soluble et pariétale entre des échantillons de limbes congelés à -30°C , des échantillons lyophilisés comparés à des échantillons témoins immédiatement analysés après prélèvement a été étudiée. Cette étude a été réalisée à partir d'un échantillon de limbe réparti en trois lots pour chaque traitement.

La figure 16 montre que les activités des extraits congelés ne sont pas significativement différentes au seuil 5 % à l'activité des extraits frais et ce pour l'invertase vacuolaire et pariétale. Par contre la lyophilisation n'entraîne pas de différence significative par rapport au traitement congélation mais au seuil 5 % la différence est significative avec le témoin frais. Il est donc possible de conserver les échantillons par congélation pour les analyser ultérieurement sans risque de perte de l'activité. Cette expérimentation montre également la plus grande dispersion des mesures de l'activité invertase pariétale, phénomène déjà constaté dans nos études.

B. INFLUENCE DU STRESS HYDRIQUE SUR LA REPARTITION DES ASSIMILATS ET LES ACTIVITES INVERTASES ACIDES

Les teneurs en glucose, fructose, saccharose et amidon ont été déterminées sur des prélèvements de limbe et de puits issus de l'expérience stress hydrique sur les géotypes IR64 et Azucéna, à différentes intensités de stress ou FTSW. Les activités invertases ont été déterminées uniquement sur les limbes car tous les prélèvements ont eu lieu sur les mêmes plantes et pour les puits, le peu de matériel ne permet pas la détermination des glucides et des activités invertases. Les activités et les concentrations en glucides solubles sont exprimées en pourcentage de la moyenne de trois témoins prélevés le même jour, afin d'exprimer les résultats issus de la plante stressée ($\text{FTSW} < 1$) en fonction de la plante maintenue dans des conditions d'irrigation normales ($\text{FTSW} = 1$), le même jour. En effet même en serre, si les jours de prélèvements n'ont pas la même intensité de rayonnement naturel et bien que les prélèvements soient réalisés tôt le matin, l'accumulation de glucides chez le témoin peut –

être différente. Seuls les résultats obtenus pour IR64 sont présentés, les deux génotypes ayant un comportement très similaire en termes de répartition des glucides et d'activités invertases.

1. LES SUCRES SOLUBLES

a. Les limbes

Pour des valeurs de FTSW comprises entre 1 et 0,4, les pourcentages en hexoses solubles augmentent légèrement de 100 % à 200 % tandis que le pourcentage en saccharose diminue très peu tout en restant proche de 100 % (Figure 17). Le stress semble ne pas avoir encore d'effet sur la plante d'où le maintien du saccharose qui permet de maintenir la décharge du phloème vers les puits. L'augmentation des hexoses solubles pourrait s'expliquer par la dissimilation de l'amidon repéré plus loin.

À partir de la FTSW = 0,4, la teneur en hexoses augmente très fortement jusqu'à près de 900 % à 0,1 de FTSW puis devient rapidement nulle (Figure 17). Le saccharose continue de diminuer de façon sensible mais régulière puis diminue jusqu'à 50 % à partir de la FTSW 0,1. Il s'agit ici d'un mécanisme d'ajustement osmotique : le stress hydrique s'est installé, la forte augmentation de la concentration en hexoses solubles dans la plante a pour but d'accroître la pression osmotique dans les cellules afin de réduire leur perte en eau et maintenir ainsi la pression de turgescence de la plante, nécessaire à sa croissance. La teneur en saccharose diminue très peu de façon à préserver le gradient de saccharose permettant les échanges depuis les organes sources vers les organes puits.

À partir de la FTSW équivalente à 0,1, nous assistons aux limites d'adaptations métaboliques de la plante : le stress hydrique est trop important, l'appareil photosynthétique ne peut plus fonctionner correctement donc la disponibilité en glucides solubles n'est plus suffisante pour répondre aux besoins de la plante, conduisant à la mort cellulaire puis à celle de la plante.

b. Les puits

Le pourcentage en glucose et fructose diminue progressivement mais reste supérieur à celui du témoin pour les FTSW comprises entre 1 et 0,1 puis la teneur en hexoses diminue à 50 % du témoin. Le pourcentage de saccharose est constant à 120 % pendant la quasi-totalité du stress puis augmente fortement à partir de la FTSW 0,1 (Figure 17). Lorsque le stress hydrique est ressenti par la plante, celle-ci utilise les hexoses disponibles afin de préserver la croissance des puits. La quantité de saccharose reste constante, témoin d'une bonne alimentation en assimilats entre les organes sources et puits. Cependant, lorsque le stress est à un stade avancé (FTSW = 0,1), la plante n'est plus capable de fournir une quantité suffisante d'hexoses aux puits d'où la forte diminution de concentration par rapport au

témoin. Ce phénomène peut être attribué aux invertases qui ne sont plus capables d'hydrolyser le saccharose, ce qui pourrait expliquer l'augmentation concomitante du saccharose.

2. L'AMIDON

a. Les limbes

Le pourcentage d'amidon dans le limbe sous stress est identique à celui du témoin en début de stress et diminue linéairement jusqu'à devenir nulle à la fin du stress (Figure 17). Il semble que l'amidon mis en réserve dans les limbes soit utilisé afin de fournir à la plante du glucose pour l'ajustement osmotique et pour approvisionner les puits en assimilats.

b. Les puits

La quantité d'amidon au début du stress est très forte (180 % du témoin) puis elle diminue progressivement au cours du stress (Figure 17). Cela indique une tendance de IR64 à stocker l'amidon dans ses organes puits dès que le stress se fait sentir, afin de pouvoir poursuivre la croissance des organes jeunes. Pendant toute la durée du stress, l'amidon est hydrolysé en glucose, assimilats directement métabolisable par la plante, dans le but de préserver les puits.

3. LES INVERTASES ACIDES DANS LES LIMBES

a. L'invertase vacuolaire

L'activité de l'invertase vacuolaire reste proche de 100 % du témoin entre les FTSW comprises entre 1 et 0,4 puis elle augmente jusqu'à atteindre 286 % à la FTSW 0,1 avant de diminuer (Figure 18). Entre les FTSW 1 et 0,4, le stress est encore faible, la plante n'a pas besoin d'ajuster sa pression osmotique, ainsi l'activité des invertases vacuolaires restent identiques à celle de la plante qui n'est pas stressée. Lorsque la FTSW atteint 0,4, le stress hydrique commence à être plus sévère, la plante a besoin d'ajuster sa pression osmotique pour maintenir son état de turgescence, la mobilisation des invertases est donc très forte ce qui rend disponible une grande quantité de glucose et de fructose nécessaire à cet ajustement. A la FTSW 0,1, l'état de stress est trop avancé, les conditions ne sont plus optimales au fonctionnement des invertases, une dégradation des protéines est à envisager, d'où la diminution d'activité et de la teneur en hexoses solubles faible dans la plante.

b. L'invertase pariétale

Le pourcentage d'activité de l'invertase pariétale augmente légèrement en début de stress (FTSW 1 à 0,4) puis diminue fortement jusqu'à la fin du stress (Figure 19). L'activité

des invertases pariétales au niveau des limbes est plus importante durant la première partie du stress de façon à certainement compléter le rôle de l'invertase soluble et ainsi amplifier l'effet d'ajustement osmotique voir de signal de la présence d'hexoses. À partir de la FTSW 0,4, la plante ne peut plus privilégier la croissance de ses organes jeunes, en raison du stress important, l'activité revient à une valeur équivalente au témoin puis devient nulle lorsque l'état physiologique de la plante ne permet plus un fonctionnement normal des invertases pariétales. Il semble que dans les limbes le comportement des CWI soit proche de l'activité VIN, leur mesure pourrait être plus intéressante à envisager dans les puits où elles sont corrélées au déchargement du phloème donc au flux d'assimilats vers ces zones en croissance.

IV. DISCUSSION

OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DOSAGE DES ACTIVITES INVERTASES

L'activité de l'invertase vacuolaire en fonction du temps reste linéaire au moins jusqu'à 60 minutes, cette détermination permet de pouvoir comparer les vitesses maximales de l'enzyme en fonction d'autres facteurs (pH, conditions de culture des plantes, etc.).

Par ailleurs, la détermination du K_m de la VIN dans nos conditions d'expérience a permis de déterminer que la concentration saturante en saccharose se situe à 50mM. Nous sommes au-delà de la saturation avec un tampon d'activité à 100mM de saccharose. La détermination du K_m à 5 mM est un résultat du même ordre de grandeur (quelques mM) que ceux rapportés par Sturm (1999) et Roitsch (2003) sur différentes plantes. Nous avons également montré que le tampon d'activité à pH 5 permet le fonctionnement optimum de l'invertase vacuolaire, observation ayant déjà été faite par Kingston – Smith sur le maïs en 1998 et par Sturm en 1999. Le pH de 5 permet notamment d'éviter la réaction d'hydrolyse acide du saccharose à faible pH qui a été constatée par Albertson (2001). De plus, le décrochage de la courbe de pH à 6,5 - 7,5, signe probable de la présence de l'activité de l'invertase neutre, assure qu'un tampon d'activité à pH 5 ne dosera pas cette dernière de façon simultanée avec l'invertase vacuolaire.

Les investigations sur le mode de préparation de l'échantillon ont montré que l'extraction de l'invertase vacuolaire est représentative après un seul lavage tandis que l'invertase pariétale est extraite à partir du culot ayant subi trois lavages. Il serait sans doute à envisager de rajouter un quatrième lavage avant d'évaluer la CWI, de façon à extraire les VIN résiduelles contenues dans l'extrait. Albertson (2001), qui a travaillé sur une méthode de mesure de l'activité de la CWI, atteint le seuil de 10 – 15 % de l'activité VIN initiale pour pouvoir déterminer l'activité CWI, nous aboutissons également au seuil. L'extraction de la totalité des invertases vacuolaires est primordiale afin de ne pas doser une activité résiduelle VIN lors du dosage de l'activité invertase pariétale réalisée sur le culot. L'utilisation d'un tampon d'extraction spécifique contenant une forte concentration de chlorure de sodium permet ensuite de détacher l'invertase pariétale inféodée à la paroi de la cellule par des liaisons ioniques.

Les étapes de purification de l'extrait d'intérêt visant à l'enrichir en protéines et à séparer les autres molécules n'ont pas fait apparaître un gain d'activité par rapport à l'extrait brut. Le dessalage de l'échantillon n'est donc pas indispensable pour la quantification de l'activité

invertase vacuolaire, l'extrait ne contient pas de molécules inhibitrices de l'activité. Cependant il semble exister des protéines inhibitrices des invertases qui seraient actives à pH 4.5 (Koch, 1999) (Sturm, 1999), pH proche de celui utilisé pour le dosage de la CWI. A l'inverse, ce résultat révèle qu'il est possible de séparer l'enzyme des autres molécules contenues dans l'extrait sans affecter l'activité de celle – ci, ainsi cette enzyme semble assez résistante et n'est pas liée à la présence d'une molécule stabilisant l'activité. Le fait de pouvoir éviter de rajouter cette étape, souvent décrite dans la littérature, lors de la mesure d'activité, permettra de faire des dosages sur plus d'échantillons et de caractériser ainsi plus de génotypes notamment.

Les expérimentations sur le stockage des échantillons ont fait apparaître la possibilité de pouvoir les stocker par congélation à -30°C , au lieu de -80°C comme cela a été fait par Kingston – Smith (1998) et Albertson (2001). La congélation permet de différer le dosage des activités enzymatiques des autres prélèvements tout en étant réalisé sur les mêmes plantes.

INFLUENCE DU STRESS HYDRIQUE SUR LE METABOLISME GLUCIDIQUE

COMPARAISON IR64 - AZUCENA

L'étude de l'influence du stress hydrique sur la répartition des carbohydrates et l'activité des invertases a été menée sur deux variétés de riz : IR64 (variété *indica*) et Azucéna (variété *japonica*) aux caractéristiques morphologiques bien différentes (de nombreuses talles et une hauteur réduite pour IR64, peu de talles et une hauteur importante pour Azucéna). Les résultats obtenus n'ont pas permis de véritablement mettre en évidence des mécanismes d'adaptation distincts concernant les paramètres biochimiques mesurés. Il semblerait cependant que du point de vue écophysologique, ces deux génotypes ont des intensités de réponse au stress un peu différentes. En effet, IR64 à ses variables morphologiques (masse sèche aérienne, surface foliaire et nombre de feuille) qui diminue plus fortement par action du stress que pour Azucéna (stage Lénaïc Mignot). Ce phénomène est en partie à relier avec de nombreux talles représentant une surface foliaire plus importante et donc une transpiration plus importante.

ADAPTATION DE LA PLANTE AU STRESS HYDRIQUE

Ajustement osmotique

Au niveau des feuilles sources (limbes), en début de stress (stress léger), l'état physiologique de la plante n'est pas affecté, c'est pourquoi la quantité de glucides solubles et d'amidon restent proches des témoins, de même que l'activité des VIN et CWI.

À partir d'un stress plus sévère, la plante met en place un mécanisme d'ajustement de la pression osmotique, illustré par une forte activité des invertases acides corrélée à une forte augmentation en hexoses solubles. En effet, une molécule de saccharose libérant deux molécules d'hexoses, la pression osmotique résultante est ainsi augmentée. Cette forte mobilisation de glucides solubles est renforcée par la dissimulation de l'amidon de réserve. Afin de conserver la distribution des sucres vers les organes puits, la teneur en saccharose reste stable par rapport aux plantes témoins. Le phénomène d'ajustement osmotique observé a été mis en évidence précédemment pour de nombreuses plantes (Trouverie et Prioul, 2006) (Villadsen, 2005) (Pelleschi, 1997) et notamment sur le riz par Hsiao (1984). Il a été démontré que l'augmentation des solutés intracellulaires (les hexoses solubles) compense la perte en eau dans la plante en maintenant la pression osmotique à l'intérieur de celle-ci. Il s'agit d'un mécanisme d'adaptation à la sécheresse qui a pour but de conserver la turgescence de la plante et ainsi conserver sa croissance. Cependant, le degré de cet ajustement présente ses limites en fonction du degré et de la durée du stress appliqué (Pelleschi, 1997).

Lorsque le stress hydrique est trop élevé, les adaptations mises en place par la plante ne sont plus efficaces, les activités photosynthétiques diminuent, les invertases vacuolaires cessent de fonctionner, la réserve d'amidon est épuisée, c'est pourquoi les concentrations en saccharose et en hexoses deviennent quasi-nulles.

Les résultats de cette expérimentation vont dans le sens des observations faites précédemment par l'équipe sur IR64, cependant elles concernaient des mesures de FTSW moins nombreuses centrées sur des stress sévères, elles sont maintenant renforcées par les activités invertases.

Relation source puits

Les organes puits sont des organes en croissance nécessitant un fort apport en assimilats, ainsi dès le début du stress, les plants de riz ont montré une tendance à accumuler les hexoses et l'amidon, assimilats qui sont consommés au cours du stress. La concentration en saccharose est maintenue de façon à ce que le gradient de saccharose permettant la décharge du phloème vers les puits soit toujours possible. Dans ce contexte, la mesure des activités invertases au niveau des puits devra dorénavant compléter cette étude. L'activité des invertases pariétales dans les limbes augmente au fur et à mesure que le stress s'installe et peut ainsi accélérer le flux d'assimilats vers les puits pour venir relayer l'amidon qui décroît. Roitsch et al. (2003 et 2004) et Albertson (2001) ont mis en évidence que l'invertase pariétale, de part leur localisation au niveau de la paroi cellulaire et leur activité d'hydrolyse du saccharose, participe à l'augmentation de la concentration en saccharose dans le phloème

et ainsi de son transport. Cependant ces études concernent surtout les CWI présentes au niveau des organes puits.

À partir de la $FTSW = 0,3$, le stress se fait plus intense, les sources alimentent difficilement les puits en assimilats, ces derniers enregistrent petit à petit un épuisement des hexoses et de l'amidon qui rendent la plante incapable d'assurer sa croissance et jusqu'à sa maintenance.. Ces résultats sont conformes aux mécanismes décrits notamment par Foyer en 2001 et qui coordonnent la répartition des glucides en fonction de l'offre et de la demande de la plante.

V. CONCLUSION

Dans le contexte de réchauffement climatique actuel, le stress hydrique est la principale contrainte abiotique à laquelle doit faire face la production mondiale de riz. Il est donc impératif de privilégier la culture de variétés qui soient résistantes et adaptées à de telles conditions environnementales.

Le travail mené au cours de mon stage a permis de mettre au point un protocole d'étude fiable des activités invertases acides chez le riz, de définir leurs conditions de fonctionnement optimum et de déterminer leurs modes de stockage. De plus, les connaissances concernant le comportement des invertases des variétés IR64 et Azucéna, soumises à un stress hydrique, ont été approfondies. Il apparaît que ces deux génotypes mettent en place des stratégies d'adaptation assez semblables visant à préserver la croissance de la plante. Ces stratégies passent par un mécanisme d'ajustement osmotique qui intervient lorsque le degré du stress est intense et qui se traduit par une forte augmentation des invertases vacuolaires et pariétales pour maintenir l'état de turgescence de la plante et l'approvisionnement des organes en croissance en assimilats. Ce mécanisme nécessite aussi une importante mobilisation des systèmes photosynthétiques de façon à maintenir constante la quantité de saccharose produite par la plante mais également l'utilisation des réserves en amidon pour pouvoir répondre à la forte demande en hexoses. Une autre étude sur l'influence du stress hydrique sur plusieurs génotypes est actuellement en cours, toujours dans l'objectif à long terme de sélectionner les paramètres nécessaires à la création de variétés résistantes à la contrainte hydrique. Une étude similaire a été menée sur la sucrose – 6 – phosphate synthase (SPS), enzyme responsable de la synthèse du saccharose (Figure 6), point de contrôle du flux du saccharose. Elle est notamment régulée par des signaux environnementaux, c'est pourquoi il était intéressant de l'étudier dans le cadre du stress hydrique. L'étude menée n'a malheureusement pas apporté de résultats probants, ce qui reflète la complexité de cette enzyme.

Ce présent travail viendra alimenter le modèle de simulation EcoMeristem élaboré par l'équipe grâce aux données biochimiques obtenues. Il servira de point d'appui méthodologique lors de la thèse à venir associée au projet « Orytage » visant à mettre en place une plateforme de phénotypage à moyen débit du riz. Dans cette optique, il faudra envisager de poursuivre les investigations sur les autres enzymes impliquées dans l'allocation des carbohydrates : la SPS et la sucrose synthase (Figure 6) et qui semblent jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes d'adaptation des plantes au stress hydrique, au même titre que les invertases.

VI. BIBLIOGRAPHIE ET WEBOGRAPHIE

- Albertson P. L., Peters K. F., Grof C. P. L. (2001). **An improved method for the measurement of cell wall invertase activity in sugarcane tissue.** *Aust. J. Plant Physiol.*, 28:323-328
- Bradford M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein – dye binding.** *Anal. Biochem.*, 72:248-254
- Foyer C.H. et Paul, M.J. (2001). **Source - Sink relationships.** *Encyclopedia of life sciences.* www.els.net
- Hsiao T. C., Toole J. C., Yambao E. B., Turner N. C. (1984) **Influence of osmotic adjustment on leaf rolling and tissue death in rice (*Oryza sativa* L.).** *Plant Physiol.*, 75:338-341
- Kingston – Smith A., Galtier N., Pollock C. J., Foyer C. H. (1998) **Soluble acid invertase activity in leaves is independent of species differences in leaf carbohydrates, diurnal sugar profiles and paths of phloem loading.** *New Phytol.* 139:283-292
- Koch K (2004). **Sucrose metabolism : regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development.** *Current opinion in plant biology*, 7:235-246
- Luquet D. et al. (2006) **EcoMeristem, a model of morphogenesis and competition among sinks in rice. 1. Concept, validation and sensitivity analysis.** *Functional Plant Biology*, 33:309-323
- Pelleschi S., Rocher J-P., Prioul J.-L. (1997) **Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves.** *Plant, Cell and Environnement*, 20:493-503
- Pelmont P. (1993). **Enzymes.** *Presse Universitaire de Grenoble, deuxième édition*
- Roitsch T. et al. (2000). **Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling.** *Aust. J. Plant Physiol.*, 27:815-82
- Roitsch T. et al. (2003). **Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein.** *Journal of Experimental Botany*, 54:382:513-524
- Roitsch T. et Gonzalez M-C. (2004). **Function and regulation of plant invertases: sweet sensations.** *Trends in Plant Science*, 226
- Sturm A. (1999) **Invertases. Primary structures, functions and roles in plant development and sucrose partitioning.** *Plant Physiol.*, 121:1-7

Trouverie J., et al. (2003) **The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf.** *Journal of Experimentan Botany*, 54:390 :2177-2186

Trouverie J., Prioul J-L. (2006) **Increasing leaf export and grain import capacities in maize plants under water stress.** *Functional Plant Biology*, 33:209-218

Tymowska – Lalanne Z. et Kreis M. (1998). **The plant invertases : physiology, biochemistry and molecular biology.** *Advances in botanical research*, 28:71-117

Villadsen D., Rung J. H., Nielsen T. H. (2005) **Osmotic stress changes carbohydrates partitioning and fructose – 2,6 – bisphosphate metabolism in barley leaves.** *Functional plant Biology*, 32:1033-1043

Winter H. et Huber, S.C. (2000). **Regulation of Sucrose metabolism in higher plants : Localization and regulation of activity of key enzymes.** *Critical reviews in plant sciences*, 19:31-67

(1) www.cirad.fr le 25/03/2008

(2) www.unctad.org le 25/03/2008

(3) www.wikipédia.fr le 25/03/2008

(4) www.snv.jussieu.fr le 27/05/2008

VII. ANNEXES

ANNEXE N° 1 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DES PROTEINES ET DES INVERTASES

ANNEXE N° 2 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

ANNEXE N° 3 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES ACTIVITES INVERTASES

ANNEXE N° 4 : ELEMENTS DE CINETIQUE ENZYMATIQUE

ANNEXE N° 5 : PROTOCOLE DE PURIFICATION DE L'EXTRAIT

ANNEXE N° 6 : PROTOCOLE GENERAL DE L'ETUDE DU STRESS HYDRIQUE

ANNEXE N° 7 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES ET DE L'AMIDON

ANNEXE 1 : PROTOCOLE D'EXTRACTION DES PROTEINES ET DES INVERTASES

Tampon d'extraction pour Invertase vacuolaire : pH 7.5 – 100mL

- Dissoudre 50mM de HEPES = 1.191g dans 50mL d'eau distillée (ED)
- Ajouter 5mM de MgCl₂ = 47.6mg et 1mM d'EDTA = 37.2mg
- Compléter avec 50mL ED et ajuster à pH 7.5 avec du KOH 1M
- 5mM de DTT sont ajoutés plus tard (à cause de l'oxydation) en fonction du volume de tampon nécessaire

Tampon d'extraction pour Invertase pariétale : pH 5 – 50mL

- Préparation des solutions stock de K₂HPO₄ 1M et d'acide citrique 1M :
 - 4.352g de K₂HPO₄ dans 25mL ED
 - 5.253g d'acide citrique dans 25mL ED
- Dissoudre 2.92g de NaCl dans 40mL ED
- Ajouter 3.5mL de solution stock K₂HPO₄ 1M et 2mL de solution stock acide citrique
- Ajuster à pH 5 avec le K₂HPO₄ 1M et compléter à 50mL avec ED

ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES PROTEINES TOTALES

Composition du réactif de dosage des protéines - Bleu de Coomassie :

- Dissoudre 100mg de Coomassie brilliant blue G250 dans 50mL d'éthanol
- Verser 100mL d'acide phosphorique 85% dans 500mL ED et compléter avec l'eau distillée jusqu'à 1000mL
- Ajouter la solution Coomassie/EtOH, verser dans un flacon et mélanger
- Filtrer sur du papier filtre Whatman et remettre dans le flacon

Gamme étalon :

- Préparer 50mL solution de sérum Albumine Bovine (BSA) à 0.5mg/mL : Dissoudre 25mg de BSA dans 10mL ED, verser dans une fiole (sur la paroi pour éviter la mousse) et compléter avec ED jusqu'à 50mL
- Préparer les dilutions suivantes directement dans les cuves :

BSA 0.5mg/mL (µL)	0	5	10	15	20	25	30	40	50
BSA (µg)	0	2.5	5	7.5	10	12.5	15	20	25
Réactif (µL)	1000	995	990	985	980	975	970	960	950

Dosage :

- Auto zéro : Réactif
- Par cuve, ajouter X µL d'extrait selon l'organe et du réactif qsp 1mL :
 - Pour l'invertase vacuolaire : 10µL d'extrait pour les gaines, racines et puits et 5µL d'extrait pour limbes
 - Pour l'invertase pariétale : 25µL d'extrait pour les limbes, gaines et puits et 50µL d'extrait pour racines
- Agiter et attendre 5 minutes
- Lire la DO à 595nm

ANNEXE 3 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES ACTIVITES INVERTASES

Composition du tampon d'activité Acide citrique/K₂HPO₄ : pH 5 – 50mL

- Dissoudre 1.711g de saccharose - concentration finale 100mM - dans 30mL d'eau distillée
- Ajouter 3mL d'acide citrique 1M - conc. finale 60mM et 5mL de K₂HPO₄ 1M - conc. finale 100mM
- Compléter avec ED jusqu'à 48mL et ajuster à pH 5 avec du K₂HPO₄ 1M

Incubation :

- Placer le tampon d'activité à 30°C
- Blanc : 50µL d'extrait chauffé 3min à 100°C puis placé 3min dans de la glace, 150µL ED et 200µL de tampon d'activité
- Echantillon : 50µL d'extrait, 150µL ED et 200µL de tampon d'activité
- Incuber l'échantillon et le blanc 60min à 30°C
- Arrêt : 3min à 100°C puis dans de la glace

Préparation de la gamme étalon :

L'activité invertase est dosée indirectement par le dosage du glucose produit par l'enzyme. La gamme étalon est préparée à partir de :

Solution mère	0	25	50	75	100
Glu 4g/L (µL)					
ED (µL)	1000	975	950	925	900
Glu (µg)	0	5	10	15	20

Composition du réactif de dosage du glucose :

- Préparer 100mL de tampon TEA/HCl 0.75M – pH 7.6 :
 - Dissoudre 14g TEA dans 100mL d'eau distillée (ED), ajouter 0.25g de MgSO₄ et ajuster à pH 7.6 avec du NaOH 5N.
- Pour préparer 100mL de réactif de dosage du glucose :
 - Mesurer 54.6mL d'ED dans un bécher et ajouter 32.4mL de tampon TEA

- Verser 6.4mL ED dans un tube à hémolyse (1), ajouter 32.4mg de NADP et verser dans le bécher
- Verser 6.4mL ED dans un tube à hémolyse (2) et ajouter 162.4mg d'ATP
- Placer 162.4mg de NaHCO₃ dans un tube à hémolyse (3)
- Verser le tube 2 dans le tube 3 en faisant attention au dégazage
- Ajouter le contenu du tube 3 dans le bécher

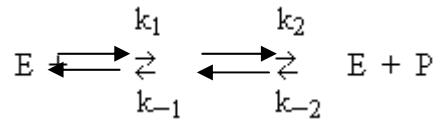
Dosage :

- Auto zéro : Réactif de dosage
- Par cuve, ajouter 770μL de réactif et 50μL de milieu incubation ou de solution étalon
- Lire la DO1 à 340nm
- Ajouter 5μL G6PDH/HK et attendre 10 minutes
- DO2 à 340nm

ANNEXE 4 : ELEMENTS DE CINETIQUE ENZYMATIQUE

De nature protéique les enzymes sont des catalyseurs biologiques spécifiques de la réaction et du substrat. L'enzyme ne peut catalyser qu'une réaction thermodynamiquement possible, elle va essentiellement augmenter la vitesse de la réaction de transformation du substrat en produit.

La réaction enzymatique peut être décomposée en 2 étapes :



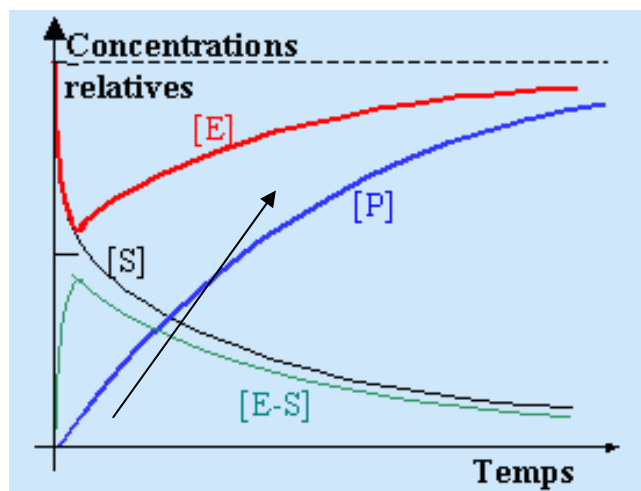
Dans ce système réactionnel, E, S, et P sont respectivement l'enzyme, le substrat et le produit et E-S un complexe enzyme – substrat.

k_2, k_{-1} : constantes de dissociation du complexe E-S

k_1, k_{-2} : constantes de formation du complexe E-S

Remarque : en début de réaction l'absence de produit fait que la réaction -2 est négligeable.

La concentration de ces différents composés va évoluer en fonction du temps de la façon suivante :



La vitesse initiale d'apparition du produit P, $V_0 = dP/dt$ est donnée alors par l'équation de Michaelis :

$$V_o = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

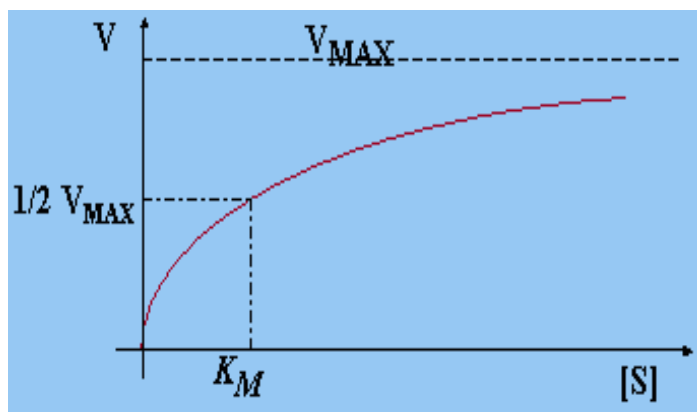
V_{\max} : vitesse maximale de la réaction

$[S]$: concentration en substrat

K_M : constante de Michaelis

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Ainsi la courbe représentative de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en substrat est la suivante :



Mesure de l'activité enzymatique : Lors de la mesure d'une activité enzymatique il faudra donc utiliser une concentration en substrat saturante qui permette de mesurer la vitesse maximale V_{\max} . En général une concentration de l'ordre de 10 fois le K_M est utilisée.

Le K_M représente l'affinité de l'enzyme pour son substrat, plus sa valeur est élevée moins l'enzyme a de l'affinité pour son substrat et plus il faudra une forte concentration en substrat pour atteindre la V_{\max} .

Les réactions enzymatiques sont sensibles à la température et au pH, paramètres qu'il faut maîtriser pendant les mesures (utilisation de cuves thermostatées et de solutions tampons).

ANNEXE 5 : PROTOCOLE DE PURIFICATION DE L'EXTRAIT

1. PRECIPITATION PAR SULFATE D'AMMONIUM A 80% DE SATURATION

L'extrait brut est mis en présence de sulfate d'ammonium solide. La quantité de sulfate d'ammonium à ajouter pour arriver à 80% de saturation est déterminée grâce à un tableau de concentration.

Pour 1mL d'extrait, ajouter 561mg de sulfate d'ammonium pour une saturation à 80%.

Agiter, attendre 10min et centrifuger 10min à 12 000g à 15°C.

Le culot est repris dans 1ml de tampon d'extraction et constitue l'extrait purifié.

2. PURIFICATION PAR PASSAGE SUR COLONNE SEPHADEX G25

Préparation de la colonne :

- Faire gonfler la poudre Séphadex dans du tampon d'extraction en excès à température ambiante pendant 3h ou au bain marie – marie à 90°C pendant 1h.
- Préparer un mélange contenant 75% de gel et 25% de tampon.
- Dégazer sous vide si le gel est gonflé à température ambiante et équilibrer à température ambiante.
- Remplir la colonne avec le gel en faisant couler le long d'une baguette en verre pour éviter les bulles d'air.
- Ajouter du tampon jusqu'au sommet de la colonne, tasser en appliquant un débit de 5cm/min et ajouter du tampon jusqu'au sommet de la colonne.
- Equilibrer la colonne en faisant passer 160mL de tampon.
- La colonne doit être conservée à 4°C.

Dépôt et élution :

- Déposer environ 500µL d'échantillon préalablement centrifuger et appliquer un débit de 0.5mL/min.
- Eluer avec le tampon à un débit de 2mL/min.
- Les fractions sont récupérées à la sortie du collecteur de fraction pour analyse.

ANNEXE 6 : PROTOCOLE GENERAL DE L'ETUDE DU STRESS HYDRIQUE

Condition de culture :

La germination des graines des génotypes IR64 et Azucéna a lieu en étuve sous lumière fluorescente et à 31°C pendant cinq jours. Les plants de riz ayant germés sont repiqués au stade une feuille, à raison de trois plants par pots, dans des pots de 1 litre contenant de la terre de Lavalette caractérisée et de l'engrais retard. Ces plants sont démarrés au stade 3 feuilles. Ils sont irrigués avec de l'eau acidifiée à pH 5 et de la solution nutritive. Les pots sont placés en serre après repiquage afin de contrôler les conditions de culture.

Dispositif expérimental :

Les pots remplis de terre sèche sont pesés de même que les pots à capacité au champ (le sol contenant le maximum d'eau accessible par la plante) afin de déterminer par la suite la FTSW de la plante (la fraction d'eau transpirable du sol).

Les pots sont au nombre de trois répétitions par génotype, chaque génotype subissant un traitement irrigué et un traitement stressé et dont les effets seront mesurés à des dates D1 à D4. Ces dates ont été fixées et sont estimées devoir correspondre respectivement à des FTSW de 0.7, 0.5, 0.3 et 0.1.

Le stress hydrique est appliqué au stade six feuilles apparues sur le brin maître. Les pots qui subissent le stress sont fermés hermétiquement par du film cellophane et du ruban adhésif pour limiter les pertes en eau du sol par évaporation, la transpiration est uniquement foliaire. Ces pots sont placés sur des dispositifs de pesée automatisée en vue de la mesure de la FTSW. Aux dates prévues, les observations phénotypiques (calcul du nombre de feuilles visibles : phyllochrone, vitesse d'élongation foliaire et calcul de la surface foliaire) et de prélèvements des organes pour les dosages enzymatiques sont réalisés.

ANNEXE 7 : PROTOCOLE DE DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES ET DE L'AMIDON

1. DOSAGE DES SUCRES SOLUBLES

Les sucres solubles (glucose, fructose et saccharose) sont dosés par une chromatographie liquide haute performance de type Dionex.

La colonne de séparation utilisée par ce système est une Carbopac PA1, colonne échangeuse d'anion particulièrement appropriée pour la séparation des mono - et di – saccharides grâce à une élution isocratique (la composition de l'éluant ne varie pas au cours du temps).

La détection se fait par ampérométrie pulsée : une série de potentiel est appliquée par une électrode de travail en or, cela oxyde les sucres et crée ainsi un courant qui est mesuré par une électrode de référence.

La Dionex est associée au logiciel Chroméléon qui permet de traiter les chromatogrammes pour le calcul des concentrations.

2. DOSAGE DE L'AMIDON

Le dosage de l'amidon se fait par voie enzymatique. Le culot issu de l'extraction est décongelé puis centrifugé pour éliminer le solvant de conservation. Il est ensuite séché 1h à 65°C ou au Speedvac puis l'ensemble culot + tube est pesé et correspond au poids P1.

Le culot est repris dans 1mL de NaOH 0.02N et le tube est placé au bain marie pendant 1h30 à 90°C sous agitation. Il est centrifugé 1 minute à 500g et 100µL d'amyloglucosidase sont ajoutés. Le tube est placé au bain marie pendant 1h30 à 50°C sous agitation et est centrifugé. L'ensemble tube + culot + hydrolysate est pesé et noté P2.

Composition de l'amyloglucosidase :

Fluka 10115 (70 U/mg) dilué dans du tampon citrate à 0.32M – pH 4.2, à 5mg/mL.

Tampon citrate : Acide citrique 0.16M et citrate de sodium 0.16M; ajuster avec NaOH 1N.

Dosage de l'amidon :

L'amidon est dosé indirectement par le dosage du glucose produit par l'enzyme.

Le protocole est le même que celui décrit pour l'invertase.

La quantité d'amidon en mg de glucose/g de matière sèche est déterminée de la façon suivante :

$$\text{Amidon (mg/g)} = \frac{(\text{DO2-DO1}) \times (\text{P2-P1}) \times 1000}{\text{K} \times \text{V} \times \text{M}}$$

Avec : P2-P1 en g

K : pente de la courbe étalon

V : volume de l'échantillon en µL

M : masse de l'échantillon en mg de matière sèche

La culture mondiale du riz est affectée par le réchauffement climatique du fait de la forte consommation en eau qu'elle requiert. Pour cette raison, le Cirad s'est attaché à la recherche de variétés présentant des mécanismes d'adaptation physiologiques aux conditions de sécheresse durant la phase végétative. Dans ce but une expérimentation a été réalisée sur deux génotypes IR64 et Azucéna afin de caractériser leurs comportements physiologiques en termes d'organogénèse et de morphogénèse et biochimiques en lien avec la répartition des assimilats en réponse au stress hydrique. La répartition des glucides solubles et de réserve, et l'activité des invertases acides impliquées dans le métabolisme glucidique ont été étudiées dans les feuilles sources et celles en développement (puits). L'étude a montré l'existence d'un mécanisme d'ajustement osmotique de la plante soumise à la contrainte hydrique, de même qu'une redistribution des carbohydrates en fonction de l'offre et de la demande. Au préalable l'optimisation des conditions de quantification de l'activité des invertases acides a été réalisée. Cette étude vient en appui au phénotypage du riz qui est une des étapes importante de ce projet et nécessite la mise au point de méthodes fiables et reproductibles sur lesquelles se baser.

Mots clés : *Oryza sativa* L. ; stress hydrique ; glucides ; invertases acides ; relation source – puits ; ajustement osmotique.

The worldwide culture of the rice is affected by climatic warming due to strong consumption in water which it requests. For this reason, Cirad became attached in search of varieties introducing physiological mechanisms of adaptation to the conditions of dryness during vegetative stage. In this purpose, an experimentation was accomplished on two genotypes IR64 and Azucena to characterize their physiological behaviours in terms of organogenesis and morphogenesis and biochemical in link with the sharing out of assimilates in reply to water stress. The sharing out of the soluble carbohydrates and storage, and the activity of the acid invertases involved in the carbohydrates metabolism were studied in the source leaves and those in development (sink). The study showed the existence of a mechanism of osmotic adjustment of the plant subjected to water constraint, as well as a redistribution of carbohydrates according to offer and according request. In anticipation the optimization of the conditions of quantification of the acid invertase activities was accomplished. This study comes in support to the phenotypage of the rice which is one of the stages important of this project and requires the setting up of reliable and reproducible methods on which to be based.

Key words : *Oryza sativa* L. ; water stress ; carbohydrates ; acid invertases; source – sink relationship ; osmotic adjustment.

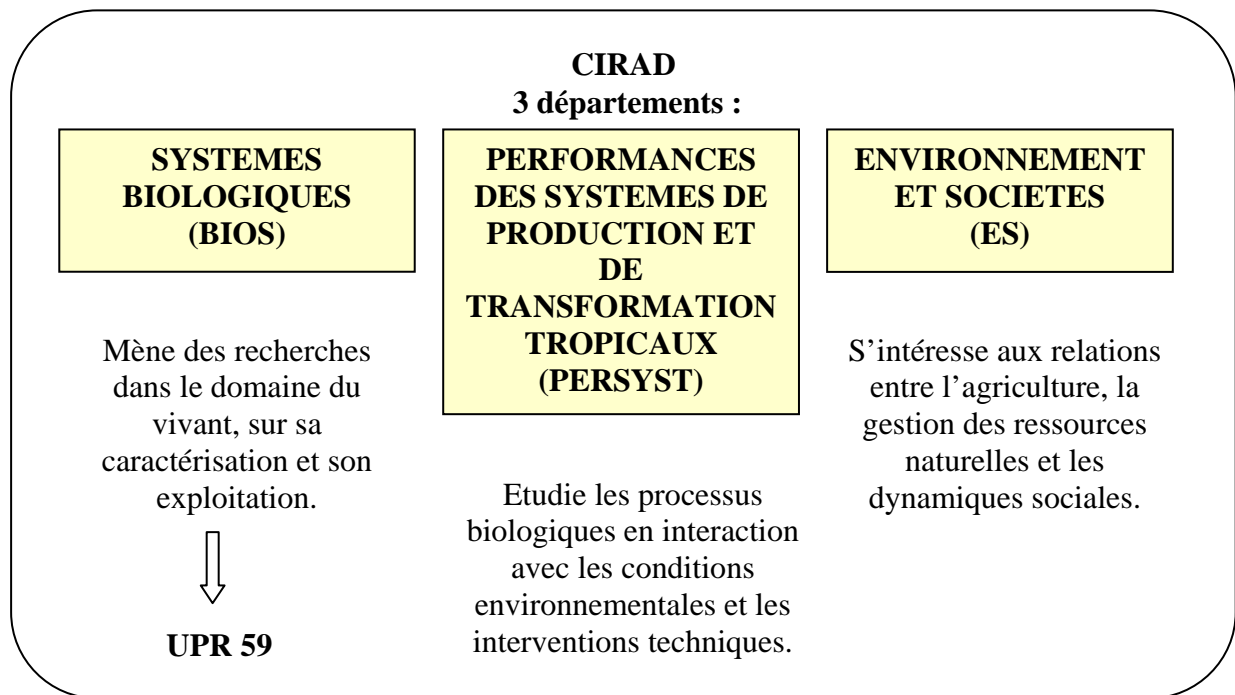


Figure 1 : Organisation du CIRAD.



Figure 2 : Localisation géographique du CIRAD dans le monde.



Figure 3 : Représentation d'un plant de riz (*Oryza sativa*).

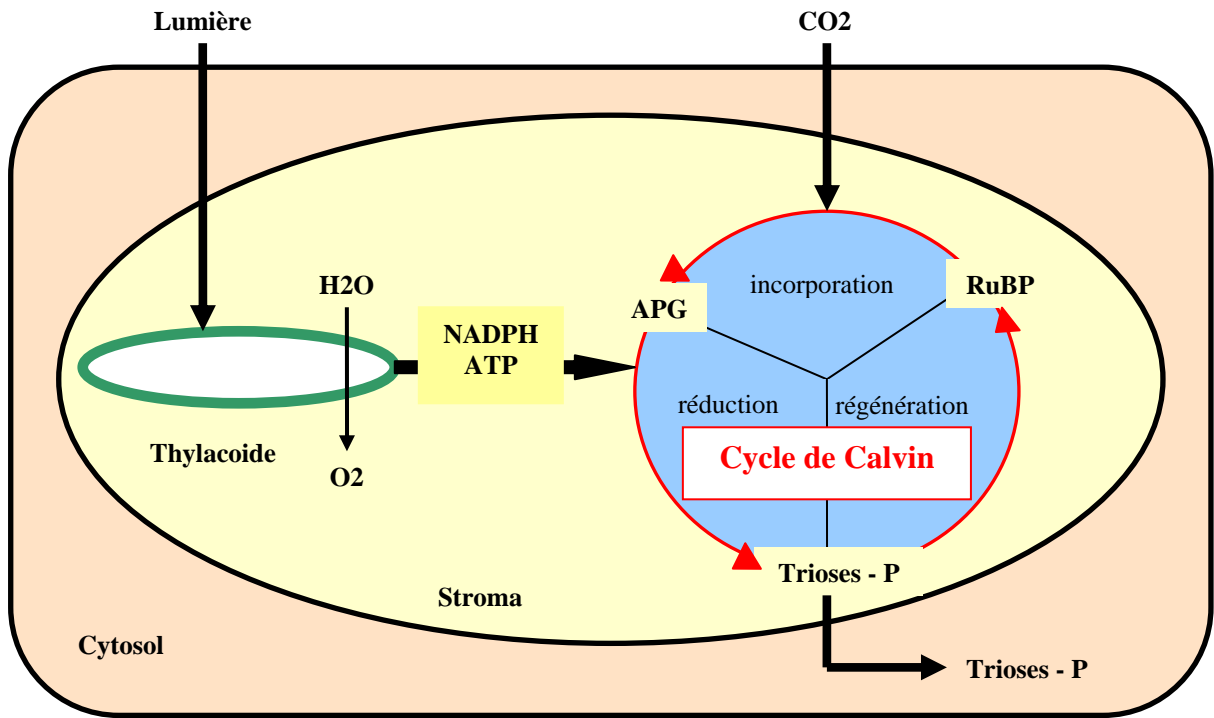


Figure 4 : Schéma général de la photosynthèse dans le chloroplaste.

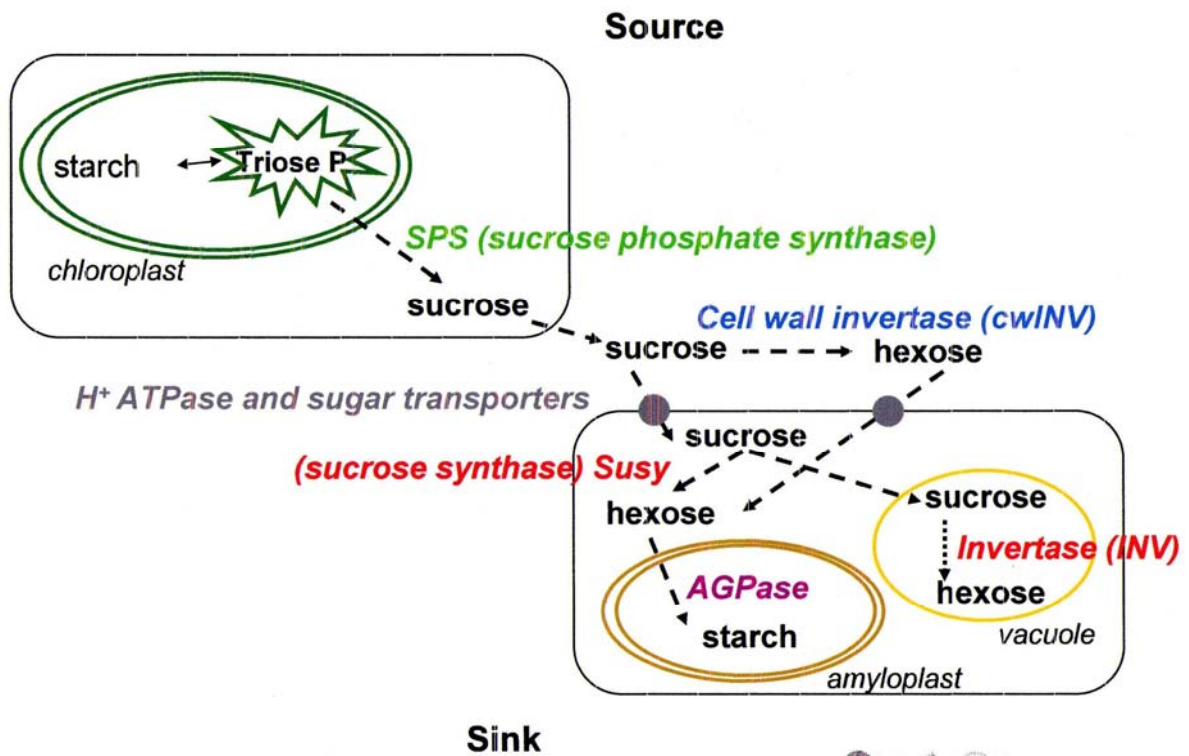


Figure 5 : Relation entre les organes sources et les organes puits

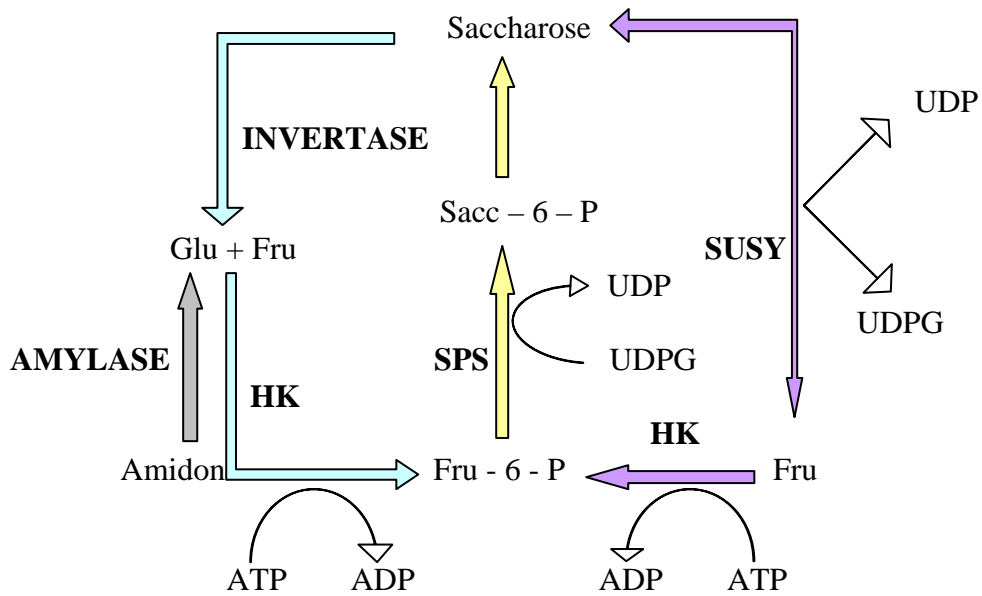


Figure 6 : Relations entre les enzymes impliqués dans l'allocation des glucides.

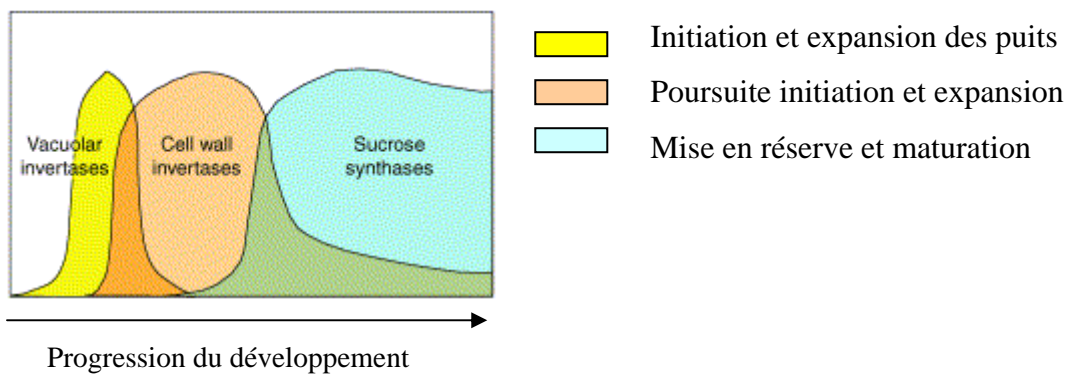


Figure 7 : Contribution relative des invertases au cours du développement des organes puits (Koch K., 2004).

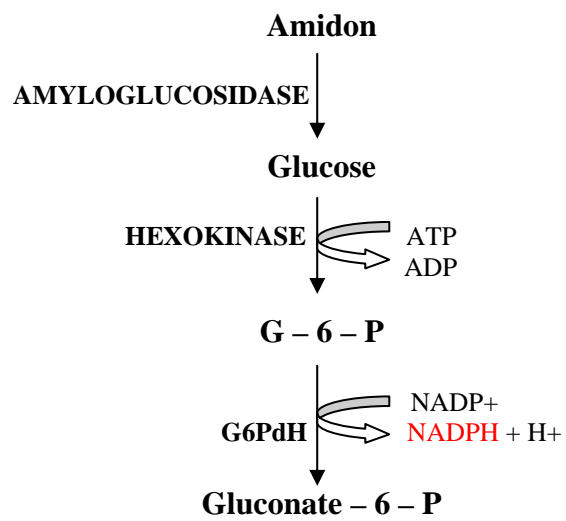


Figure 8 : Méthode de dosage de l'amidon par voie enzymatique en spectrophotométrie à 340 nm

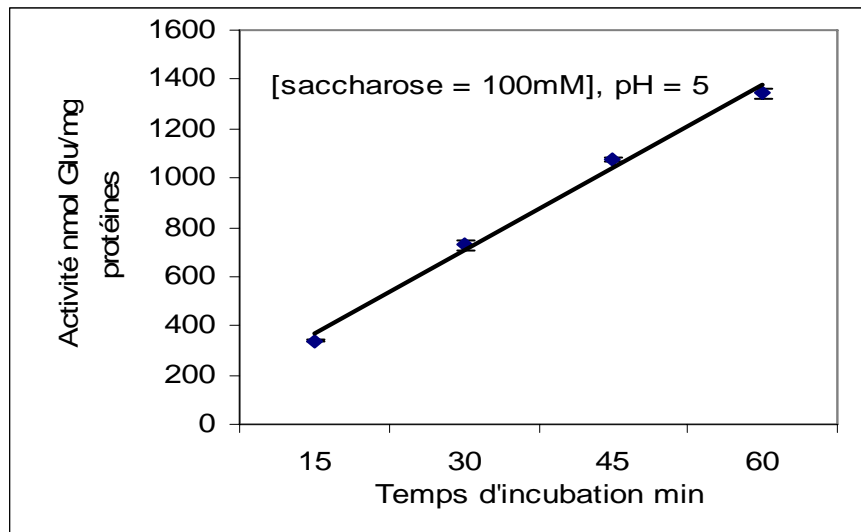
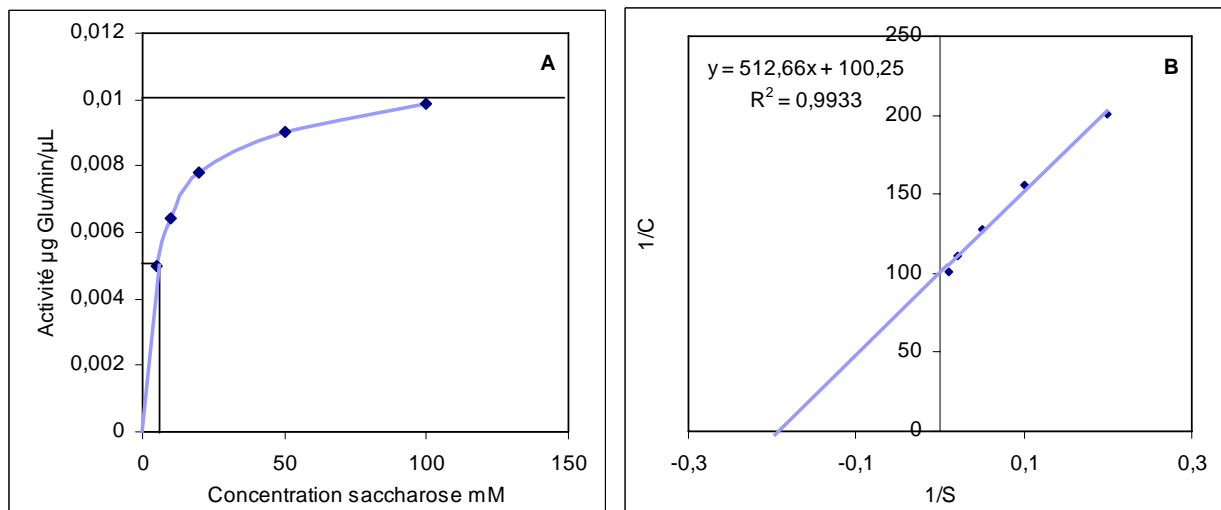


Figure 9 : Activité moyenne de l'invertase vacuolaire en fonction du temps d'incubation, exprimée en nmol de glucose/mg de protéines.



Figures 10A et 10B : Activité de l'invertase vacuolaire en fonction de la concentration en saccharose, exprimée en µg de glucose/min/µL d'extrait. A = Représentation classique avec le K_m situé à la $1/2V_{max}$. B = Représentation de Lineweaver et Burk, $1/V_{max} = f(1/S)$ et dans ce cas la droite résultante coupe l'axe des ordonnées pour $-1/K_m$.

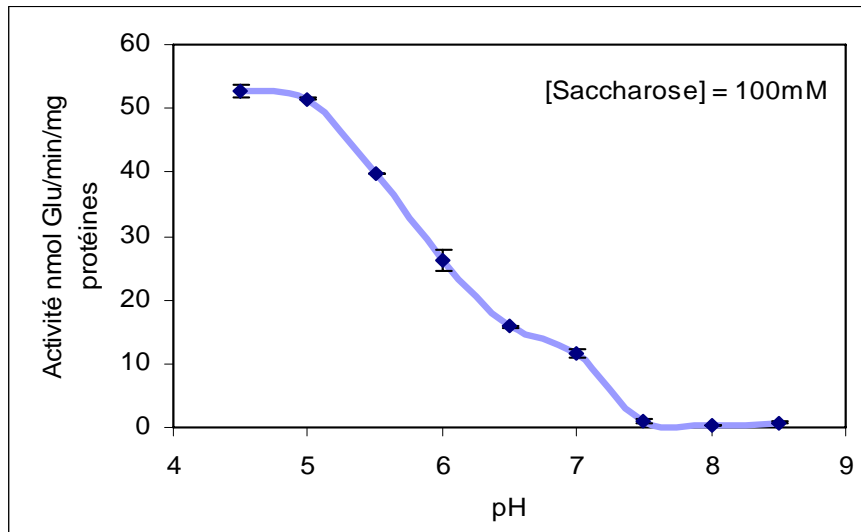


Figure 11 : Activité de l'invertase vacuolaire en fonction du pH du tampon d'activité, exprimée en nmol/min/mg de protéines.

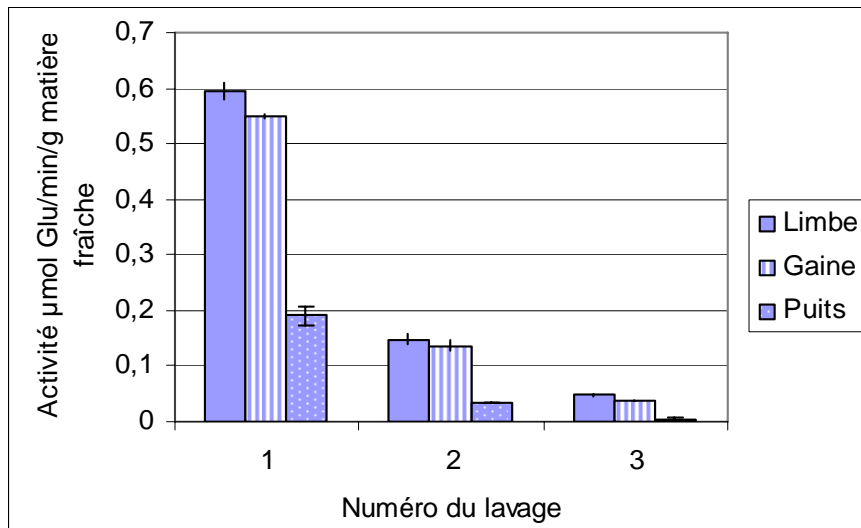


Figure 12 : Activité moyenne de l'invertase vacuolaire en fonction du numéro de lavage lors de l'extraction, exprimée en μmol de glucose/min/g de matière fraîche

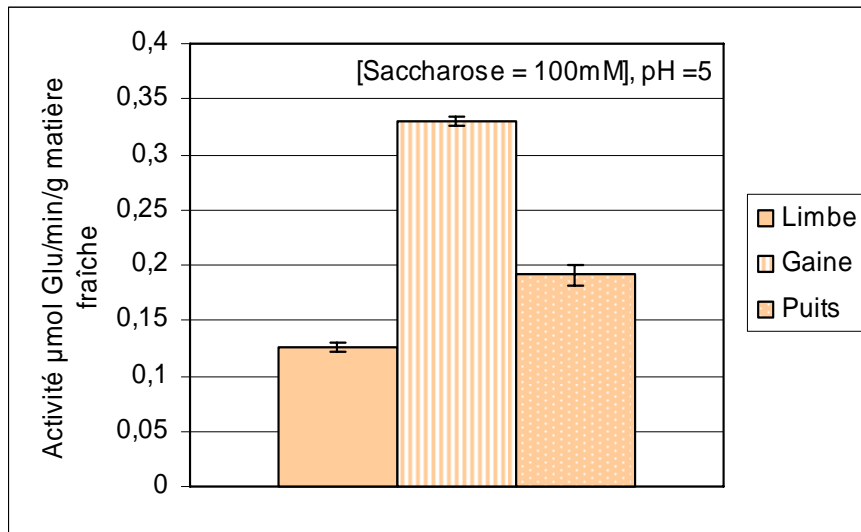


Figure 13 : Activité moyenne de l'invertase pariétale issue du dernier lavage en fonction de l'organe, exprimée en μmol de glucose/min/g de matière fraîche.

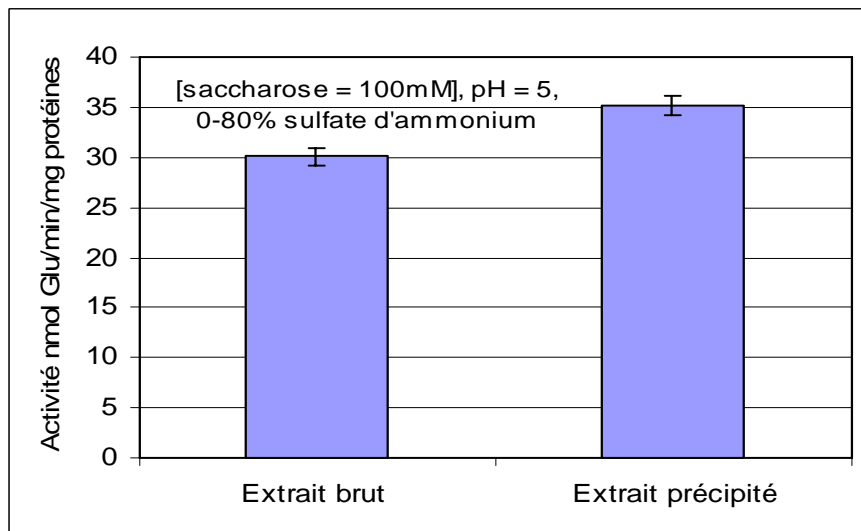


Figure 14 : Activité de l'invertase vacuolaire sur un extrait brut et sur un extrait précipité par sulfate d'ammonium 80 %, exprimée en nmol de glucose/min/mg de protéines.

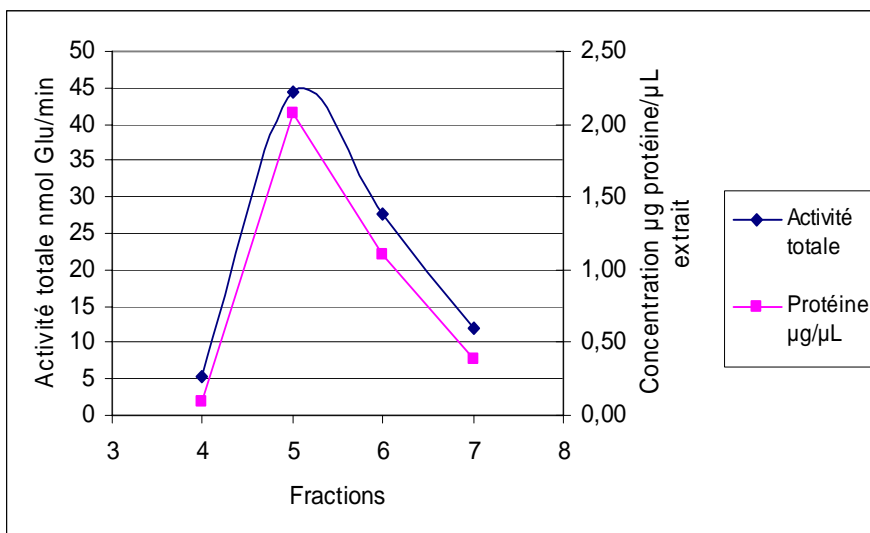


Figure 15 : Activité totale de l'invertase vacuolaire et concentration en protéines dans les fractions issues de la purification de l'extrait sur une colonne Sephadex G25, exprimée respectivement en nmol de glucose/min et en µg de protéines/µL d'extrait

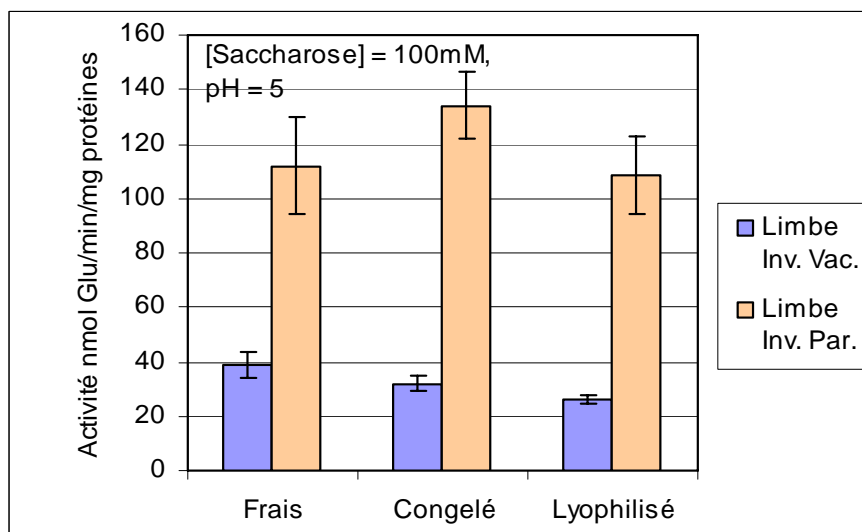


Figure 16 : Activité moyenne des invertases vacuolaire et pariétale sur le limbe en fonction du type de conservation (frais, congelé, lyophilisé), exprimée en nmol/min/mg de protéines.

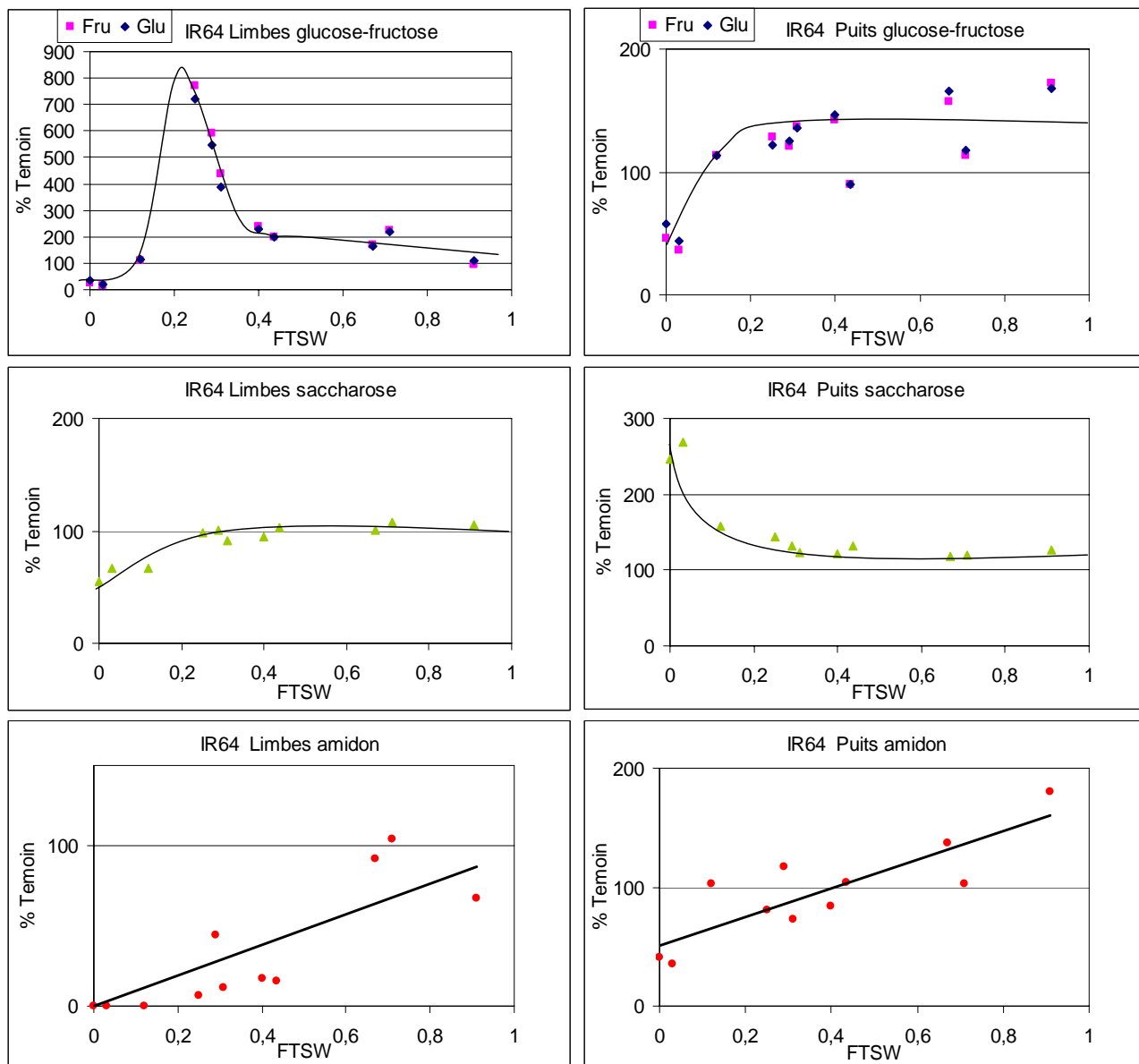


Figure 17 : Teneur en sucres solubles et en amidon en fonction de la FTSW sur les limbes et les puits du génotype IR64 soumis à un stress hydrique, exprimée en pourcentage de la moyenne de 3 témoins.

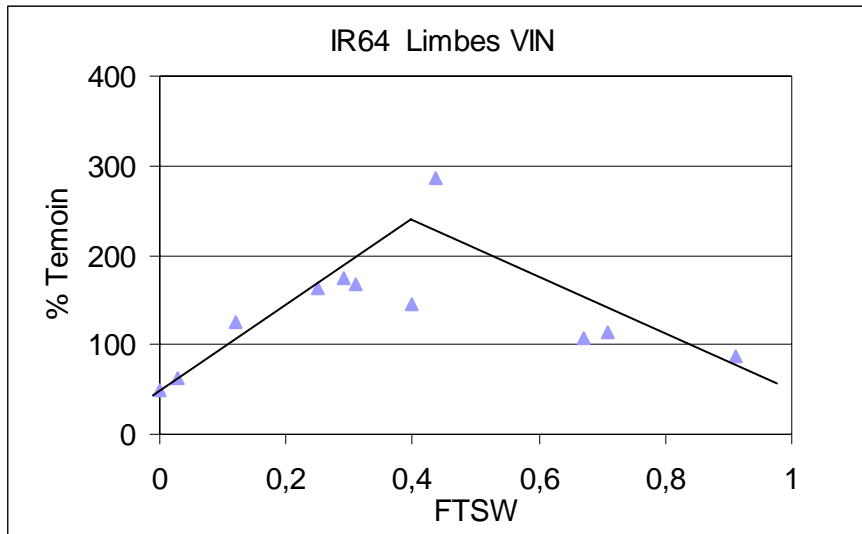


Figure 18 : Activité de l'invertase vacuolaire en fonction de la FTSW sur les limbes du génotype IR64 soumis à un stress hydrique, exprimée en pourcentage de témoin.

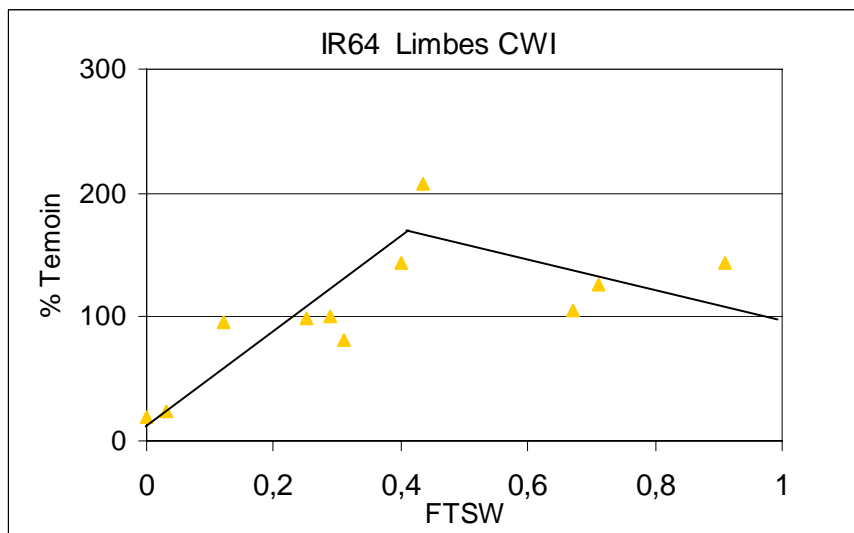


Figure 19 : Activité de l'invertase pariétale en fonction de la FTSW sur les limbes du génotype IR64 soumis à un stress hydrique, exprimée en pourcentage de témoin.