

République Algérienne Démocratique et populaire
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

N° d'ordre.....

N° de série.....



THESE

**EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES**

**OPTION
BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALE**

Thème

**Adaptation du chêne liège (*Quercus suber* L.) aux
conditions extrêmes de température**

Présentée par

RACHED-KANOUNI Malika

Devant le jury

Président : RAHMOUNE CHAABANE

Professeur Université CONSTANTINE 1

Encadreur : ALATOU DJAMEL

Professeur Université CONSTANTINE 1

Co-Encadreur : SAKR SOULIAMAN

Professeur I.R.H.S. ANGERS, FRANCE

Examineurs : OUDJHIH BACHIR

Professeur Université Hadj Lakhdar BATNA

BENTOUATI ABDELLAH

Professeur Université Hadj Lakhdar BATNA

DJEBAR MOHAMED REDA

Professeur Université Badji Mokhtar ANNABA

Année : 2012/2013

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui d'une façon ou d'une autre ont contribué à la réalisation de ma thèse:

Le Professeur AIATOU Djamel de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université Constantine) pour m'avoir proposé ce passionnant sujet de thèse. Je le remercie d'avoir su diriger et orienter mes travaux de recherche tout en me laissant une large marge de liberté pour mener à bien ce travail. Sa passion pour la recherche, son esprit innovateur et son dynamisme perpétuel sont exemplaires. Etre son étudiante fut un grand honneur.

Le Professeur SAKR Souliaman de l'Institut de Recherche en Horticulture et Semences d'Angers (France) qui a partagé cet encadrement de thèse. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son suivi, sa disponibilité, sa compréhension et pour ses encouragements continus. Je le remercie aussi pour sa patience et son sérieux lors de la correction de mon manuscrit.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent au président du jury le Professeur RAHMOUNE Chaabane de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université Constantine) de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury malgré tout ses engagements.

Mes remerciements vont également aux membres de mon jury, le Professeur OUDJHIH Bachir, le Professeur BENTOUATI Abdellah et le Professeur DJEBAR Mohamed pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

L'aboutissement de ce travail ayant impliqué plusieurs collaboration, je souhaiterais également exprimer toute ma gratitude à Mr J.L.Julien, directeur de l'UMR-PIAF, de m'avoir accueilli au sein de l'unité (Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand). Un grand merci à tous les membres du PIAF et plus particulièrement Marc Vendam, Brigitte Joanis et Brigitte Girard pour m'avoir accueillie si chaleureusement dans leur laboratoire, pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie pour les manip (HPLC), pour leur gentillesse, leur bonne humeur.

Je tiens également à remercier ma famille et mon mari qui m'a toujours soutenue dans mes études aussi bien financièrement que moralement.

Je désire terminer en remerciant mes amis, mes collègues et mes étudiants.

Dédicaces

A la mémoire de mon père

A la mémoire de ma mère

A la mémoire de ma belle mère

A mon mari

A toute ma famille

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Le stress chez les plantes.....	5
2. Les températures extrêmes.....	8
2.1. Les basses températures.....	8
2.1.1. Effet des basses températures sur les membranes.....	9
2.1.2. Effet des basses températures sur la synthèse de la chlorophylle et la photosynthèse.....	9
2.2. Les hautes températures.....	10
2.2.1. Effet des hautes températures sur les membranes.....	11
2.2.2. Effet sur la photosynthèse.....	12
3. Perception et transduction du signal stress.....	13
3.1. Perception du signal.....	13
3.2. Transduction du signal.....	15
3.2.1. Le calcium.....	15
3.2.2. L'acide abscissique (ABA).....	16
3.2.3. Les espèces activées de l'oxygène (EAO).....	17
3.2.4. Les MAPKs (Mitogen Protein Activated Kinase).....	19
3.2.5. Les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs).....	20
3.3. Les facteurs de transcription.....	20
3.4. Protection de l'intégrité de la cellule.....	27
3.4.1. Les protéines chaperonnes (HSP).....	27
3.4.2. Les protéines de type LEA (Late Embryogenesis Abundant).....	29
3.5. Accumulation d'osmolytes et de cryoprotecteurs.....	31
3.5.1. La proline.....	31
3.5.2. Les sucres solubles.....	33
3.5.3. L'amidon.....	34
3.5.4. Le quercitol.....	36
4. Caractéristiques générales du chêne liège.....	37
4.1. Caractères botaniques et forestiers.....	37
4.2. Caractères écologiques.....	37
4.3. Aire du chêne liège.....	38
4.4. Importance socio-économique des subéraies.....	39
4.5. Importance écologique.....	40
5. Croissance rythmique.....	41
6. Aspects et causes de dégradation du chêne liège.....	42

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Matériel végétal.....	45
1.1. Récolte.....	45
1.2. Germination.....	45
1.3. Culture en pots.....	45
2. Description des stades et choix de prélèvement du matériel végétal.....	45
3. Traitements appliqués.....	46
4. Analyse de la croissance.....	46

5. Analyses biochimiques.....	47
5.1. Dosage de sucres solubles, du quercitol et de l'amidon.....	47
5.1.1. Préparation du matériel végétal.....	47
5.1.2. Extraction.....	47
5.1.3. Préparation des résines (Annexe I.1).....	48
5.1.4. Filtration des sucres solubles sur le charbon actif.....	48
5.2. Amidon.....	49
5.2.1. Dispersion de l'amidon.....	49
5.2.2. Hydrolyse de l'amidon.....	50
5.3. Dosage de la proline.....	51
5.4. Dosage de protéines.....	51
5.4.1. Extraction.....	51
5.4.2. Dosage colorimétrique.....	52
5.4.3. Mode opératoire.....	52
6. Analyse statistique.....	53

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Résultats.....	55
1. Les basses températures.....	55
1.1. Croissance en hauteur, surface foliaire et nombre de feuilles.....	55
1.2. Repos apparent, allongement caulinaire et l'hétéroblastie.....	57
1.3. Les caractères biochimiques.....	61
1.3.1. La proline.....	61
1.3.2. Les protéines.....	63
1.3.3. Les sucres solubles.....	66
1.3.3.1. Le saccharose.....	66
1.3.3.2. Le glucose.....	69
1.3.3.3. Le fructose.....	72
1.3.4. Le quercitol.....	74
1.3.5. L'amidon.....	78
2. Les hautes températures.....	80
2.1. Croissance en hauteur, surface foliaire et nombre de feuilles.....	80
2.2. Les composantes temporelles.....	81
2.3. Les caractères biochimiques.....	83
2.3.1. La proline.....	83
2.3.2. Les protéines.....	86
2.3.3. Les sucres solubles.....	88
2.3.3.1. Le saccharose.....	88
2.3.3.2. Le glucose et le fructose.....	90
2.3.4. Le quercitol.....	93
3.5.5. L'amidon.....	95
3. Analyse en composantes temporelles.....	97
II. Discussion.....	99
Conclusion.....	116
Références bibliographiques.....	119
Annexes	
Publications	

Liste des abréviations

ABA	Acide Abscissique
AP2	Apetala 2
APX	Ascorbate Peroxydase
bHLH	Basic/Helix-Loop-Helix
Ca²⁺	Calcium
CBF	Crepeat Binding Factor
CDPK	Calcium Dependent Protein Kinase
cFBPase	Cytosolic Fructose 2.6 Biphosphatase
CRT/DRE	C-repeat/ Dehydration Responsive Element
COR	Cold-Responsive Protein
GPX	Glutathion Peroxydases
DREB	Dehydrogenase Response Element Binding
EAO	Espèces Activées de l'Oxygène
EREBP	Ethylen Response Binding Protein
GlyBet	Glycine Betaïne
HK	Histidine Kinase
HPt	Histidine Containing Phosphotransfer
HOS	High Expression of Osmotically Responsive Genes
HSC	Heat Shock Cognate
HSF	Heat Shock Factor
Hsp	Heat Shock Proteins
ICE	Inducer of CBF expression
ICEr	Induction of CBF Expression Region
LEA	Late Embryogenesis- Abundant
LOS	Low Expression of Osmotically Response Genes
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MGDG	Monogalactosyldiacylglycérole
MYB	Myéloblastose
MYC	Myélocytomatose
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydases
OEC	Oxygen evolving complex
PK	Protein Kinase
PSI, II	PhotosystèmeI, II
PX	Peroxydase
RAB	Response to ABA
RLK	Receptor Like Kinase
RPK	Receptor Like Protéines Kinase
ROS	Reactive Oxygen Species
Rubisco	Ribulose 1.5 Biphosphate Carboxylase Oxygenase
SAMK	Stress Actived MAPK
S1, 2 et 3	Stress 1, 2 et 3
SFR	Sensitive to Freezing
SOD	Superoxide Dismutase
SOS	Salt Overly Sensitive
SPS	Sucrose Phosphate Synthase
T	Tiges
V1	1 ^{ère} Vague de croissance
V2	2 ^{ème} Vague de croissance

Liste des figures

Figure 1 :	Représentation schématique de la réponse aux stress abiotiques chez les plantes (Wang <i>et al.</i> , 2003).....	7
Figure 2 :	Facteurs conditionnant la réponse de la plante à un stress (Bray <i>et al.</i> , 2000)	8
Figure 3 :	Représentation schématique d'un système de signalisation à deux composants (a) et d'un système de signalisation de phospho-relais à étapes multiples (b) d'après West et Stock (2001).....	14
Figure 4 :	Modèle représentant la perception de température, signal de traduction, activation de transcription et les composés de la tolérance au stress thermique (Sung <i>et al.</i> , 2003).....	21
Figure 5 :	Schéma de la transcription du signal du froid (Chinnusamy <i>et al.</i> , 2007).....	24
Figure 6 :	Rôles des HSF comme régulateurs de la réponse au stress thermique (Baniwal <i>et al.</i> 2004).....	28
Figure 7 :	Facteurs de dépérissement du chêne-liège (Amandier, 2006).....	43
Figure 8 :	Extraction des sucres.....	48
Figure 9 :	Dosage de protéines.....	53
Figure 10 :	Paramètres morphologiques : a : hauteur des tiges ; b : nombre de feuilles, c : surface foliaire.....	56
Figure 11 :	Morphogenèse d'un semis de chêne liège cultivé en conditions contrôlées à 25°C en jours longs de 16 heures (plant témoin).....	60
Figure 12 :	Morphogenèse d'un semis de chêne liège transféré à -2°C durant 3h (S1) puis retour en conditions initiales de culture.....	60
Figure 13 :	Morphogenèse d'un semis de chêne liège transféré à -2°C durant 9h (S3) puis retour en conditions initiales de culture.....	60
Figure 14 :	Teneur en proline chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures.....	62
Figure 15 :	Teneur en protéines totales chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures.....	65
Figure 16 :	Teneur en saccharose chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures.....	68
Figure 17 :	Teneur en glucose chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures.....	70
Figure 18 :	Teneur en fructose chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures.....	74
Figure 19 :	Teneur en quercitol chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures.....	77
Figure 20 :	Teneur en amidon chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures.....	79
Figure 21 :	Surface foliaire de la 3 ^{ème} vague de croissance de semis de chêne liège stressés...80	
Figure 22 :	Nombre de feuilles de la 3 ^{ème} vague de croissance de semis de chêne liège stressés.....	81
Figure 23 :	hauteur des tiges de semis du chêne liège stressés.....	82
Figure 24 :	Teneur en proline chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.....	85

Figure 25 :	Teneur en protéines chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.....	87
Figure 26 :	Teneur en saccharose chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.....	89
Figure 27 :	Teneur en glucose chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.....	92
Figure 28 :	Teneur en fructose chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.....	92
Figure 29 :	Teneur en quercitol chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.....	94
Figure 30 :	Teneur en amidon chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.....	96
Figure 31 :	Cercle de corrélations.....	97

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Les principaux domaines d'utilisation du liège.....	40
Tableau 2 :	Durées moyennes (en jours) des phases d'allongement de la tige, de repos apparent du bourgeon apical et ensembles foliaires des semis de chêne liège cultivés à 25°C ± 2°C, en jours longs de 16h, (n=7).....	57
Tableau 3 :	Durées moyennes des phases d'allongement de la tige et de repos apparent (en jours) des semis de chêne liège cultivés à 25°C en jours longs de 16h et transférés pendant 3h (S1), 6h (S2) et 9h (S3) aux basses températures.....	58
Tableau 4 :	Durées moyennes des phases d'allongement de la tige et (A.C) de repos apparent (R.A) (en jours) des semis de chêne liège cultivés à 25°C en jours longs de 16h et transférés pendant 3h (S1), 6h (S2) et 9h (S3) aux hautes températures.....	83
Tableau 5 :	Matrice de corrélations.....	98

INTRODUCTION

Introduction

L'aire de végétation du chêne liège est circonscrite à la région de la Méditerranée occidentale, dans laquelle, sous l'influence de l'océan Atlantique et de la mer Méditerranée, se trouvent réunies les conditions climatiques qui conviennent à la végétation de cet arbre (Seigue, 1985). En Algérie, cette essence naturelle est l'une des plus notables parmi les formations forestières mais aussi l'une des plus précieuses compte tenu de l'indéniable rôle que joue la subéraie sur le plan environnemental (antiérosive, résistance aux incendies, séquestration du carbone et la lutte contre l'effet de serre) et socio-économique (qualité de son bois et de son écorce).

En effet, l'Algérie fournit 5% de la production mondiale du liège. Cette formation, malgré sa valeur, connaît une dégradation continue et alarmante se traduisant par une régression de sa surface de 440 000 à 229 000 hectares considérés actuellement comme productifs (soit 10% de la couverture mondiale) (Harfouche *et al.*, 2003). Cette régression est le résultat d'une mauvaise gestion combinée aux changements climatiques affectant la production de liège et ceux limitant la régénération naturelle. Le climat Algérien de type Méditerranéen est caractérisé par une irrégularité qui se manifeste par la perturbation des régimes des précipitations et l'augmentation de la température. Les projections des précipitations et des températures aux horizons de 2020 et 2050 pour la Méditerranée prévoient une baisse plus importante des précipitations et une augmentation de températures moyennes (Gracia, 2006 in Rego, 2006), tout comme une modification de leur répartition (été secs et chauds, aggravant les conditions de sécheresse, et augmentant la fréquence des événements climatiques extrêmes). Le fonctionnement écophysologique du chêne liège est fortement affecté par ces différents bouleversements climatiques comme en atteste les travaux de Ghouil *et al.* (2003) et Haldimann et Feller (2004) qui traitent l'effet de température sur les mécanismes photosynthétiques du chêne liège. D'autres paramètres ont aussi fait l'objet de plusieurs sujets de recherche tels que l'augmentation du CO₂ atmosphérique (Damesin *et al.*, 1996), le stress hydrique (Flexas et Medrano, 2002), l'augmentation de la lumière (Aranda *et al.*, 2007), l'effet combiné du stress hydrique et lumineux (Puértolus *et al.*, 2008) et l'effet de basses températures sur le métabolisme du chêne liège (Rached-Kanouni *et al.*, 2012).

Pour remédier à cette situation, des actions de reboisement à base de plants de qualité doivent être entreprises (El Kbiach, 2002), vu que la régénération artificielle du chêne liège est confrontée au problème de dépérissement et de mortalité des jeunes plants (Merouani *et al.*, 2001 ; Nadjeh, 2010).

Ces actions de reboisement des forêts passent inéluctablement par la maîtrise de l'introduction des semis de chêne liège, impliquant une meilleure appréhension de la réponse de cet arbre aux contraintes abiotiques locales. Le présent travail s'inscrit dans ce contexte en se focalisant sur les conséquences de certains aspects du changement climatique, à savoir les températures extrêmes sur le comportement physiologique et morphologique des semis de chêne liège. Pour cela, nous nous sommes intéressés d'une part aux changements relatifs à l'expression spatio-temporelle (durée d'allongement, repos apparent et l'hétéroblastie), paramètres morphologiques (hauteur de tige, nombre de feuilles et surface foliaire) et d'autre part à l'évolution des principaux marqueurs biochimiques de la tolérance aux températures extrêmes (basses et hautes températures) tels que les sucres solubles (glucose, fructose, saccharose), le quercitol, les protéines totales, la proline et l'amidon dans les différents organes de la plante. Ceci dans le but de répondre aux questions suivantes :

i)- parmi les semis de chêne liège ayant subi des températures extrêmes, quels sont ceux ayant les capacités d'adaptation et de tolérance à la variabilité thermique ?

ii)- quels rôles joueront les températures extrêmes dans un contexte de changement climatique afin de déterminer :

- L'éventail thermique de cette espèce

- La sélection d'un matériel végétal mieux adapté aux contraintes thermiques causées par ces températures sur des critères morphologiques et des marqueurs biochimiques mesurés en fonction de ces températures ;

- L'espèce chêne liège peut-elle mieux tirer profit de ces températures extrêmes en durée et en intensité?

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le stress chez les plantes

La notion de stress implique, d'une part, une déviation plus ou moins brusque par rapport aux conditions normales de la plante ou de l'animal ; et d'autre part une réaction sensible de l'individu dans les différents aspects de sa physiologie. Cette réaction change sensiblement, avec une adaptation à la nouvelle situation, soit à la limite, une dégradation menant à une issue fatale (Eclerc, 1999). En effet, le végétal possède des mécanismes qui peuvent empêcher ou retarder l'action de la contrainte, mais si la contrainte atteint le contenu cellulaire, il devra réagir et montrer une «tolérance » puis une « adaptation ». L'analyse de la spécificité des mécanismes de perception de stress, de la transduction du signal « stress » et de l'acquisition des modes de résistance, ont fait l'objet de plusieurs études, à différents niveaux, allant de la plante jusqu'aux processus moléculaires.

L'analyse de la réponse globale permet, en particulier, de prendre en compte les effets physiologiques qui ne sont pas spécifiques à une nature précise de stress. Selye (1973 in Eclerc, 1999) dégage la notion de syndrome de stress qui recouvre l'équilibre qui apparaît entre, d'une part, les processus de destruction « distress » qui sont l'effet direct des contraintes sur le fonctionnement des cellules et les processus d'adaptation « eustress », d'autre part, qui tendent à éviter l'issue létale et à retrouver l'état d'origine (homéostasie). Le lien stress-homéostasie-adaptation va perdurer jusqu'à nos jours et les recherches menées concernant ces processus sont à la base d'une littérature abondante (Roeder, 2006). L'association de ces trois notions constitue l'approche biologique du stress, permet notamment d'expliquer l'influence de celui-ci et de déterminer certaines limites, l'adaptation à l'environnement, et donc au maintien de la vie.

Les plantes sont généralement soumises à des stress qui se traduisent par des changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui affectent négativement la croissance de la plante et de sa productivité (Wang *et al.*, 2001; Araus *et al.*, 2002).

Du fait de leur caractère immobile, les plantes ont développé un ensemble de mécanismes multifactoriels qui leur permettent de percevoir et de répondre spécifiquement aux différentes contraintes auxquelles elles sont soumises. Parmi ces contraintes, on trouve les stress biotiques (champignons, bactéries, virus...) (Léger, 2010) et abiotiques (blessures, pollution, salinité, sécheresse, températures extrêmes...) (Gómez *et al.*, 2005).

Les stress abiotiques induisent des changements physiologiques (Langridge *et al.*, 2006) et des changements dans les processus cellulaires et moléculaires (Knight et Knight, 2001; Chinnusamy *et al.*, 2004; Chinnusamy *et al.*, 2006; Verslues *et al.*, 2006; Talame *et al.*, 2007).

Les plantes mettent donc en œuvre des stratégies d'adaptation et de défense aux stress (Netting, 2002). Pour cela, elles possèdent des mécanismes de perception et de signalisation très complexes (Figure 1), leur permettant de produire une réponse plus ou moins spécifique du type de stress (Wang *et al.*, 2003).

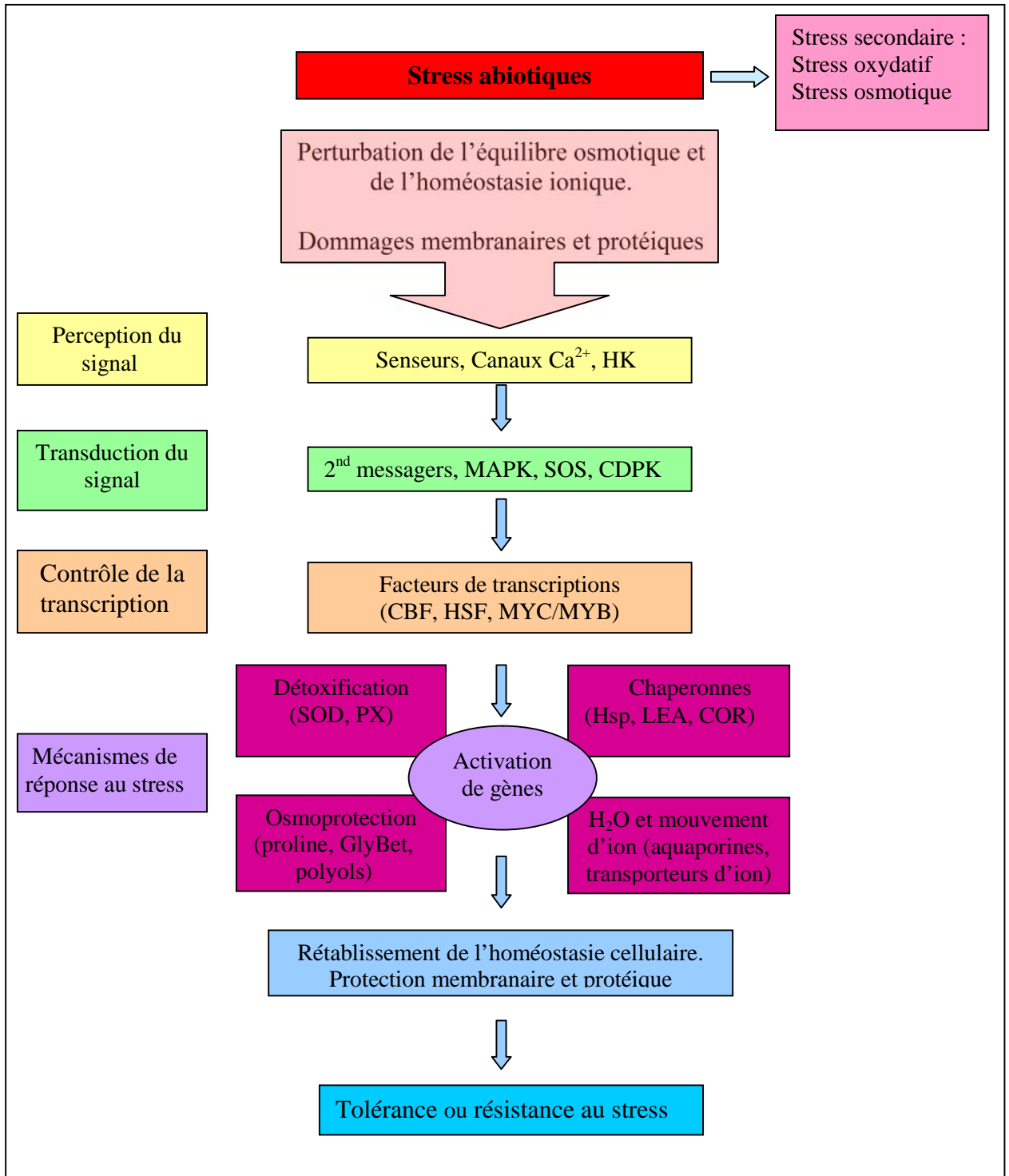


Figure 1 : Représentation schématique de la réponse aux stress abiotiques chez les plantes (Wang *et al.*, 2003). Ca^{2+} : Calcium, HK: Histidine Kinase, MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase, SOS: Salt Overly Sensitive, CDPK: Calcium Dependent Protein Kinase, CBF: Crepeat Binding Factor, HSF: Heat Shock Factor, MYC: Myélocytomatose, MYB: Myéloblastose, SOD: Superoxyde Dismutase, PX: peroxydase, Hsp: Heat Shock Proteins, LEA: Late Embryogenesis-Abundant, COR: Cold-Responsive Protein, GlyBet: glycine bétaine.

2. Les températures extrêmes

Dans le règne végétal, la température fait partie des contraintes environnementales les plus importantes. Elle est responsable de la distribution et de la productivité des plantes. Certaines espèces possèdent des propriétés physiologiques qui leur confèrent une meilleure tolérance aux variations thermiques, notamment aux situations les plus extrêmes, des basses et des hautes températures (Sung *et al.*, 2003).

2.1. Les basses températures

La réponse des plantes aux basses températures dépend des caractéristiques du stress et de la plante (Figure 2). Un stress se caractérise par sa contrainte (intensité), sa durée, du nombre d'expositions ainsi que par son association à d'autres stress (biotique et abiotique).

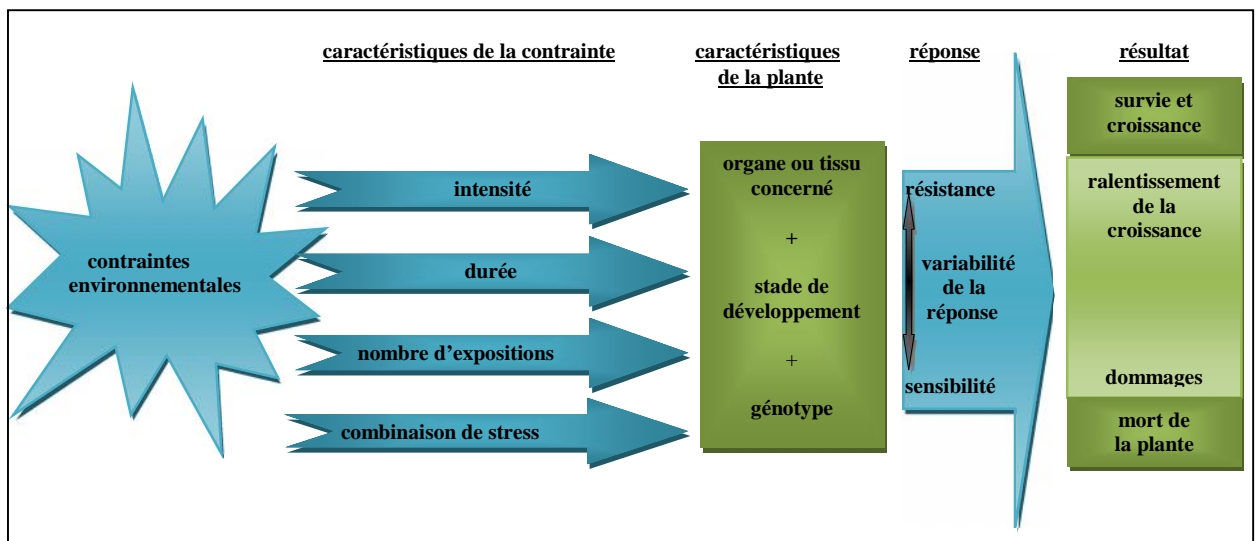


Figure 2: Facteurs conditionnant la réponse de la plante à un stress (Bray *et al.*, 2000).

Les espèces sont divisées en trois catégories (Pearce, 1999). Les plantes tolérantes au gel qui sont capables de s'acclimater pour survivre à des températures inférieures à 0°C. Les plantes tolérantes au froid mais sensibles au gel qui sont capables de s'acclimater à des températures inférieures à 12°C. Les plantes sensibles au froid pour lesquelles des températures inférieures à 12°C entraînent des dommages importants. Quand les plantes sont soumises à des températures sub optimales (entre 10°C et 20°C), la croissance et le développement ralentissent. Par contre, quand elles sont placées à des températures dites froides (entre 0 et 10°C), des dommages

tissulaires et cellulaires apparaissent alors que les parties aériennes meurent à des températures négatives. Au niveau de la plante, la réponse varie en fonction du stade de développement, des organes ou des tissus concernés.

2.1.1. Effet des basses températures sur les membranes

Les membranes biologiques sont surtout constituées de lipides. Ces derniers forment une bicouche composée d'acides gras insolubles, à l'intérieur des membranes, dont chacun est accroché à une tête polaire faisant face à un environnement aqueux (Bohnert *et al.*, 1999 in Badawi, 2008). Une baisse de température diminue la fluidité des lipides et par conséquent celle des membranes biologiques.

Les organismes poïkilothermes, dont font partie les plantes, ont développé des mécanismes permettant de moduler la fluidité des membranes en fonction de la température et des mécanismes protégeant ces membranes contre l'effet des extrêmes. L'un des cas les plus frappants est celui des cyanobactéries (Murata et Los, 1997) où la désaturation des acides gras se produit seulement lorsque les lipides sont formés, et non sur les acides gras seuls. Chez ces organismes une baisse de 10 à 15°C de la température de culture arrête la croissance et la synthèse des acides gras durant 10 heures environ. Durant cette période les acides gras des membranes sont désaturés. Lorsque leur degré d'insaturation devient suffisant, les cellules reprennent leur croissance et la synthèse des acides gras redémarre. Si par contre la température de culture est augmentée, leur degré d'insaturation diminue parce qu'il n'y a plus de désaturation des lipides existants et parce qu'il se produit une synthèse rapide d'acides gras saturés.

2.1.2. Effet de basses températures sur la synthèse de la chlorophylle et de la photosynthèse

La tolérance au froid proviendrait de la capacité des génotypes à maintenir une forte concentration en pigments, et à former un appareil photosynthétique fonctionnel à basses températures. Un génotype tolérant conserverait une activité photosynthétique, une quantité de chlorophylles a et b et un rapport a/b suffisant pour continuer sa croissance sans pour autant subir des dommages photooxydatifs. Au niveau de la composition en xanthophylle, les génotypes sensibles accumulent la zéaxanthine tandis que les génotypes tolérants privilégient la

violaxanthine. Cela suggère que les besoins en dissipation d'énergie seraient plus importants chez les génotypes sensibles que chez les tolérants (Haldimann, 1999).

La modification de la composition et des teneurs en pigments seraient donc un caractère d'adaptation au milieu (Foyer *et al.*, 2002). Face à des températures sub-optimales (environ 15°C), les plantes réduisent leur teneur en chlorophylle a et b et accumulent de la zéaxanthine et de l'anthéaxanthine (produites à partir de la violaxanthine) (Haldimann, 1999). Chez les mutants *virescents* (retard dans l'acquisition de la couleur verte), les teneurs en xanthophylles et le quenching non photochimique sont corrélés positivement. Les mutants pour lesquels le pool de xanthophylle est maintenu à un niveau équivalent à celui du génotype sauvage présentent les mêmes flux tout en ayant moins de chlorophylle. Les xanthophylles permettraient la dissipation thermique de l'excès d'énergie et donc limiterait la formation de ROS (reactive oxygen species) (Pasini *et al.*, 2005). Lors d'une exposition prolongée à des températures sub-optimales, le même phénomène interviendrait pour protéger les composants cellulaires des plantes. Le stress provoque l'apparition de chlorose mais aucun phénomène de photoinhibition n'est constaté.

Lors d'un stress, la formation d'électrons au niveau du photosystème II (PSII) n'est pas sans risque pour la plante (De Ronde *et al.*, 2004). Plus les températures sont froides, et plus il y aura des EAO (espèces activées de l'oxygène) formées. Les électrons sont formés en excès par rapport à ce qui peut être consommé dans la synthèse des sucres. La photorespiration et le transport cyclique de détoxification doivent être efficaces. C'est ce qui semble se produire lorsque les températures diminuent car il y a une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) (Bolwell *et al.* 2002 ; Mittler, 2002) et des teneurs en ascorbate, en glutathion et en -tocophérol (Kingston-Smith *et al.*, 1998 ; Kocsy *et al.*, 2001). La tolérance au froid proviendrait de la capacité des génotypes à maintenir une forte concentration en pigments, à maintenir et à former un appareil photosynthétique fonctionnel à basses températures.

2.2. Les hautes températures

Les hautes températures pendant un temps suffisant (exemple de durée) endommagent irréversiblement la fonction ou le développement des plantes. Elles peuvent être endommagées par des températures élevées de l'air ou celles du sol (Sung *et al.*, 2003). La contrainte due à la chaleur thermique est une fonction complexe qui varie selon l'intensité de la température (durée et fréquence).

L'effet du stress thermique augmente rapidement à mesure que la température augmente au dessus d'un seuil et les effets complexes d'acclimatation peuvent se produire et dépendent de la température ainsi que d'autres facteurs environnementaux. En outre, les espèces diffèrent dans leur sensibilité aux températures élevées.

Les températures extrêmes peuvent causer la mort prématurée des plantes, réduisent la croissance et limitent la productivité. Les évaluations s'étendent jusqu'à une diminution de 17 % du rendement pour chaque augmentation en moyenne d'un degré Celsius de la température (Lobell et Asner, 2003).

2.2. 1. Effet des hautes températures sur les membranes

Une hausse de température augmente la fluidité des membranes. Pour une température fixée, la fluidité des membranes dépend en premier lieu du degré de saturation des acides gras qui entrent dans la formation des lipides. Lorsque les acides gras sont saturés, ils ont un point de fusion élevé et les membranes dont ils sont une partie sont rigides. Lorsqu'ils ne sont pas saturés, leur point de fusion est situé à température plus basse et les membranes dans lesquelles ils se trouvent sont plus fluides par comparaison (Cornic *et al.*, 1999).

La membrane du thylacoïde est particulièrement fluide : elle contient une forte teneur d'acide gras possédant deux ou trois doubles liaisons. Ce sont surtout des glycérolipides qui ont une tête hydrophile formé d'un sucre, le galactose par exemple et dont les acides gras sont au 2/3 formés par l'acide ω -linoléique (16: 3) ou une combinaison de cet acide et de l'acide hexadécatriénoïque (16: 3). Ces deux acides gras rentrent aussi dans la composition de 90% du monogalactosyldiacylglycérole (MGDG) qui est le lipide majeur du thylacoïde.

Dans les environnements naturels, les températures des feuilles changent largement pendant le jour et dans le temps. Les plantes s'adaptent à la température de l'air à long terme principalement par des changements de la température optimale du transport photosynthétique d'électrons (Yamori *et al.*, 2005). La membrane des thylakoides est un système relativement liquide et il est essentiel pour la diffusion du produit photosynthétique. Cependant, cette caractéristique de la membrane est très vulnérable aux températures élevées. Elles induisent des dommages de la membrane, dû à l'hyper-fluidité des lipides et des changements dans les

interactions lipide-protéine qui causent plus tard la dénaturation des protéines (Pália *et al.*, 2003) et la synthèse *De novo* protéine et de lipides (Havaux, 1993).

La contrainte aux hautes températures peut causer aussi un stress d'oxydation par la production par exemple de radicaux de superoxide et le peroxyde d'hydrogène. L'oxygène réactive peut causer la peroxydation des lipides (dommages des membranes de cellules) et dégrade l'appareil photosynthétique (Smirnoff, 1993; Foyer *et al.*, 1994). La désintégration de la membrane est un symptôme primaire des dommages de la chaleur. Dans ce sens, l'essai de conductivité a été proposé, basé sur la thermostabilité comme un indicateur de thermotolérance des plantes (Shanahan *et al.*, 1990 in Oukarroum, 2007).

2.2.2. Effet sur la photosynthèse

Pendant les stades végétatifs des plantes, les températures élevées peuvent endommager des composants de l'appareil photosynthétique des feuilles, réduisant ainsi les taux d'assimilation d'anhydride carbonique comparés aux environnements ayant des températures optimales. La sensibilité de la photosynthèse à la chaleur principalement, peut être due aux dommages des composants du PSII situé dans les membranes des thylakoïdes et aux propriétés des chloroplastes et des membranes (Al-Khatib et Paulsen, 1999).

L'exposition des plantes à des températures élevées provoque de nombreux changements de la structure et de la fonction du PSII. Généralement, le donneur et l'accepteur d'électron de PSII sont plus sensibles aux hautes températures que PSI. La sensibilité des plantes aux hautes températures est étroitement liée à la stabilité thermique de PSII. La thermotolérance des membranes a été évaluée en mesurant la fluidité d'électrolyte à partir des disques de feuilles soumis aux températures extrêmes (Blum, 1980). A des températures élevées, la fonction de PSII peut être affectée, mais ces effets ne sont pas rapidement réversibles. Elles impliquent la désactivation du Rubisco et l'inactivation du métabolisme photosynthétique de carbone. Le dégagement de l'oxygène est l'une des réactions les plus sensibles au traitement à hautes températures chez les plantes et les algues. Les températures élevées sont habituellement considérées comme une des influences externes les plus importantes affectant la capacité photosynthétique globale des tissus photosynthétiques et les fonctions spécifiques de divers composants d'appareils photosynthétiques (Bukhov et Mohanty, 1999).

La fluidité excessive des lipides des membranes à températures élevées est corrélée avec la perte de la fonction physiologique. Le stress thermique change l'activité photosynthétique qui est dû aussi à la suppression du transport d'électrons de chloroplaste et l'inhibition du cycle Calvin (Feller *et al.*, 1998). La sensibilité des plantes aux hautes températures est étroitement reliée à la stabilité thermique de PSII (Guissé *et al.*, 1995 ; Jiang *et al.*, 2006).

3. Perception, transduction du signal stress

3.1. Perception du signal

Les conditions de stress abiotique constituent une source des signaux complexes pour les cellules. Un seul type de stress correspond à des variations physiques et/ou chimiques. Ces composantes représentent pour la plante des informations différentes. Par exemple, une diminution de température entraîne des contraintes mécaniques, un changement dans l'activité des macromolécules, ainsi que des modifications des conditions osmotiques du milieu extracellulaire. Les cellules végétales ne possèdent pas un récepteur spécifique d'un stress donné, mais plutôt un ensemble de récepteurs qui vont être sollicités par les différentes composantes du stress (Roeder, 2006).

Les premiers sont liés à la membrane et la paroi : les arabinogalactanes, la cellulose synthase et les RLK (Receptor Like Kinase). Des RLK ont été identifiés par la réponse au stress chez *Arabidopsis thaliana*. Par exemple, les RPK (Receptor Like Protéines Kinase) sont induits par le froid, l'apport d'acide abscissique ou d'autres stress abiotiques. Les histidines kinases (HK) représentent un autre récepteur du stress identifié chez les bactéries et les plantes. Ces enzymes transmettent un signal externe vers l'intérieur de la cellule par un système de phospho-relais à 2 composants. Un système analogue, mais comprenant plus de 2 composants a été identifié chez les levures et les plantes. Ce système fonctionne de façon similaire au système à 2 composants mais inclut un ou plusieurs intermédiaires entre le récepteur membranaire et le facteur de transcription (Figure 3). Ces éléments intermédiaires sont nommés HPt (Histidine Containing Phosphotransfer) (Urao *et al.*, 2000).

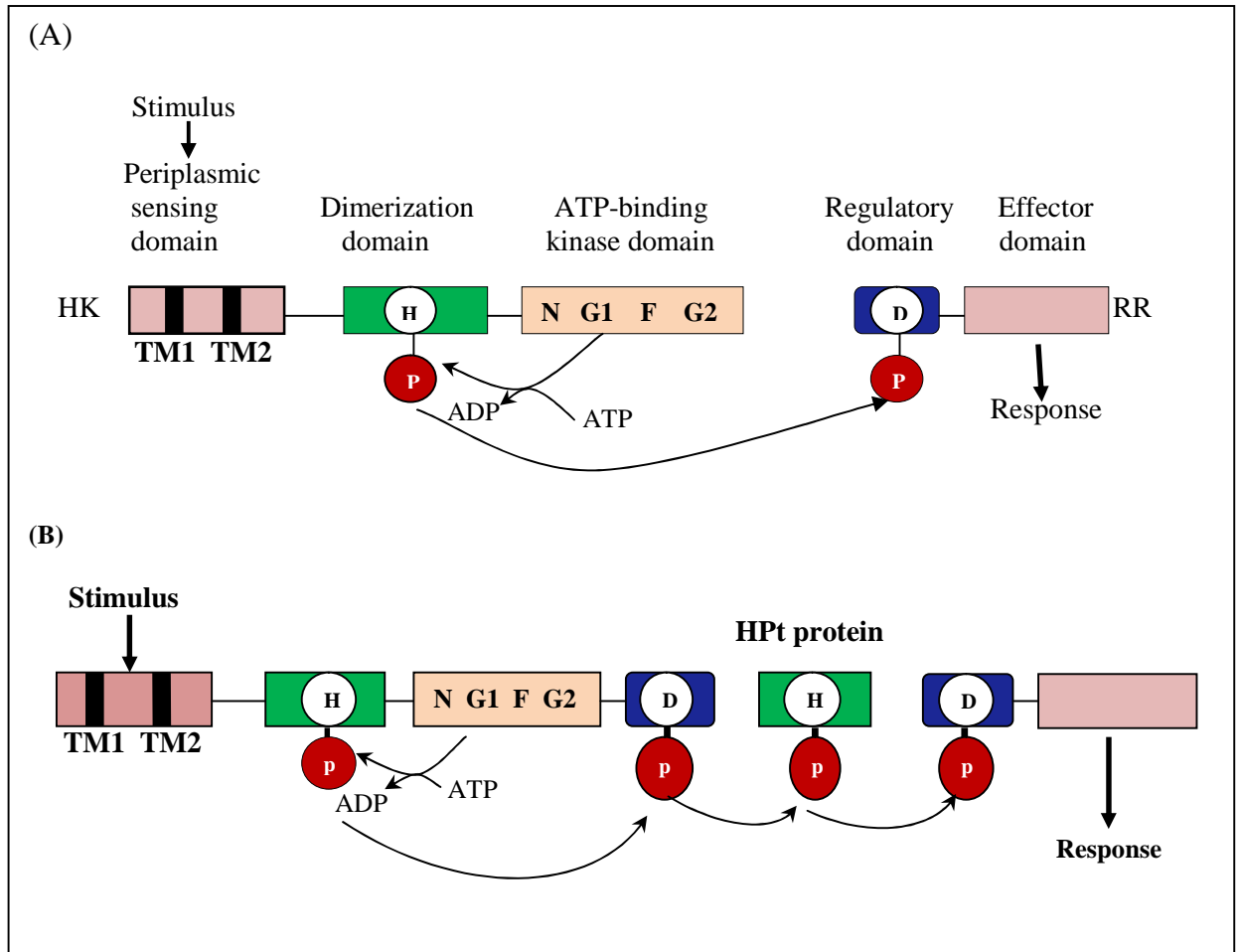


Figure 3 : Représentation schématique d'un système de signalisation à deux composants (a) et d'un système de signalisation de phospho-relais à étapes multiples (b) d'après West et Stock (2001). TM : segments transmembranaires, H : résidu histidine, D : résidu aspartate, P : groupement phosphorylé, les boîtes N, G et F sont indiquées ainsi les acides aminés conservés (G : glycine, F : phénylalanine et N : n'importe quel acide aminé) pour les histidine kinases (HK) et les régulateurs de réponse (RR).

Les deuxièmes récepteurs réagissent aux déformations de la membrane qui entraînent une ouverture des canaux calcium, provoquant un influx d'ions entrant dans la cellule (Badawi *et al.*, 2007). En condition de stress thermique ou salin, il a été observé chez les plantes un influx de calcium (Ca^{2+}) dans le cytoplasme. Ce calcium provient soit de l'extérieur de la cellule, soit de stocks internes (Knight et Knight, 2001). Cet influx résulterait d'une activation des canaux calciques induite par les changements structuraux de la cellule. Cette supposition résulte des études de Plieth (2001) montrant les liens entre les flux de Ca^{2+} et la température, considérant que la réorganisation du cytosquelette et la fluidité membranaire plasmique sont les premiers changements structuraux liés au froid. En effet, si l'entrée des ions Ca^{2+} est inhibée, la tolérance

aux basses températures diminue (Sung *et al.*, 2003). Les ions Ca^{2+} activent d'autres processus de réponse (activation des phospholipases). Enfin, lors de leur dégradation par les phospholipases, les phospholipides membranaires génèrent des molécules signal comme l'IP3 (inositol-1,4,5-triphosphate) et l'acide phosphatidique. Le diacylglycérol est synthétisé à partir de l'acide phosphatidique qui est une molécule signal. Les phospholipases sont activés par les ions Ca^{2+} et l'acide abscissique (ABA).

Il existe plusieurs formes de phospholipases (PL), (PLA), (PLC) et (PLD). En fonction des phospholipases actives, elles peuvent conduire à un réarrangement au niveau des membranes où la mort de la cellule. Les phospholipases sont aussi à l'origine d'une augmentation des formes actives d' O_2 dont l'accumulation peut provoquer de la peroxydation des lipides membranaires (Touchard, 2006).

3.2. Transduction du signal

Suite à la perception du stress, via des senseurs plus ou moins spécifiques, le signal émis est transmis au reste de la plante (Knight et Knight, 2001 ; Chinnusamy *et al.*, 2004). Chez les végétaux, le principal second messenger est le calcium (Sanders *et al.*, 1999 ; Knight et Knight, 2001) et parmi les principales molécules impliquées dans la transduction du signal, on trouve l'acide abscissique (ABA) (Leung et Giraudat, 1998) et les EAO (espèces activées de l'oxygène) (Lamb et Dixon, 1997). La stimulation de la cascade de signalisation engendre notamment des modifications de l'expression d'un certain nombre de gènes permettant ainsi le rétablissement de l'équilibre cellulaire (Kreps *et al.*, 2002 ; Ozturk *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002 ; Wang *et al.*, 2003). Dans tous les cas, la réponse au stress est liée à la capacité de la plante à le percevoir, à transmettre le signal et à activer les différentes voies métaboliques.

3.2.1. Le calcium

L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} libre dans le cytosol est un événement précoce de la perception du stimulus. Le Ca^{2+} est le second messenger principal dans la réponse aux stress abiotiques (Sanders *et al.*, 1999 ; Magnan *et al.*, 2008).

L'augmentation de Ca^{2+} engendre toute une cascade de processus contrôlés par des senseurs calciques. Ces senseurs sont des calmodulines, impliquées dans la réponse au froid, au stress oxydatif ou à une stimulation mécanique (Hong-Bo *et al.*, 2008), des CDPKs (Ca²⁺ dependent protein kinases) impliquées dans la réponse au stress froid, salin et à la sécheresse (Saijo *et al.*, 2000 ; Harmon *et al.*, 2001) et des phosphatases régulées par le Ca^{2+} comme par exemple les serine/thréonine phosphatases ou les calcineurines B-like qui interviennent également lors de stress salin ou froid (Bartels et Sunkar, 2005).

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} induit en partie la cascade des MAPKs (Mitogen- Activated Protein Kinases) en réponse au froid, à la sécheresse, au stress oxydatif ou à une stimulation mécanique (Xing *et al.*, 2007 et 2008). Selon le stress ce sont les différentes MAPKKs qui sont activées et qui vont phosphoryler certaines MAPKKs. Ces dernières vont engendrer l'activation de MAPKs variées en fonction du stress perçu (Chini *et al.*, 2004). Les combinaisons entre ces activations dans la cascade des MAPKs pourraient coder la spécificité de la réponse selon le stress appliqué (Knight et Knight, 2001).

3.2.2. L'acide abscissique (ABA)

L'ABA est une hormone végétale qui est connue pour intervenir en réponse à différents stress. Chez les végétaux, on peut trouver l'ABA sous forme libre ou conjuguée, majoritairement sous forme d'ABA glucosyl-ester (ABA-GE). Il est actuellement connu que l'ABA est principalement synthétisé dans les feuilles puis peut être chargé dans le phloème et transporté vers les racines. Dans ces dernières, une partie peut être stockée dans le tissu et l'autre partie est remise en circulation dans les vaisseaux du xylème. Chez le Cacaoyer, espèce à croissance rythmique, il a également été montré que les jeunes feuilles constituaient la principale source d'ABA, qui est transporté à travers la tige vers l'apex (Park *et al.*, 2009).

L'ABA régule plusieurs aspects du développement de la plante comme la germination des graines, la dormance ainsi que la tolérance à la dessiccation des graines, mais il joue aussi un rôle majeur dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques (Chinnusamy *et al.*, 2004 ; Christmann *et al.*, 2006 ; Wasilewska *et al.*, 2008). Ainsi, il régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la résistance au froid, au choc osmotique ou encore à la déshydratation (Xiong *et al.*, 2001).

Des plantes soumises à des conditions de sécheresse et de stress osmotique produisent de l'ABA comme signal endogène de réponse adaptative au stress (Zhu, 2002). Une analyse de l'expression des gènes induits par un stress osmotique montre que ces gènes sont activés par des voies dépendantes et indépendantes de l'ABA (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006). La sécheresse induit une production d'ABA qui induit la fermeture des stomates afin de limiter la perte en eau (Wasilewka *et al.*, 2008 ; Acharya et Assmann, 2009 ; Kim *et al.*, 2010 ; Hubbard *et al.*, 2010). Suite à la déshydratation, l'ABA est détecté par un récepteur membranaire qui transmet le signal à des canaux calciques présents dans la membrane plasmique. L'ABA induit en parallèle un signal redox par l'activation de la NADPH oxydase et de la nitrate réductase qui produisent du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et de l'oxyde nitrique (Neil *et al.*, 2002 ; Suhita *et al.*, 2004 ; Gonugunta *et al.*, 2008, 2009). Ainsi, la fermeture des stomates induite par l'ABA est précédée d'une augmentation de la concentration en EAO dans les cellules de garde (Pei *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2001 ; Zhu *et al.*, 2002). Ces messagers, ainsi que la cascade des MAPKs, sont également présents durant les interactions plante/pathogène et lorsque la concentration de Ca²⁺ cytoplasmique augmente (Himmelbach *et al.*, 2003). Plusieurs travaux ont montré l'implication de l'ABA dans l'acclimatation des plantes au froid (Thomashow, 1999 ; Xiong *et al.*, 2001 ; Chinnusamy *et al.*, 2006 ; Zhu *et al.*, 2007).

Enfin, il semble que l'ABA régule sa propre production en agissant sur différents gènes impliqués dans sa synthèse (Xu *et al.*, 2002 ; Xiong *et al.*, 2002c ; Kushiro *et al.*, 2004 ; Saito *et al.*, 2004 ; Nambara et Marion-Poll, 2005). De par ses nombreuses implications, l'ABA est donc un des acteurs principaux des mécanismes de défense chez les plantes (Raghavendra *et al.*, 2010 ; Puli et Raghavendra, 2011).

3.2.3. Les espèces activées de l'oxygène (EAO)

Les EAO sont les formes partiellement réduites de l'O₂ atmosphérique (Mittler, 2002). Elles résultent de l'excitation de l'O₂ et du transfert d'un ou plusieurs électrons menant à la formation du radical superoxyde O²⁻, de peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ou du radical hydroxyle OH (Apel et Hirt, 2004). Les EAO agissent comme des indicateurs cellulaires de stress. Elles servent de second messager pour l'activation de la réponse aux stress et la mise en place des mécanismes de défense (Mittler, 2002 ; Apel et Hirt, 2004).

Chez les plantes, en conditions non stressantes, la production des EAO est principalement assurée par les chloroplastes (Polle, 2001) et les mitochondries (Eltner et Osswald, 1994 ; Vanlerberghe *et al.*, 1997). Les EAO sont produites en permanence comme co-produits de différentes voies métaboliques (Hammond-Kosack et Jones, 1996 ; Pei *et al.*, 2000 ; Mittler, 2002 ; Apel et Hirt, 2004). La source principale d'EAO chez les plantes est la photosynthèse (Apel et Hirt, 2004). Les autres sources d'EAO en conditions normales sont la photorespiration et la respiration mitochondriale (Mittler, 2002 ; Apel et Hirt, 2004). Les EAO sont dangereuses pour la plante car elles peuvent conduire à des dommages oxydatifs importants, en particulier des membranes, et engendrer la destruction de la cellule si elles sont en trop forte concentration (Hammond-Kosack et Jones, 1996 ; Asada, 1999 ; Dat *et al.*, 2000).

Les EAO sont également produites en conditions de stress. En effet, la sécheresse, les chocs thermiques, les métaux lourds, les ultraviolets, l'ozone, une carence en nutriments ou les attaques de pathogènes induisent une production rapide et massive d'EAO (Lamb et Dixon, 1997 ; Dat *et al.*, 2000 ; Pei *et al.*, 2000 ; Wohlgemuth *et al.*, 2002 ; Hammond-Kosack et Parker, 2003 ; Apel et Hirt, 2004 ; Chinnusamy *et al.*, 2006). Pour les stress abiotiques, les EAO servent essentiellement de second messenger et sont à l'origine de l'induction d'expression d'un grand nombre de gènes de défense ainsi que de nombreux facteurs de transcription (Lamb et Dixon, 1997 ; Desikan *et al.*, 2001 ; Apel et Hirt, 2004 ; Chinnusamy *et al.*, 2006).

En raison de leur toxicité mais également de leur rôle important, les plantes mettent en place plusieurs mécanismes de régulation des EAO (Apel et Hirt, 2004). Les principaux mécanismes de détoxification font intervenir la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX), les catalases (CAT) ou les glutathion peroxydases (GPX) selon les stress (Dat *et al.*, 2000 ; Desikan *et al.*, 2001 ; Bolwell *et al.*, 2002 ; Mittler, 2002).

La synthèse de ces différentes enzymes couplée à la production de composés anti-oxydants, tels que les vitamines C et E, des flavonoïdes et des caroténoïdes induites par les EAO contribue à renforcer la protection cellulaire durant le stress (Vanacker *et al.*, 2000). Dans le cas d'un stress biotique, notamment lors de la réponse hypersensible, la synthèse d'EAO augmente via des nicotinamide adénine dinucléotide phosphates oxydases (NADPH) et des peroxydases. Le mécanisme de détoxification diminue (Mittler, 2002), alors que suite à une augmentation de la production d'EAO induite par un stress abiotique, la plante augmente son mécanisme de détoxification.

3.2.4. Les MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase)

Comme tous les organismes vivants, les plantes doivent percevoir et signaler des stimuli extérieurs. Les MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinase), présentes chez tous les eucaryotes, revêt d'une grande importance dans les mécanismes de transduction du signal.

Meskiene et Hirt (2000) signalent 28 gènes codant pour des MAPKs identifiés à partir de plusieurs espèces de plantes dont *Nicotiana tabacum*, *Medicago sativa*, *Arabidopsis thaliana* et *Avena sativa*. Les séquences en acides aminés déduites de ces gènes montrent une forte conservation sur toute la longueur de la protéine avec une forte similarité dans les 11 domaines nécessaires à la fonction catalytique de ces sérine/thréonine PK (Protein Kinase). Les extensions N- et C-terminales sont plus divergentes, mais restent conservées dans un sous-groupe spécifique des plantes, supposant une importance biologique de ces séquences (spécificité au substrat ou interactions avec d'autres protéines). Au moins 4 sous-groupes ont été déduits de ces séquences, qui pourraient refléter des fonctions similaires dans des espèces différentes : par exemple, les MAPK des sous-groupes I et II seraient impliquées dans la réponse aux pathogènes et aux stress abiotiques chez de nombreux organismes, notamment AtMKK1 et AtMKK2 en réponse au froid et au stress salin chez *Arabidopsis thaliana* (Teige *et al.*, 2004), alors que certaines MAPKs du sous-groupe III sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Joosen *et al.*, 2007).

La disponibilité en eau, les températures extrêmes, le vent, la pluie, les radiations, sont des facteurs de stress limitant pour le développement et la croissance végétale. L'adaptation des plantes (différenciation, réduction de la croissance, épaissement de la paroi) dépend principalement de l'expression de certains gènes qui font évoluer des composants essentiels pour la cellule. L'intervention de MAPKs dans la régulation des chocs osmotiques a été démontrée dans plusieurs espèces végétales. Chez la luzerne (*Medicago sativa*), SAMK (Stress Activated MAPK) est régulé au niveau de la transcription par des stress hydriques (Wohlbach *et al.*, 2008) mais est également activée par le stress mécanique que constitue l'agitation de suspensions cellulaires (Maraschin *et al.*, 2006 ; Muñoz-Amatriaín *et al.*, 2006).

3.2.5. Les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs)

Les protéines kinases dépendantes du calcium (CDPKs) possèdent une structure caractéristique composée d'un domaine serine/thréonine protéine kinase qui est fusionné en C-terminal à un domaine calmoduline-like, contenant des sites de fixation au calcium (Cheng *et al.*, 2002 ; Mori *et al.*, 2006). Le domaine de jonction entre les domaines kinase et calmoduline-like agit comme un substrat auto-inhibiteur de phosphorylation en absence de calcium, réduisant ainsi l'activité de la protéine (Vahisalu *et al.*, 2008). Trente quatre gènes codant des CDPKs ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*. Si les domaines catalytiques et régulateurs sont bien conservés, on observe des variations importantes dans la portion N-terminale, dont la longueur peut varier du 21 à 85 acides aminés et présenter des pourcentages d'identité variant entre 15 et 91 % (Hrabak *et al.*, 2000 ; Harman *et al.*, 2001). Les recherches menées sur ces enzymes ont montré leur implication dans une variété de voies de réponses à différents stress. Par exemple chez le riz (*Oryza sativa*) d'OsCPK7 entraîne une augmentation de la tolérance au froid, à la sécheresse et au stress salin (Saijo *et al.*, 2000).

3.3. Les facteurs de transcription

Les protéines induites au froid sont codées et régulées par des gènes de réponse aux basses températures (Thomoshov, 1999). Les voies de transduction du signal qui sont à l'origine de la réponse de la plante au stress au froid, au gel ou hautes températures sont représentées dans la figure 4. Dans les deux cas, une cascade de réactions est mise en place. Elle aboutit à la modification de l'expression des gènes qui vont permettre l'ajustement de métabolites pour leur fonctionnement lors d'un stress au froid.

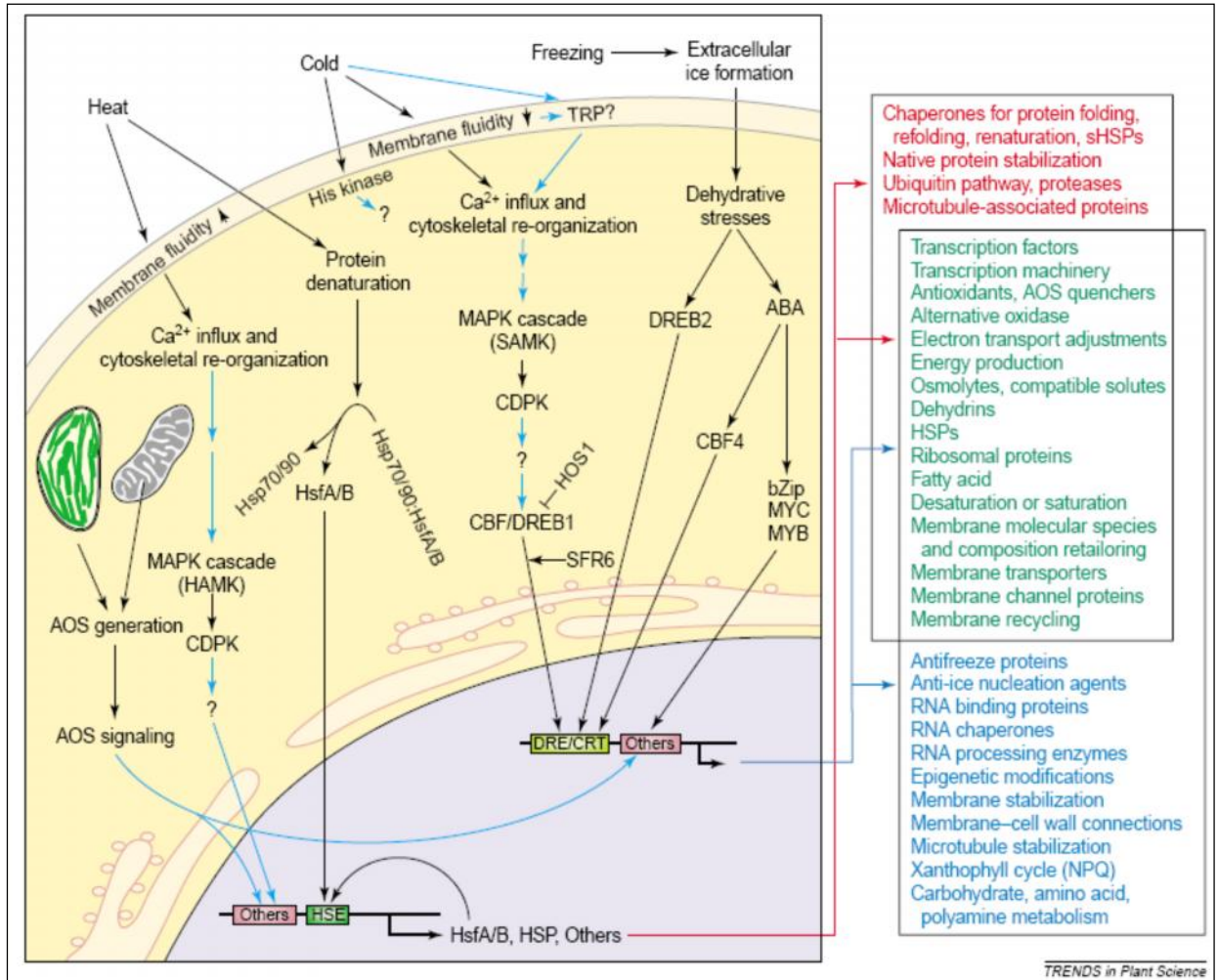


Figure 4 : Modèle représentant la perception de température, signal de traduction, activation de transcription et les composés de la tolérance au stress thermique (Sung *et al.*, 2003).

Une voie de réponse au froid a été identifiée. Elle implique une petite famille de facteurs de transcriptions qui jouent un rôle clé dans la réponse au froid CBF : CBF1, 2, 3 /DREB1 A, B, C (C-repeat binding factor, 1,2,3/dehydrogenase response element binding 1, A, B, C) (Sakuma *et al.*, 2006a et b). Il est à noter que le CRT/DRE (C-repeat/ (dehydration responsive element) se lie aussi à au moins deux facteurs de transcription (DREB2, A, B) qui sont induits par la sécheresse seulement et qui ne sont pas structurellement reliés au groupe de facteurs de transcription CBF/DREB (Sakuma *et al.*, 2006a).

Les gènes CBF sont eux-mêmes régulés par la température. En effet, environ 15 à 30 minutes après le transfert d'*Arabidopsis thaliana* à 4°C, ses transcrits commencent à s'accumuler. Environ deux heures après l'accumulation des transcrits des gènes contrôlés par

l'élément cis CRT/DRE est aussi observée (Sakuma *et al.*, 2002 ; Qin *et al.*, 2008). Un facteur de transcription, ICE (Inducer of CBF expression), agit directement sur le promoteur de CBF1. Cette protéine serait présente à température normale, mais inactive. Chez une plante mise au froid, ICE, ou une protéine qui interagit avec elle, devient active et stimule la transcription des gènes CBF1. Suivrait alors la stimulation des gènes sous le contrôle de CRT/DRE par CBF1.

L'expression de CBF devient détectable vers 14°C. Avec la diminution de la température, leur niveau d'expression continue d'augmenter parallèlement au niveau d'expression du gène COR15a cible des facteurs de transcription CBF (Gilmour *et al.*, 1998 ; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998 ; Liu *et al.*, 1998 ; Gilmour *et al.*, 2000 ; Haake *et al.*, 2002). Des gènes CBF diminuent également sous l'exposition continue des plantes au froid : on pourrait donc dire que le mécanisme de perception du froid devient peu à peu désensibilisé sous une basse température continue. Ceci a été confirmé suite à des expériences successives de transferts de plantes de basses températures vers des températures optimales de croissance (20-22°C) et vice versa : après quelques transferts, l'expression des gènes CBF diminue drastiquement. De même, des plants acclimatés pendant 14 jours à 4 °C ramenés à 22°C pendant 1 heure puis à nouveau transférés brusquement à 4°C n'expriment plus les gènes CBF. Cette "désensibilisation" apparue lors d'une exposition continue à 4°C n'altère cependant pas la capacité des plantes à percevoir et répondre à une diminution plus importante de température. La réponse est extrêmement simple : les gènes codant les facteurs de transcription CBF sont eux-mêmes induits par les basses températures. La surexpression des facteurs de transcription CBF amène à une acclimatation accrue à différents stress, à l'expression constitutive des gènes COR et à une réduction de la croissance des plantes transgéniques (Costa e Silva *et al.*, 2009).

Il se trouve que l'élément de réponse CRT/DRE de séquence TACCGAC ressemble à l'élément de réponse EREBP (Ethylen Response Binding Protein) : GGCCGAC. Selon Stockinger *et al.*, (1997), il existerait une superfamille de protéines de fixation à l'ADN reconnaissant une famille d'éléments cis porteurs de la séquence commune CCGAC. Les séquences différentes entourant ce motif permettraient le recrutement distinct de différentes protéines porteuses du domaine AP2 intégrées dans la voie de transduction de signaux environnementaux et hormonaux (Badawi *et al.*, 2007).

A basses températures, le niveau de transcrits des trois CBF augmentent significativement au bout de 30 minutes, atteignant un maximum au bout d'une heure, ceci étant suivi par une accumulation des transcrits des gènes COR (Médina *et al.*, 1999 in Keller *et al.*, 2009).

Pendant l'acclimatation au froid, les plantes induisent l'expression de deux groupes de gènes. Le premier groupe inclut des gènes qui s'expriment rapidement et transitoirement et code pour des facteurs de régulation de la réponse au froid. Le deuxième groupe inclut des gènes qui s'expriment graduellement (de quelques heures à quelques jours) après le stress et code pour des protéines fonctionnelles, telles que les protéines COR (Cold response). Tous ces gènes inductibles par le froid sont impliqués collectivement dans l'amélioration de la tolérance au froid. Pour le moment, on ne connaît pas la fonction exacte de tous ces facteurs ni leur contribution au développement de la tolérance (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006). L'identification des gènes COR a été réalisée chez plusieurs espèces telles qu'*Arabidopsis*, *Hordeneum* et *Triticum*. Chez *Arabidopsis*, une étude utilisant des micro-puces à ADN a permis de détecter des changements d'expression au froid au niveau de 306 gènes sur 8000 testés (Costa e Silva *et al.*, 2009). Ces gènes codent pour des protéines antigel, des protéines hydrophiles similaires aux déhydrines, les protéines impliquées dans le transfert des lipides, les désaturases de lipides, les chaperonnes moléculaires, des enzymes impliquées dans la biosynthèse de cryoprotectants et des protéines impliquées dans la signalisation et la régulation de la transcription (Fowler *et al.*, 2005 ; Zhu *et al.*, 2007). L'effet de ces gènes sur la tolérance au froid démontre une spécificité de protection d'organes où ils se trouvent.

Le gène *COR15a* dont l'expression est localisée dans le stroma chloroplastique peut augmenter directement la cryostabilité de l'enveloppe interne chloroplastique par stabilisation de lipides membranaires (Miller *et al.*, 2005). De plus, aucun effet sur la survie de la plante entière n'a pu être démontré par sa surexpression (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). Ces observations signifient probablement que pendant l'acclimatation au froid, *COR15a* agirait avec les autres protéines codées par les gènes *COR* pour augmenter la tolérance au gel de la plante entière (Thomashow *et al.*, 2001). L'analyse de l'expression des gènes chez *Arabidopsis* à l'aide de micro-puces à ADN a montré que les racines et les feuilles avaient une réponse très différente durant l'acclimatation au froid. Par exemple, 86% des gènes induits par le froid démontraient qu'ils s'exprimaient spécifiquement dans les racines ou les feuilles. Un résultat intéressant est que certains facteurs de régulation posséderaient aussi cette spécificité d'expression tissulaire par le froid (Kreps *et al.*, 2002).

Les protéines CBF sont donc des facteurs de transcription qui contrôlent le niveau d'expression des gènes COR à basses températures (Figure 5) (Keller *et al.*, 2009).

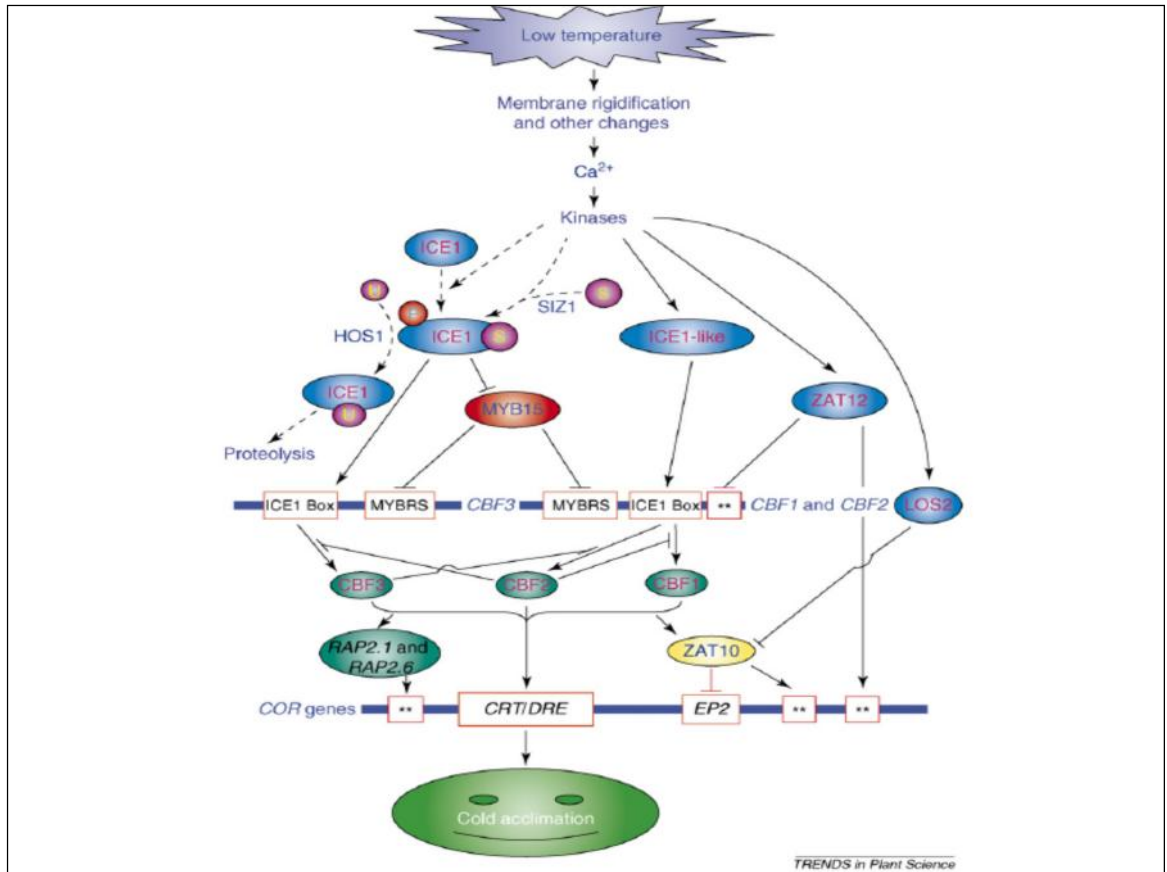


Figure 5 : Schéma de la transcription du signal du froid (Chinnusamy *et al.*, 2007).

Selon Gilmour *et al.*, (1998), un facteur de transcription exprimé constitutivement reconnaît le promoteur des gènes CBF, il s'agit de ICE (Inducer of CBF Expression) qui se fixerait sur un élément de régulation : « ICE Box » présent sur le promoteur des gènes CBF. A température normale, ICE serait inactif. Plusieurs hypothèses, i) il serait séquestré dans le cytoplasme par une protéine de régulation négative, ii) il se présenterait sous une forme incapable de se fixer sur l'ADN, iii) il n'activerait pas de façon efficace la transcription. Des récents travaux (Chinnusamy *et al.*, 2003) confirment l'existence chez *Arabidopsis* d'un facteur de transcription ICE1 de type MYC-like bHLH (basic/Helix-Loop-Helix) qui régule la transcription des gènes CBF3 en se fixant sur les séquences MYC présentes dans le promoteur de CBF3. A basse température, ce facteur de transcription serait activé et induirait l'expression des gènes CBF, mais il est probable qu'il active d'autres gènes intervenant dans l'acclimation au froid.

De même, sur le promoteur du gène CBF2 chez *Arabidopsis*, ont été identifiées deux séquences de fixation de ICE appelées ICER1 et ICER2 (Induction of CBF Expression region 1 et 2). Les deux séquences sont indispensables pour l'expression des gènes induits par le froid (Zarka *et al.*, 2003). Un autre régulateur des gènes CBF3 a été mis en évidence chez des mutants *los4* (Low expression of osmotically response genes) d'*Arabidopsis* qui sont sensibles au froid et n'expriment plus les gènes régulés par le froid. Le gène LOS4 a été identifié comme codant une ARN hélicase nucléaire activatrice de l'expression des gènes CBF (Gong *et al.*, 2002). Grâce à cette mutation, ils ont montré l'importance de la régulation des gènes et du régulon des gènes CBF en cas de stress au froid. Un autre mutant d'*Arabidopsis*, *los2* chez qui la transcription des gènes de réponse au froid est inhibée, a été mis en évidence (Maruyama *et al.*, 2004).

La régulation de l'expression des gènes COR activés par CBF intervient également une fois les gènes CBF exprimés. En effet, Warren *et al.* (1996 in Roeder, 2006) ont montré chez des mutants *sfr6* (Sensitive to freezing) d'*Arabidopsis*, ne présentent pas une tolérance au gel. Cependant, il n'a pas encore été déterminé comment SFR intervient. Il semblerait que ce phénotype ne résulte pas d'un dysfonctionnement au niveau de l'expression des gènes CBF car leurs transcrits sont présents chez les mutants *sfr6* en réponse aux basses températures. SFR6 agirait alors entre les transcrits de CBF et l'induction des régulons CBF comme les gènes COR. De même façon, Knight (2000) a montré que les mutants *sfr6* sont déficients dans l'expression des gènes KIN1 (Cold induced), COR15a et LT I78 (Low temperatures induced), qui possèdent tous des motifs CRT/DRE dans leurs promoteurs. Mais au contraire, l'expression des gènes CBF, qui ne possèdent pas de motif CRT/DRE, n'était pas affectée. Ils suggèrent que les protéines se fixant aux motifs CRT/DRE, comme CBF, doivent être activées pour jouer leur rôle dans la transcription et que SFR6 est l'élément essentiel de leur activation. Une autre mutation isolée également chez *Arabidopsis* : *hos1-1* (High expression of osmotically responsive genes) ; Zhu *et al.*, (2007), altèrent la température à laquelle le promoteur de COR15a est activé. Chez des plantes sauvages, ce promoteur est inactif pour des températures supérieures à 10°C, alors que chez les mutants, l'induction de ce promoteur peut être détectée à 19°C. A basses températures, la mutation est responsable d'une « super-induction » des gènes COR47 et COR15a. Le gène HOS1 coderait donc un régulateur négatif de la transduction du signal basses températures. Le produit du gène HOS1 possède un motif « Ring finger » avec une activité ubiquitine E3 ligase, ce qui implique un rôle dans la dégradation des protéines lors de la transduction du signal au froid (Lee *et al.*, 2001).

Les protéines MYB se définissent par la présence d'un domaine MYB constitué d'environ 50 acides aminés contenant trois tryptophanes conservés et régulièrement espacés de 18 ou 19 acides aminés qui sont à l'origine de la formation d'un cœur hydrophobe nécessaire à la fixation de l'ADN (Keller *et al.*, 2009). Plusieurs copies de ce domaine MYB peuvent être répétées dans une seule protéine et permettre l'attachement à l'ADN. Dans les cas de répétitions imparfaites, les tryptophanes peuvent être remplacés par des résidus phénylalanine ou tyrosine et des acides aminés supplémentaires peuvent être observés. Le domaine de fixation des protéines MYB présent en N-terminal est conservé chez les animaux, les plantes et les levures alors qu'en C-terminal se trouvent des régions capables de moduler l'expression génique (Boter *et al.*, 2004). Chez les animaux, il n'existe que des protéines MYB à trois répétitions (MYB-R1R2R3), alors que chez les plantes et les levures le nombre de répétitions est variable (MYB-R1 à une répétition, deux répétitions MYB-R2R3 et MYB-R1R2R3 à trois répétitions). De ce fait, les protéines MYB ont été arrangées en trois sous classes possédant 1, 2 ou 3 répétitions (Yadav *et al.*, 2005). Depuis l'identification et la caractérisation de cette protéine MYB à deux répétitions, il apparaît que les facteurs de transcription de type MYB chez les plantes représentent une superfamille de gènes de par la diversité et le nombre élevé de membres. Par ailleurs, on leur attribue la régulation de différents aspects de métabolisme et de développement spécifiques des plantes.

Les fonctions moléculaires des MYB sont d'activer ou de réprimer la transcription de gènes cibles dans le but de conduire les cellules, tissus ou organes où ils agissent à un état biologique particulier. Les études de gain de fonction (ex. surexpression par transgénèse) et de perte de fonction (ex. mutant insertionnel) permettent de lier ou de démontrer l'utilité d'un gène à un processus biologique donné (Liu *et al.*, 2007). D'autre part, des études qui n'utilisent pas de modifications géniques héréditaires mais des conditions expérimentales (infections, carences nutritives, modulation de la lumière, etc.) peuvent induire l'expression de certains facteurs de transcription et ainsi révéler une réponse biologique dans lequel est impliqué un de ces gènes régulateurs. L'utilisation de mutants chez la plante modèle *Arabidopsis* a permis d'associer des rôles biologiques à une partie seulement des protéines MYB. En effet, le caractère régulateur des protéines MYB fait que la perte d'expression de certaines d'entre elles conduit à des conditions physiologiques létales pour la plante. Cependant, les études de caractérisation fonctionnelle chez *Arabidopsis thaliana* permettent d'avoir une vision générale des processus biologiques régulés par les MYB dans une espèce végétale.

De la même manière, il a été montré que les gènes de la famille DREB d'*Arabidopsis* activent des cascades de gènes impliqués dans la résistance à plusieurs stress. Chez *Arabidopsis*, le transgène DREBA2 induit une tolérance élevée au courant d'air et à un moindre degré au froid. La surexpression du gène DREB2A active plusieurs gènes impliqués dans la résistance au courant d'air et au froid mais également la résistance aux chocs thermiques (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 2006).

La surexpression des gènes DREB1A, de DREB1B, et de DREB1C des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* a montré l'augmentation de la tolérance au gel, à la sécheresse, et aux concentrations élevées de sel (Gilmour *et al.*, 2004, Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). Ces observations ont mené les chercheurs à croire que les protéines DREB1A, de DREB1B, et de DREB1C fonctionnent sans modification post translationnelle des protéines dans le développement de la tolérance de stress. La surexpression des gènes DREB1A, DREB1B, et DREB1C a comme conséquence de multiples changements biochimiques (accumulation de la proline et de sucres solubles totaux tels que le saccharose, le raffinose, le glucose et le fructose) qui sont associés à l'acclimatation au froid (Gilmour *et al.*, 2000, 2004).

3.4. Protection de l'intégrité de la cellule

3.4.1. Les protéines chaperonnes (HSP)

Les HSP (Heat Shock Protéines) jouent un rôle dans la protection des cellules. Elles s'accumulent lors d'un stress hydrique, salin ou des températures extrêmes (Wang *et al.*, 2003).

Les HSP sont des molécules chaperonnes. Elles permettent d'éviter l'accumulation dans les cellules de protéines altérées et de maintenir la conformation des protéines voire de réactiver des enzymes inactivées par le stress.

Elles stabilisent les membranes et les protéines. Les principales HSP ont été divisées en cinq grandes familles (Kampania *et al.*, 2009), selon leur poids moléculaire et leur homologie de séquence : les HSP 70, les (HSP 60), les HSP 90, les HSP 100 et les sHSP "Small heat shock proteins" (Figure 6).

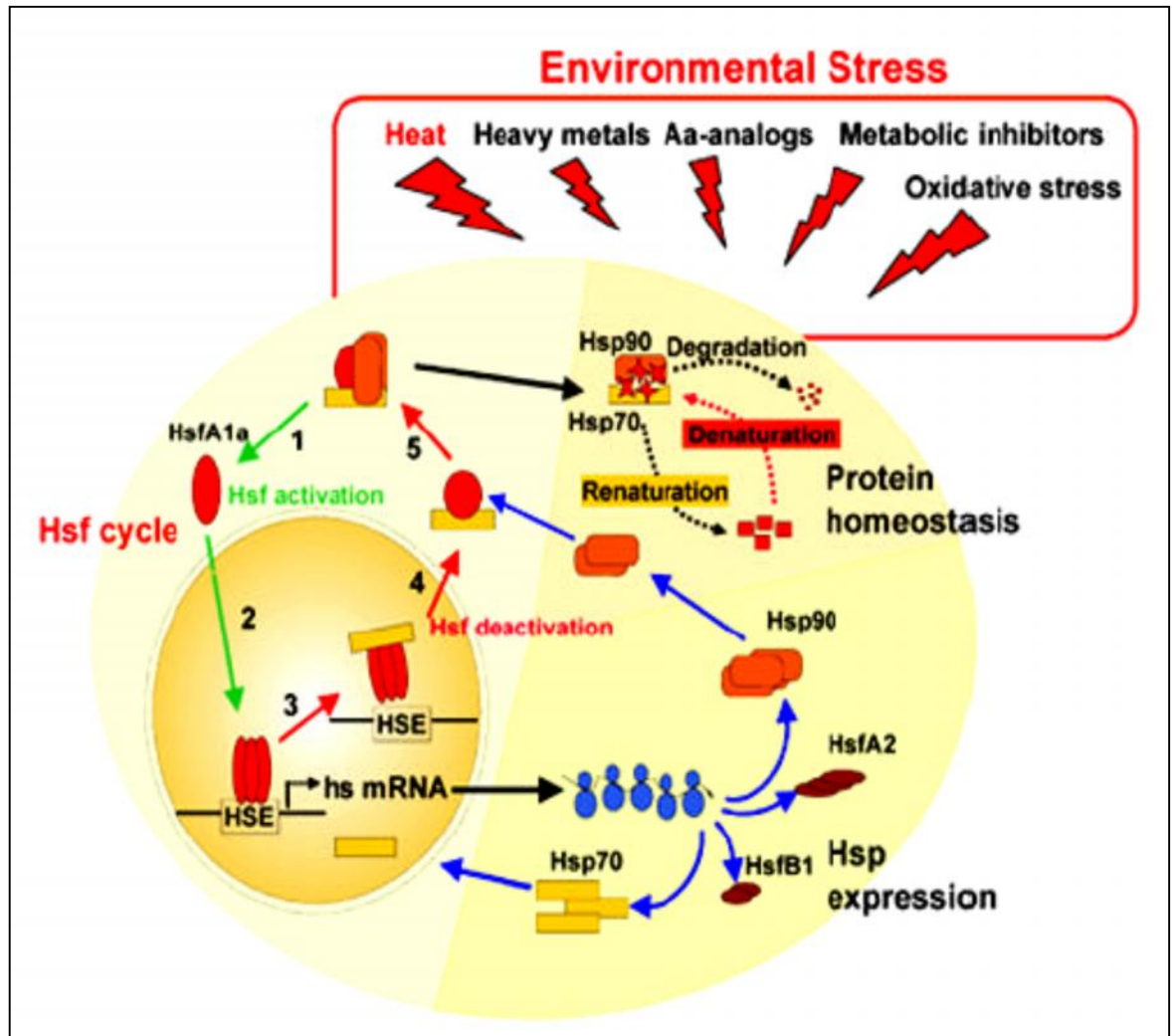


Figure 6 : Rôles des HSF comme régulateurs de la réponse au stress thermique (Baniwal *et al.*, 2004).

Les protéines de choc thermique de 70 kDa représentent certainement les HSP les plus étudiées, les plus abondantes et les plus conservées (Lanneau *et al.*, 2008). La famille HSP 70 comprend différents membres présentant un haut degré d'homologie entre eux et d'un organisme à l'autre. Dans cette large famille, chaque membre a évolué pour remplir des rôles spécifiques dans différents compartiments cellulaires.

Certains membres de la famille des HSP 70 dirigent la translocation de protéines à travers les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique en se liant à des protéines en cours de synthèse pour leur assurer une conformation qui soit adéquate à la translocation vers le compartiment cible. Ces fonctions expliquent pourquoi ces protéines se concentrent surtout dans les membranes, dans le noyau ainsi que dans les nucléoles (Daugaard *et al.*, 2007).

Certains HSP 70 sont exprimées de façon constitutive (les HSC 70 : Heat Shock Cognate), d'autres ne sont exprimées qu'en cas d'exposition de la cellule à un stress. De plus, certains membres de la famille des HSP 70 interviennent dans le contrôle de l'activité biologique de protéines régulatrices, et peuvent servir de régulateurs négatifs de la transcription des HSF (Heat Shock Factors) en se fixant à ceux-ci.

Si les HSP 70 sont exprimées en réponse à différents stress (basse température, choc thermique, sécheresse) (Sung *et al.*, 2001), et leur induction corrélée avec l'acquisition d'une tolérance thermique (Lee *et al.*, 1996 ; Wirth *et al.*, 2003) ainsi qu'à une résistance accrue à différents stress environnementaux (forte température, concentration en sels élevées, stress hydrique (Sung *et al.*, 2003), le mécanisme cellulaire de fonctionnement des HSP 70 reste largement inconnu.

3.4.2. Les protéines de type LEA (Late Embryogenesis Abundant)

Les LEA constituent une famille multigénique dont la majeure partie des protéines sont cytosoliques et hydrophiles (Bartels et Sunkner, 2005). Elles ont été identifiées chez le coton et le blé. Elles sont produites en abondance durant le développement des graines et peuvent représenter jusqu'à 4% des protéines cellulaires totales (Keller, 2006 ; Keller *et al.*, 2009). Elles sont classées en 6 groupes, en fonction de leurs conditions d'expression et de leurs séquences. Les groupes majeurs sont les groupes 1, 2 et 3 (Bray *et al.*, 2000).

Les LEA sont situées dans le cytoplasme, le noyau, les mitochondries, les vacuoles, près de la membrane cellulaire (Hundertmark et Hinch, 2008) et dans les amyloplast. Après la synthèse, elles sont transportées aux organelles et aux membranes cellulaires, où elles stabilisent des structures cellulaires et moléculaires en cas d'exposition à la sécheresse et au froid (Keller *et al.*, 2009).

L'induction des LEA a été mise en évidence dans de nombreuses plantes lors de la réponse aux stress hydrique, osmotique et froid. Elles sont très hydrophiles et riches en glycine. Leur fonction n'est pas encore bien définie mais plusieurs rôles leur sont prêtés : la fonction de l'eau, la stabilisation des membranes (COR 15a) (Lee *et al.*, 2006) et la cryoprotection des protéines sensibles au gel dont les enzymes (COR 85). Ces protéines semblent agir en synergie entre elles.

En effet, chez le tabac, la surexpression d'une seule d'entre elles n'améliore pas la tolérance au stress hydrique contrairement à la surexpression d'un facteur de transcription commun à plusieurs d'entre elles (Thomashow, 1999).

L'étude des CORS est avancée chez *Arabidopsis thaliana*. Ce sont des protéines nouvelles, simples, formées seulement de quelques acides aminés avec des séquences répétées. Beaucoup d'entre elles, comme d'ailleurs les protéines LEA ont des régions capables de former des hélices amphiphilic (c'est à dire qui ont à la fois des zone hydrophiles et des zones hydrophobes). Ces régions jouent probablement un rôle dans la stabilisation des membranes durant une période de gel où de sécheresse : les deux contraintes produisant une déshydratation des cellules (Zhu *et al.*, 2004). Par exemple le gène COR15a code pour un polypeptide de 15 kD qui est dirigé vers le stroma du chloroplaste. Le polypeptide mature dont la masse molaire est de 9.4 kD appelée COR15am est extrêmement hydrophile (Lee *et al.*, 2006). Artus *et al.* (1996) ont tenté de voir si ce polypeptide pouvait protéger les chloroplastes contre les effets négatifs des basses températures. Le gène est exprimé chez *Arabidopsis thaliana*. L'expression constitutive de cette protéine chez des plantes transgéniques non acclimatées permet d'augmenter la tolérance au gel. Ce polypeptide jouerait un rôle dans la stabilisation de la membrane, en diminuant la transition de phase de la membrane plasmique qui est responsable des phénomènes de fusion membranaire (Örvar *et al.*, 2000).

Les déhydrines appartiennent à la famille D11 des LEA groupe II, appelées aussi RAB (Responsive to ABA). Ce sont de petites protéines hydrophiles accumulées en réponse à différents stress abiotiques et à l'ABA qui serviraient à protéger la cellule contre les effets de la déshydratation. Beaucoup contiennent dans leur promoteur la séquence LTRE/CRT/DRE, ce qui suggère leur appartenance au régulon CBF. Dans une banque d'ADNc construite à partir de feuilles de Rhododendron acclimatées au froid, les déhydrines et autres LEAs sont parmi les gènes les plus abondants alors qu'aucun d'eux n'est présent dans une banque construite à partir de feuilles non acclimatées (Wei *et al.*, 2005). Elles sont également très abondantes dans la collection d'ESTs issue de feuilles d'*Eucalyptus* acclimatés au froid (Keller *et al.*, 2009). Si leur implication dans la tolérance au froid est établie, leur fonction n'est pas encore clairement définie. Il a été montré que les déhydrines pouvaient avoir un rôle de cryoprotection et d'antigel (Wisniewski *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2001). Le rôle des déhydrines a aussi été mentionné dans la stabilisation des membranes et du cytosquelette (Reyes *et al.*, 2005; Abu-Abied *et al.*, 2006).

Récemment, un rôle de protéine chaperonne a été mis en évidence (Kovacs *et al.*, 2008). L'ensemble de ces résultats suggère que les déhydrines sont capables d'interagir avec les protéines et les membranes pour les stabiliser lors d'un stress. Ils semblent aussi avoir la capacité de lier de l'eau et des ions pendant un stress de déshydratation (Tompa *et al.*, 2006). Elles pourraient agir comme un tampon pour limiter la sortie d'eau de la cellule. Enfin, Hara *et al.* (2001 in Masakazu Hara, 2009) proposent l'interaction d'une déhydrine de *Citrus* avec les acides nucléiques dans le but de les stabiliser lors d'un stress froid.

3.5. Accumulation d'osmolytes et de cryoprotecteurs

3.5.1. La proline

L'accumulation de la proline chez les plantes soumises à des contraintes abiotiques a fait l'objet de nombreuses études et a même été préconisée par plusieurs auteurs comme test précoce de sélection pour la tolérance au déficit hydrique (Hare *et al.*, 1999 ; Hasegawa *et al.*, 2000). En réalité, le rôle de l'accumulation de la proline reste encore mal connu. S'agit-il d'un simple symptôme de souffrance ou d'un véritable mécanisme de tolérance (Leal *et al.*, 2003) dont les causes peuvent être multiples : stimulation de la synthèse, détérioration de la capacité de synthèse protéique et la réduction du taux de translocation de l'acide aminé à travers le phloème.

L'accumulation de la proline n'est pas spécifique au déficit hydrique puisqu'elle s'accumule également sous l'effet des basses températures (Gleeson *et al.*, 2005), de la salinité (Mazher *et al.*, 2007) et des hautes températures (Rached-Kanouni *et al.*, 2012).

La proline, localisée principalement dans le cytoplasme, agirait comme un cryoprotectant durant l'exposition de la plante à des températures gélives (Galiba, 1994). L'accumulation de proline durant l'endurcissement au froid a été associée à une augmentation de la tolérance au froid chez plusieurs plantes (Dörffling *et al.*, 1998). Plus récemment, l'utilisation de plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* (Prewain *et al.*, 2003) et de *Nicotiana tabacum* (Kavi Kishor *et al.*, 1995) capables de surproduire la proline a permis d'établir l'existence d'un possible lien entre l'accumulation de la proline et le degré de tolérance au gel de ces espèces.

Bien que ces travaux tendent à démontrer un lien de cause à effet entre l'accumulation de la proline et la tolérance au froid, d'autres résultats suggèrent que l'augmentation des concentrations de la proline est davantage une conséquence du stress qu'un mécanisme d'adaptation (Delauney et Verma, 1993 ; Hare et Cress, 1997). Par exemple, Wanner et Junttila (1999 in Nanjo *et al.*, 2003) ont récemment démontré qu'une augmentation de la tolérance a été enregistrée chez *Arabidopsis* avant même l'accumulation de la proline, ce qui suggère un rôle secondaire de cet acide aminé dans l'endurcissement au froid.

Parmi les facteurs impliqués dans cette accumulation, on pourra citer par exemple l'induction des gènes impliqués dans la synthèse d'acides aminés, tels que la proline (1-pyrroline-5-carboxylate synthétase : P5CR) ou la glycine-bétaïne (bêtaïne aldéhyde déshydrogénase : BADH). L'augmentation de transcrits de la P5CR, corrélée à une augmentation de proline, a été montrée chez *Arabidopsis* (Savoure *et al.*, 1995). De plus, ces auteurs ont montré que cette augmentation était directement reliée à l'application du stress. En effet, lors de la phase de récupération juste après l'application du stress, le contenu en proline diminue en même temps que la quantité de transcrits correspondant à la P5CR. L'induction de ces gènes est directement reliée à la régulation du taux de proline dans les cellules, en fonction du stress. L'accumulation de la proline est un phénomène commun chez les plantes soumises au stress osmotique (Gleeson *et al.*, 2004). La proline agirait comme un stabilisateur de la membrane plasmique. L'accumulation de proline et de glycine beta ne joue également un rôle important dans le réajustement osmotique du cytoplasme des plantes en réponse aux stress osmotiques.

Les osmoregulateurs comme la proline et la glycine-bétaïne participeraient aux mécanismes de tolérance aux températures élevées. Ainsi, l'application exogène de la proline et de glycine beta ne a amélioré la réponse des plantes au stress thermique à 45 °C par rapport au contrôle. Le rôle de la glycine-bétaïne et la proline a été observé particulièrement dans la protection de l'OEC (oxygen evolving complex : complexe de dégagement d'oxygène) (Papageorgiou et Murata, 1995 ; Allakhverdiev *et al.*, 1996 ; De Ronde *et al.*, 2004). En plus de son effet protecteur sur le complexe de dégagement d'oxygène, il se pourrait que ces deux osmolytes soient impliqués dans la protection des centres de réaction (RC) de PSII comme il a été rapporté par Allakhverdiev *et al.* (1996).

3.5.2. Les sucres solubles

Chez les C3 et les C4, les basses températures limitent la phase photochimique et le métabolisme carboné (Foyer *et al.*, 2002). L'ajustement entre ces deux mécanismes est primordial pour la survie de la plante.

De nombreuses recherches montrent que l'acclimatation des arbres au froid, qui commence à l'automne, est concomitante avec une augmentation de la concentration des sucres dans les cellules. Par exemple, des peupliers cultivés en pot et préalablement acclimatés sont capables, sans doute en partie grâce à l'accumulation de sucres, de résister à des températures allant jusqu'à -196°C (Sakai *et al.*, 1997).

Le mutant *sfr4* (*sensitive-to-freezing4*) est, quant à lui, incapable de s'acclimater au froid et présente des teneurs en sucres plus faibles que les plants sauvages (Mckown *et al.*, 1996; Uemura *et al.*, 2006). Chez *Eucalyptus gunnii*, une accumulation de saccharose, de fructose, de glucose et de raffinose a été observée au cours de l'acclimatation (Leborgne *et al.*, 1995a).

Le rôle des sucres dans la tolérance au gel est toutefois resté longtemps controversé. Il restait en effet à savoir si l'augmentation des teneurs en sucres est un effet ou une cause de la tolérance au froid. Pour répondre à cette question, Uemura et Steponkus (1997) ont incubé des plantules d'*Arabidopsis* dans une solution de saccharose à 400 mM. Des protoplastes issus de ces plantules présentaient une tolérance au gel identique à celle de plantules acclimatées de manière classique.

Teulieres *et al.* (2007) et Teulieres et Marque (2009) ont réalisé des cultures cellulaires de feuilles d'*Eucalyptus* qui peuvent être acclimatées au froid. Dans un premier temps, grâce à ce système, Leborgne *et al.* (1995b) ont montré une corrélation positive entre le contenu en sucres de ces cellules et leur tolérance au froid après acclimatation, ainsi qu'une amélioration de cette tolérance lors d'un ajout exogène de sucres dans la culture. Ces observations suggèrent donc que l'accumulation de sucres pendant la phase d'acclimatation au froid pourrait être un mécanisme efficace de résistance au gel. Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Travert *et al.* (1997) comparant la résistance au gel de cellules en culture issues de deux génotypes d'*Eucalyptus* hybrides : *Eucalyptus gunnii* / *Eucalyptus globulus* qui résiste mieux au gel et

Eucalyptus cypellocarpa / *Eucalyptus globulus* qui est sensible au gel. Ces auteurs montrent que les cellules du génotype résistant accumulent plus de sucres, notamment du saccharose et du fructose, que les cellules du génotype sensible.

Chez les végétaux supérieurs, le saccharose synthétisé dans le cytoplasme des organes chlorophylliens est la première forme stable de glucides formés par la photosynthèse et la forme majoritaire de transport du carbone. Le saccharose est donc un composé dont la concentration dans la plante est extrêmement régulée. Cette régulation est complexe et passe par le contrôle des enzymes participant à sa synthèse et à sa dégradation (invertases, SPS : Saccharose Phosphate Synthase), mais aussi par le contrôle de son exportation. De plus, il a été récemment montré que le saccharose pouvait jouer le rôle de molécule signal dans les processus morphogénétiques et notamment dans le contrôle de la morphogenèse foliaire (Xiao *et al.*, 2006). La forte inhibition de la synthèse de saccharose joue un rôle important dans la diminution de l'activité photosynthétique induite par le froid. L'inhibition de la synthèse du saccharose par les basses températures est contrecarrée durant l'acclimatation au froid par une rapide et forte augmentation de l'activité et de la quantité de cFBPase, de SPS et d'UGPase (Strand *et al.*, 1999 et 2003). Le saccharose joue un rôle cryoprotecteur en réduisant les dommages causés aux membranes lors de la déshydratation de la cellule. Ce sucre interagirait avec les groupements hydroxyliques des phospholipides membranaires en remplaçant l'eau dans le maintien de la structure de la membrane. Ce phénomène permettrait de prévenir la séparation de phase des doubles couches lipidiques ainsi que la fusion de la membrane plasmique (Crowe et Crowe, 1992). De plus, ce disaccharide interagirait avec les protéines pour maintenir l'activité des enzymes lors de la déshydratation.

3.5.3. L'amidon

Les réserves à long terme sont essentiellement stockées sous forme d'amidon. Ce dernier est issu de la photosynthèse et s'accumule au cours de la phase végétative dans les tissus pérennes et en particulier, dans les parenchymes de réserves des rameaux et des racines (Decourteix, 2005). Parmi les composés stockés, l'amidon constitue le produit de réserve le plus abondant. Lors de l'hydrolyse sous l'action d'amylases ou de phosphorylases, l'amidon donne d'abord du maltose puis du glucose. En situation de forte demande en glucose, c'est par l'intermédiaire des amylases que s'effectue la dégradation.

Chez les espèces ligneuses à croissance rythmique, bien qu'aucune mesure de l'évolution du contenu en amidon des bourgeons ne semble avoir été réalisée au cours d'une vague de croissance, l'évolution de ce composé a été mesurée dans d'autres territoires comme les racines, la tige ou les feuilles. Chez le chêne pédonculé, le système racinaire ne constitue pas un compartiment accumulant l'amidon. Le stockage de l'amidon est donc essentiellement assuré par la tige et les feuilles (Alaoui-Sossé *et al.*, 1994). Dans les tiges des différents étages, l'amidon est accumulé tout au long du développement (chêne rouge : Hanson, 1986 ; chêne pédonculé : Parmentier, 1993 ; Alaoui-Sossé *et al.*, 1994).

Chez le peuplier, l'hydrolyse de l'amidon se déroule en deux phases. A partir de la mi-octobre (chute des feuilles), la concentration en amidon diminue très rapidement, à un taux de $0,55 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\text{MS}\cdot\text{jour}^{-1}$. Cette diminution coïncide avec une forte augmentation des teneurs en maltose, ce qui implique que la dégradation du grain d'amidon ferait intervenir des amylases plutôt qu'une phosphorolyse. Par la suite, à la fin de l'automne et en hiver, l'hydrolyse de l'amidon se poursuit et le pool de maltose est transformé en saccharose et de ses dérivés (Sauter et Van Cleve, 1991). Chez le peuplier, la nature des sucres libérés après exposition au froid et les nombreuses études enzymatiques ont permis de mettre en évidence la forte implication des α -amylases dans l'hydrolyse de l'amidon en hiver (Witt *et al.*, 1995 ; Sauter *et al.*, 1998 ; Witt et Sauter, 1994 in Sakr *et al.*, 2003). Par la suite, ce sont donc surtout les amylases qui ont été étudiées. Il existe deux types d'amylases qui diffèrent par la nature du sucre libéré et chacun de ces deux types présente plusieurs isoformes. Les α -amylases (ou endoamylases) libèrent des oligoglucanes alors que les β -amylases (ou exoamylases) libèrent exclusivement du maltose. Les β -amylases se fixeraient aux grains d'amidon de façon réversible. Cette liaison dépend de la température et des taux de malto-oligosaccharides (Witt *et al.*, 1995 ; Elle et Sauter, 2000). L'utilisation de la cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique, a également permis de montrer que cette diminution de la teneur en amidon liée aux basses températures serait au moins en partie le résultat d'une synthèse *de novo* de cette enzyme (Elle et Sauter, 2000).

Les analyses du contenu en amidon et en sucres solubles du xylème de tiges soumises à des traitements thermiques ont permis de montrer la dépendance des interconversions amidon/sucres solubles vis-à-vis de la température. En effet, en plaçant des portions de troncs de feuillus et de conifères en pleine dormance à des températures comprises entre -2°C et $+5^{\circ}\text{C}$ pendant plusieurs semaines, Sauter (1967 ; 1988) a observé des modifications des quantités d'amidon et de sucres

solubles comparables à ce qui avait été observé chez des arbres soumis aux températures extérieures uniquement. De même, chez le peuplier deltoïde (*Populus deltoides*) dont la dormance a été induite artificiellement, un stockage des arbres à +3°C pendant deux semaines provoque une diminution des teneurs en amidon des tiges qui s'accompagne d'une augmentation des teneurs en sucres solubles (Nelson et Dickson, 1981). Des études ont également été menées pour des températures plus douces. Sauter (1967) a montré que des troncs de feuillus et de conifères en pleine dormance, placés à +20°C présentent une synthèse d'amidon puis une nouvelle hydrolyse. Sauter et Ambrosius (1986) ont montré que des rameaux de bouleau (*Betula pendula*) prélevés à la fin de l'hiver et placés à +10°C présentent une synthèse d'amidon. Les branches placées à +21°C présenteraient une synthèse suivie d'une hydrolyse d'amidon. A nouveau, on peut constater que des traitements thermiques, mais cette fois à des températures douces, permettent de reproduire les évolutions observées au printemps en conditions naturelles.

3.5.4. Le quercitol

Le quercitol (L-1,3,4/2,5-cyclohexanepentol) est le cyclitol prédominant dans *Q. robur* (Popp *et al.*, 1997 in Thomas *et al.*, 2004). Une réduction significative de la concentration du quercitol a été trouvée dans l'écorce des chênes sessiles de 21 ans (*Quercus petraea*), après une défoliation manuelle simple en juin, en hiver suivant (Orthen et Popp, 2000). Il fonctionne comme un osmoticum stable dans des espèces d'*Eucalyptus* et contribue de manière significative au potentiel osmotique cellulaire dans les feuilles, mais son rôle dans l'ajustement osmotique n'est pas encore entièrement compris. La plupart des recherches de quercitol réalisées sur les jeunes arbres sous serre, montrent que son accumulation est uniquement présente dans les feuilles. Des études faites sur le chêne pédonculé (*Quercus robur*) indiquent que le quercitol peut être transféré entre les feuilles et les tissus du bois durant l'année (Popp *et al.*, 1997), et des quantités importantes de quercitol ont été mesurées dans la sève de xylème dans une gamme d'espèces d'*Eucalyptus*. Il semble possible que le transfert du quercitol entre les différents organes peut jouer un rôle dans le transport du carbone ou son stockage.

Ainsi le raffinose (oligosaccharide de glucose-fructose-galactose) agirait comme un cryoprotecteur dans les plantes tolérantes au gel après acclimatation au froid (Gilmour *et al.*, 2000). La glycine beta ne est aussi connue pour son action stabilisante et protectrice des protéines et des membranes dans des conditions défavorables, notamment en cas de stress thermiques (De Ronde *et al.*, 2004).

4. Caractéristiques générales du chêne liège

4.1. Caractères botaniques et forestiers

C'est un arbre qui ne dépasse pas les 12 m en France qui peut atteindre 15 à 20 m en Afrique du Nord et au Portugal, certains sujets dépassent 1 m de diamètre, avec un âge maximum d'environ 200 ans (Boudy, 1955). Son port est variable en fonction de la densité du peuplement : tronc court et houppier étalé dans les peuplements clairs (impact anthropique) ou tronc long et houppier élancé dans les peuplements denses. Il s'agit d'un chêne avec des feuilles persistantes, de forme ovale, coriace vert foncée et lisse sur sa face supérieure, blanchâtre et tomenteuse sur sa face inférieure. Le pétiole est court. Les feuilles de plus d'un an meurent et tombent quelques mois après le développement des jeunes feuilles. Le chêne liège est essentiellement allogame bien qu'il soit monoïque comme tous les chênes d'où sa grande richesse génétique. Les fleurs mâles apparaissent en bouquet entre avril-mai à l'extrémité des pousses de l'année. Le fruit ou gland, rarement comestible par l'homme à cause de son goût amer, se forme dans l'année et tombe d'octobre à novembre jusqu'à janvier (Seigue, 1985). La durée de maturation annuelle de glands nous permet de différencier le chêne liège du chêne occidental qui lui est identique mais dont les glands présentent une durée de maturation biannuelle. C'est une espèce qui fleurit et fructifie de bonne heure, quelques fois dès l'âge de 12 à 15 ans (Margot, 2006). L'originalité de cette espèce est de produire une écorce épaisse périodiquement récoltable sans trop affaiblir les arbres, fournissant du liège, matériau assez unique pour ses propriétés physiques, chimiques et esthétiques (Zeraia, 1982).

4.2. Caractères écologiques

En altitude, il monte en Afrique du Nord, de 0 à 1200 et 1300 mètres (on le trouve cependant au Maroc jusqu'à 2200 mètres dans le Grand Atlas). C'est donc une essence de plaine et de moyenne montagne (Boudy, 1955).

Le Chêne-liège est exigeant en chaleur et en humidité, ce qui explique sa répartition en zone méditerranéenne. Température moyenne annuelle : 13,5°C. Des lésions irréversibles apparaissent sur les feuilles en dessous de - 5°C. Il lui faut une tranche pluviométrique de 550 à 600 mm au minimum, une humidité atmosphérique de 60% au moins durant la saison sèche. Ces exigences

varient en fonction des particularités stationnelles et topographiques (Nord/sud, fond de vallon, proximité de la mer...) (Lamey, 1993).

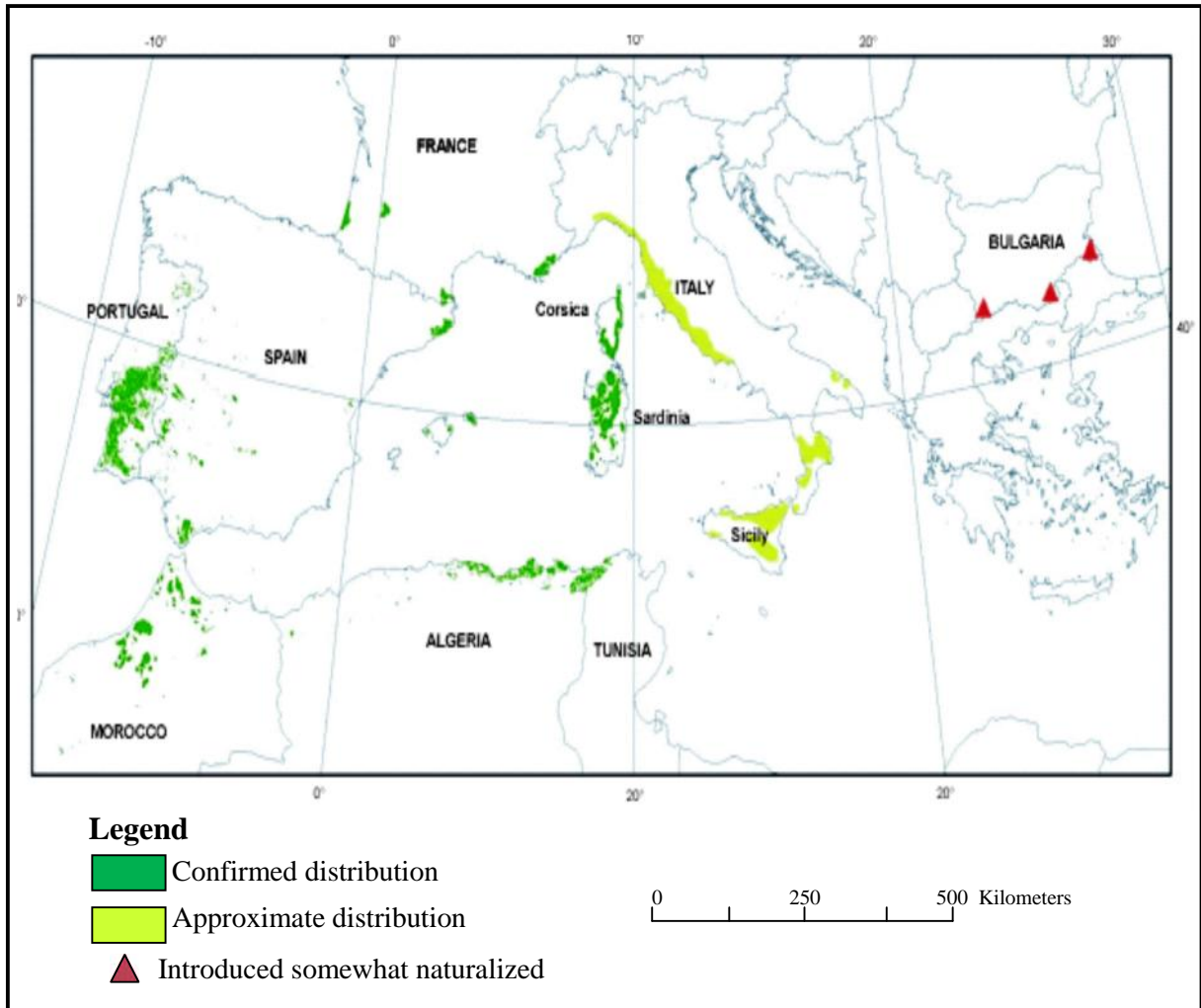
Au point de vue du sol, le chêne liège est essentiellement calcifuge. Il préfère les sols aérés, profonds, frais, riches en matière organique, acides et franchement siliceux (rocheux, granitique, porphyriques, schisteux ou gréseux). Il craint sols hydromorphes. Il marque nettement sa préférence pour les terrains siliceux tels que les grès numidiens (Algérie-Tunisie) ou les sables pliocènes (Maroc).

4.3. Aire du chêne liège

Le chêne-liège est une essence typiquement méditerranéenne par sa distribution et par ses qualités biologiques. Son habitat est exactement et uniquement le bassin méditerranéen occidental et déborde sur les côtes atlantiques, du Maroc au golf du Gascogne recouvrant une superficie de 2 250 000 (Seigue, 1985). Il se situe entre 34° et 44° de latitude nord (Carte 1). On ne le trouve nulle part ailleurs à l'état spontané dans le monde.

Les principales subéraies algériennes sont localisées dans le Tell Oriental, situées essentiellement en zones sub-humides et humides au Nord-Est de l'Algérie jusqu'à la frontière tunisienne (Zeraïa, 1982).

Le chêne liège s'étend d'une manière assez continue le long de la zone littorale et reste disséminé sous forme d'îlots de moindre importance dans la partie Ouest.



Carte 1 : Distribution du chêne-liège dans son aire géographique Méditerranéenne et atlantique (source : CEF 2005, programme européen CREOAK in WWF, 2006).

5.4. Importance socio-économique des subéraies

L'importance socio-économique des subéraies n'est pas à démontrer, les subéraies ont toujours été une source appréciable de revenus pour les forestiers et pour les riverains. Le liège provient de six pays principaux qui sont : le Portugal, l'Espagne, l'Algérie, le Maroc, la Tunisie et la France.

En Algérie, la demande nominale pour couvrir les besoins locaux et dégager un surplus à l'exportation serait de 30 000 T/an. Sur la base des capacités de transformation installées, ce chiffre ne sera atteint qu'avec l'augmentation des surfaces de liège exploitées en améliorant les conditions d'accès à certains massifs (Nsibi *et al.*, 2006).

Par ses propriétés physiques et mécaniques, le liège occupe une place importante dans l'économie industrielle, ses principaux domaines d'utilisation sont résumés dans le tableau 1. En agriculture, la poudre de liège joue le rôle d'amendement et les poussières sont aussi recommandées comme substrat au niveau des pépinières forestières, les résultats obtenus avec ces poussières sont satisfaisants.

Tableau 1 : Les principaux domaines d'utilisation du liège.

Domaine	Description	Propriété
Cristallerie	Ponçage au liège	Abrasif du liège
Construction	Ponçage de marbre, granit Isolation d'espaces restreints Isolation thermique, phonique	Produit abrasif Encombrement réduit Pouvoir retardant au feu
Construction navale	Circuits de calorifugeage Gaines de ventilation Revêtements avec caoutchouc	Isolant thermique Imputrescible Antidérapant
Aérospatiale	Isolation épaisseur 3-15 mm	Ecran thermique
Nucléaire	Capsule à isotope radioactif	Doublage contre choc et feu
Mécanique	Jauge de flottaison Joints mixtes avec caoutchouc Joints d'étanchéité Joints paliers transmission	Flottabilité, résistance aux agents chimiques Elasticité Compressibilité
Maroquinerie	Sacs, nécessaire de bureau, portefeuilles...	
Bouchage	Pharmacie, bouteilles d'huile, tonneaux...	
Loisirs	Balles, jouets, raquettes de tennis, jeu de fléchettes, flotteurs (pêche), bourres pour cartouches de chasse.	

4.5. Importance écologique

L'importance écologique du chêne liège réside dans son rôle de conservation des sols et la lutte contre la désertification. C'est aussi un anti polluant de l'environnement par la séquestration du dioxyde de carbone et la lutte contre l'effet de serre atténuant ainsi les effets du changement climatique. En effet, les forêts de chêne liège dans le monde absorbent environ 14 millions de tonnes de CO₂/an. Il faut aussi savoir qu'un arbre écorcé absorbera 3 à 5 fois plus de CO₂ qu'un autre non écorcé (association portugaise du liège). Le chêne liège contribue aussi à la recharge des réserves en eau et le contrôle des ruissellements (Berrahmouni et Regato, 2008). D'autre part, la forêt de chêne liège, abrite une biodiversité considérable.

5. Croissance rythmique

La croissance par vagues intéresse tous les Chênes étudiés jusqu'à présent, mais ce sont les Chênes pédonculés, les Chênes sessiles (Champagnat *et al.*, 1986a) et les Chênes rouges (Hanson *et al.*, 1986 et 1988 ; Dickson, 1988) qui sont analysés le plus précisément. Les données sont moins nombreuses pour les Chênes méditerranéens, Chêne vert (Lavarenne, 1975), Chêne liège (Alatou *et al.*, 1989), Chêne zeen (Alatou *et al.*, 1995) et absentes, à notre connaissance, pour les Chênes tropicaux (Schenell, 1986 in Alatou, 1990).

La croissance rythmique endogène des arbres est caractérisée par le fait que dans un milieu permettant un développement optimum, les tiges manifestent des alternances de temps d'activité et de repos assez régulières pour qu'apparaisse une périodicité (Champagnat *et al.*, 1986a). Ainsi la tige s'édifie par des vagues de croissance successives qui d'un point de vue morphologique se traduisent par la superposition de différents étages ainsi que par la production, au cours de chaque vague de croissance, de différents types foliaires. Ce dernier phénomène est qualifié de développement hétéroblastique. Ce mode de croissance est fréquemment rencontré chez les espèces ligneuses des régions tempérées et méditerranéennes (Chênes, Bouleau, Châtaignier, Saule...) mais c'est dans le monde équatorial et tropical qu'il trouve sa pleine expansion (Hévéa, Cacaoyer, Manguier...) (Crabbé, 1996). Parmi les différentes espèces utilisées pour étudier le déterminisme de la croissance rythmique, les Chênes dont le Chêne liège (*Quercus suber* L.) occupe une place importante. Cette espèce présente en effet un rythme de croissance de la tige marqué, que l'on peut aisément obtenir en conditions contrôlées. Ainsi, placée à 25°C, en jours longs, cette espèce produit une vague de croissance toutes les 5 semaines (Alatou *et al.*, 1995). La fréquence des vagues de croissance rend donc son utilisation très favorable à l'expérimentation. Chaque vague de croissance formée est composée d'ensembles foliaires de nature différente (ensembles foliaires à stipules écailleuses, ensembles foliaires à limbe assimilateur et les ensembles foliaires à limbe avorté qui marquent la fin de la vague répartie sur un axe orthotrope, ce phénomène est qualifié de développement hétéroblastique ou polymorphisme foliaire. De plus, il a été suggéré que le défaut d'accessibilité des nutriments ou des régulateurs de croissance constituerait des limitations majeures à l'une ou l'autre des manifestations de la croissance et pourrait ainsi intervenir dans l'apparition et l'expression du rythme (Champagnat *et al.*, 1986b; Barnola *et al.*, 1993). Cependant, à l'heure actuelle trop d'incertitudes subsistent quant à l'enchaînement des phénomènes conduisant à l'expression de la croissance rythmique.

6. Aspects et causes de dégradation du chêne liège

La présence du chêne liège dans la Méditerranée occidentale remonte à plus de 60 millions d'années. Depuis sa répartition géographique a beaucoup régressé sous l'influence de plusieurs facteurs de nature biotiques et abiotiques (Amandier, 2006).

En Algérie, comme on l'a précédemment signalé, la superficie occupée par cette espèce est étroitement réduite (Harfouche *et al.*, 2003). Cette régression s'est répercutée sur la production du liège.

Les changements climatiques ne sont pas les seuls coupables d'une telle régression. L'augmentation de la pression exercée par les populations sur cette importante ressource naturelle s'est manifestée par des phénomènes de mauvaise pratique de gestion telle que le surpâturage et les défrichements des forêts, la surexploitation, la mauvaise technique de récolte du liège et bien d'autres. Cette mauvaise gestion combinée aux changements climatiques a profondément marqué l'état sanitaire des forêts de chêne liège les rendant moins résistantes aux attaques d'insectes, aux maladies et aux incendies de forêts (Figure 7) (Amandier, 2006). Toutes ces données exposent l'état critique que connaissent les forêts de chêne liège à l'échelle mondiale mais aussi à l'échelle de notre pays malgré l'incontestable valeur économique de cette espèce. Les changements climatiques que connaît notre planète semblent jouer le plus grand rôle dans le dépérissement des subéraies. Il apparaît donc impératif d'étudier les conséquences exactes de ces changements climatiques (en particulier les températures extrêmes) sur le comportement écophysiological de cette espèce pour élaborer des stratégies de tolérance et d'adaptation afin de contrecarrer, sinon, atténuer ces effets.

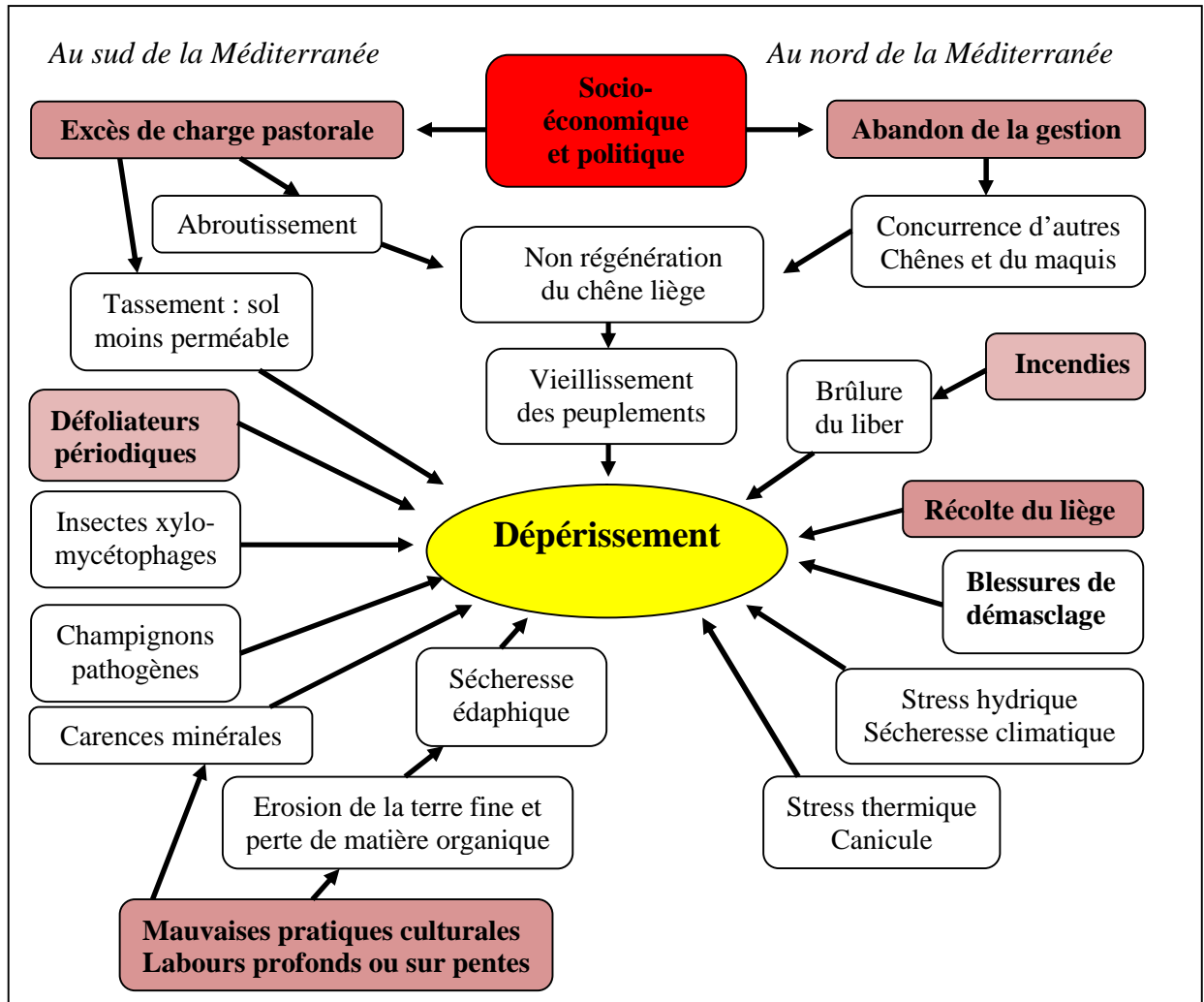


Figure 7 : Facteurs de dépérissement du chêne-liège (Amandier, 2006).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

1.1. Récolte

Notre étude est réalisée sur des semis de chêne liège (*Quercus suber* L.) issus de glands récoltés sur des sujets adultes de la région de la wilaya de Skikda (Filfila, au lieu-dit Col Besbes), sous une ambiance climatique sub-humide à hiver doux ($m = 10.55^{\circ}\text{C}$, $M = 24.25^{\circ}\text{C}$ et P est 830 mm) en novembre au moment de leur chute. Le site de prélèvement est localisé sensiblement à l'intersection du parallèle $36^{\circ}37'$ de latitude Nord et du méridien $7^{\circ}30'$ de longitude Est, à une altitude de 500 m.

1.2. Germination

Les glands sont triés et mis à tremper pendant quelques minutes dans l'eau courante. Ils sont mis à germer dans la vermiculite saturée d'eau à une température ambiante de 16°C et à l'obscurité, afin de limiter la production de semis à tiges multiples (Guibert et Pichon, 2001) pendant 20-30 jours.

1.3. Culture en pots

Les plantules sélectionnées (hypocotyle de 6 à 14 cm et un épicotyle de 1 à 2 cm de longueur), sont transférés en pots de 50 cm de diamètre et 60 cm de profondeur, remplis de la tourbe (matière organique 2%, matière sèche 3%, rétention en eau 30%, $\text{pH}=6.5$). Les pots sont placés en conditions semi-contrôlées, sous un éclairage de 6000 lux à la base des plants, une température de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et une photopériode de 16 heures et arroser régulièrement avec l'eau.

2. Description des stades et choix de prélèvement du matériel végétal

La totalité de l'étude porte sur la deuxième vague de croissance qui débute en moyenne 5 semaines après la mise en pots de semis. Le choix de la deuxième vague de croissance se justifie par Payan (1982) qui montre que le premier étage n'est pas représentatif de l'étage moyen car il se développe encore sous l'influence des réserves cotylédonaires qui varient d'un gland à l'autre (Alouie-Sossé *et al.*, 1994). Cette influence devient négligeable lors de l'installation de la 2^{ème} vague de croissance, choisie ici pour l'étude (Photo 1).

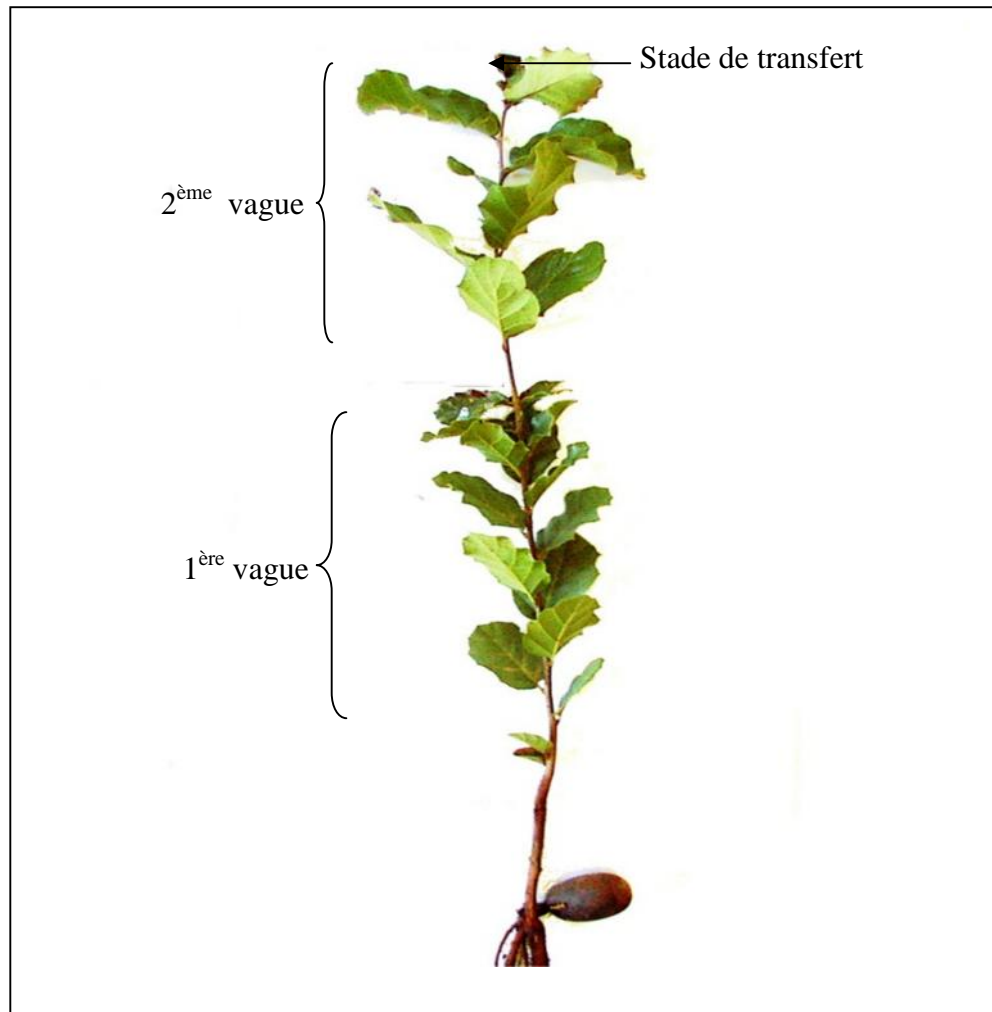


Photo 1 : plant de chêne liège ayant édifié deux vagues (Alatou *et al.*, 2007).

3. Traitements appliqués

Les semis de chêne liège sont transférés à des températures comprises entre -2°C et 44°C ($-2, 0, 2, 5, 38, 40, 42$ et 44°C) durant une période de 3 heures, puis remis en conditions initiales de culture. Les semis subissent trois stress successifs à ces mêmes températures après 24 heures d'intervalle entre le $3^{\text{ème}}$ et le $5^{\text{ème}}$ jour au stade repos apparent de la deuxième vague de croissance.

4. Analyse de la croissance

Les mesures sont effectuées régulièrement tous les deux jours ; pour chaque semis en $3^{\text{ème}}$ vague de croissance, les paramètres pris en compte sont les composantes temporelles (durées en

jours des phases de croissance en longueur de la tige et de repos du bourgeon apical), les composantes spatiales (ensembles foliaires à stipules écailleuses, ensembles foliaires à limbe assimilateur et ensembles foliaires à limbe avorté) et les paramètres morphologiques (nombre de feuilles, hauteur de la tige et la surface foliaire). La hauteur est déterminée à l'aide d'un ruban de précision 0.5 mm et la surface foliaire est mesurée sur la totalité de feuilles de la 3^{ème} vague de croissance par un Scanner de type (Area Meter AM 200).

5. Analyses biochimiques

5.1. Dosage de sucres solubles, du quercitol et de l'amidon

5.1.1. Préparation du matériel végétal

- Congélation immédiate des prélèvements avec l'azote liquide durant une minute après le transfert de semis aux différentes températures ;
- Conservation au congélateur (- 20°C), quelques jours à quelques semaines ;
- Séchage par lyophilisation ;
- Stockage au sec (sac plastique étanche avec du Silicagel) ;
- Broyage le plus fin possible et homogène (0.1 à 0.25 mm) ;
- Conservation au sec.

5.1.2. Extraction

Les sucres solubles, le quercitol et l'amidon contenus dans les différents organes sont extraits par incubation de 20 mg de poudre dans 1 ml d'éthanol à 80% (Moing et Gaudillière, 1992) pendant 30 minutes suivie d'une centrifugation à 14000 g pendant 10 minutes. Trois extractions successives sont effectuées en faisant varier la solution d'éthanol utilisée. Lors de la 1^{ère} extraction, nous utilisons une solution d'éthanol à 80% contenant du mannitol à 0.125g/l qui sert d'étalon interne lors des dosages par HPLC (High performance liquid chromatography). Pour la 2^{ème} extraction, nous utilisons toujours de l'éthanol à 80% mais sans mannitol. Enfin pour la 3^{ème} extraction, l'éthanol est à 50% afin d'extraire des métabolites peu solubles dans l'alcool (Figure 8).

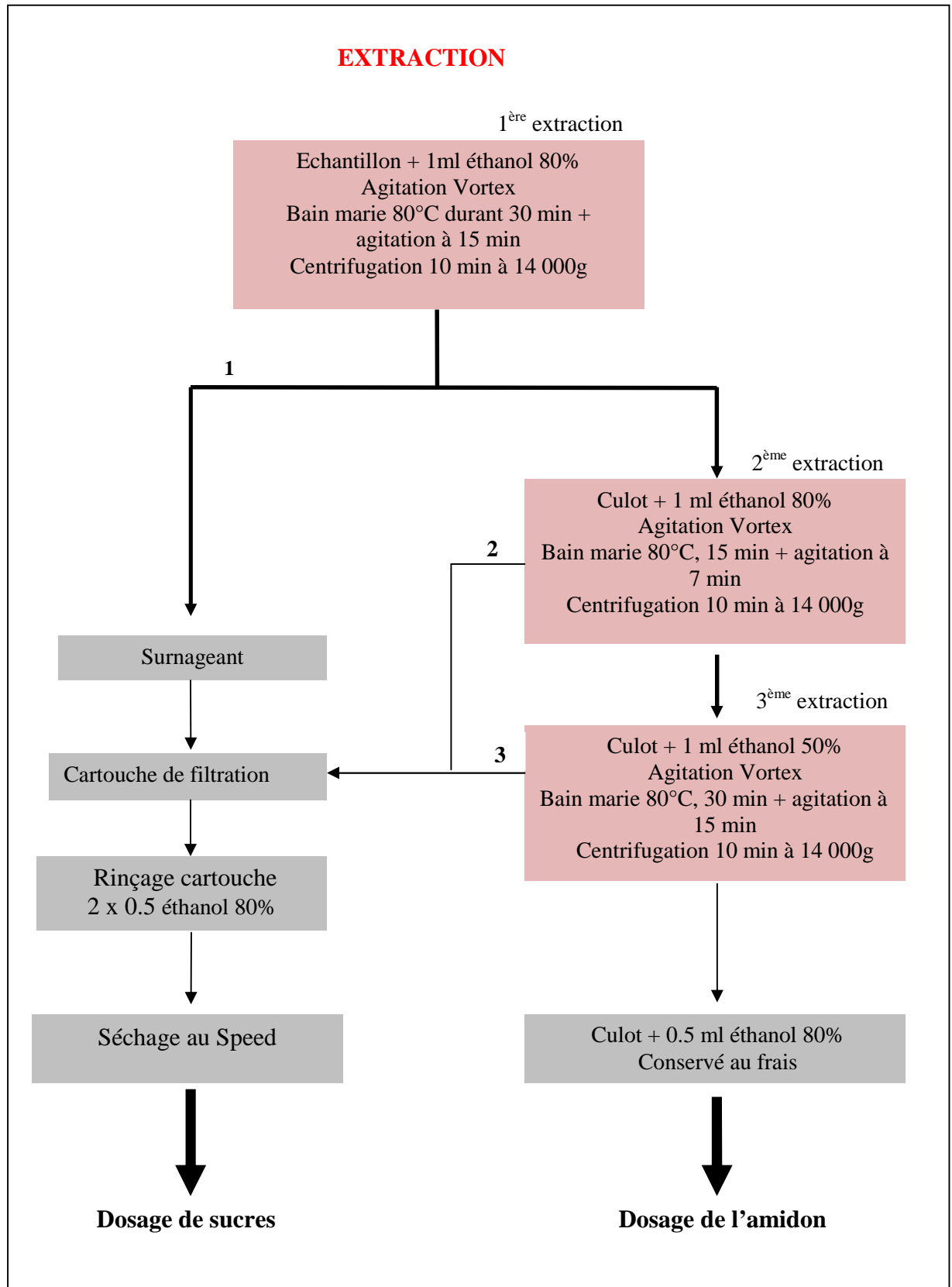


Figure 8: Extraction des sucres

5.1.3. Préparation des résines (annexe I.1)

5.1.4. Filtration des sucres solubles sur le charbon actif

Des colonnes sont préparées à l'aide d'embouts de pipettes coupés à l'extrémité puis remplis comme suit :

(Carré de toile polyester + 100 µl de Dowex 50 + 150 µl AGX + 100 PVPP : polyvinyl polyprolidone + 550 µl du charbon actif) (annexe I.2), ensuite vider le surnageant d'un seul coup en veillant à ne pas perdre la matière sèche. Le charbon actif est uniquement utilisé dans le cas des extraits alcooliques obtenus à partir des poudres des échantillons. Il sert à éliminer les molécules non retenues par le PVPP ainsi qu'à clarifier les extraits. Le PVPP sert à éliminer les grosses molécules et les polyphénols. Préalablement, chaque colonne est réhumidifiée avec 100 µl d'éthanol à 80%. Ainsi, une légère pression est appliquée pour accélérer le passage de l'extrait alcoolique. Le but de résines est de piéger toutes les molécules chargées. Elles ne laissent donc passer que les glucides. Les extraits alcooliques issus de la totalité des trois surnageants sont filtrés au fur et à mesure de leur récolte. Nous rinçons ensuite deux fois par 1 ml de l'éthanol à 80% avant de faire sécher les solutions ainsi obtenues au « Speed-Vac » pendant une nuit. Pour doser les sucres et le quercitol, nous avons utilisé une colonne échangeuse de cations (type METROHM AG CH-9101 Herisau). La séparation des sucres se fait selon deux critères :

- Les polyoses sont séparés selon leur degré de polymérisation (le temps de rétention des sucres et en relation inverse avec leur degré de polymérisation).
- Les hexoses sont séparés selon leur affinité.
- L'ordre d'élution des différents sucres étudiés (annexe I.3).
- La détection à la sortie de la colonne se fait par réfractométrie différentielle. Pour chaque composé, il y a apparition d'un pic dont la surface est proportionnelle à la quantité de ce composé.

5.2. Amidon

Lors de l'extraction des sucres solubles, nous obtenons un culot contenant l'amidon. Celui-ci est séché sous vide au Speed Vac, au moins une heure et s'assurer que les poudres sont sèches (appréciation visuelle) ; les grains de poudre doivent se détacher et peser l'ensemble : culot sec + tube bouché (P1).

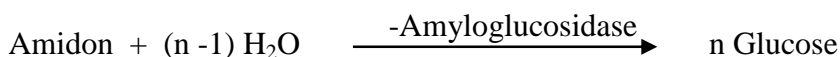
Ajouter 1 ml de solution de NaOH à 0.02N et bien remettre en suspension le culot au rotor.

5.2.1. Dispersion de l'amidon

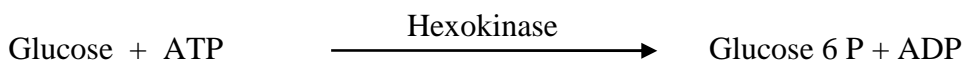
- Pour détruire les parois cellulaires et libérer l'amidon des amyloplastés, les micros tubes étaient placés au bain marie à 90°C, pendant 60 minutes, avec 2 agitations à 20 et 40 minutes.
- Après dispersion, centrifuger légèrement les micros tubes pendant 30 secondes pour les refroidir.

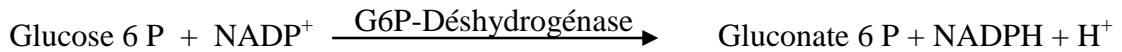
5.2.2. Hydrolyse de l'amidon

- Préparation des solutions (annexe I.4).
- Ajouter 100 µl d'amyloglucosidase à pH 4.2 (Boehringer, 1984).
- Agitation au rotor.
- Incuber pendant une heure à 50°C au bain marie, bien agiter à 20 et 40 minutes.
- Centrifuger à 14 000 g pendant 10 mn et ramener les échantillons à température ambiante.
- Peser l'ensemble : culot + tube bouché + hydrolysats (P2) et P2-P1 donne le volume total d'échantillon dans le tube.
- On utilise un portoir avec une micro cuve pour le blanc réactif, une pour chacune des solutions témoins glucose (0.1g/l et 0.4g/l) et une pour chaque essai.
- Après l'ajout du tampon réactionnel (750 µl) (préparation des microcuves : Annexe 1.5) ; on fait une prélecture des densités optiques (DO1) au spectrophotomètre à 340 nm (micro cuves blancs).
- Ajout de 10 µl de mélange enzymatique hexokinase/glucose 6 Phosphate déshydrogénase (HK/G6PDH) (Kunst *et al.*, 1984), agitation pendant 20 à 30 minutes au Vortex à vitesse lente, attente 10 minutes.
- Lecture des DO2 (glucose).
- Le dosage de l'amidon passe d'abord par son conversion en glucose élémentaire :



L'oxydation en glucose est couplée à une réduction du NAD(P) en NAD(P)H :





La formation de NAD(P)H est proportionnelle à la quantité de glucose (courbe d'étalonnage : annexe I.6). Cette molécule a une absorbance spécifique à 340 nm, à la limite du rayonnement UV.

On déduit la quantité de glucose en appliquant la loi de Beer-Lambert (Boehringer, 1984) :

$$\mathbf{DO = E \times c \times d}$$

$$\mathbf{DO = DO_2 (glc) - DO_1 (glc)}$$

E : coefficient d'extinction molaire du NADPH : 6.3 (l/ mmol/cm à 340 nm)

c: concentration en mg de glucose / g M.S.

d : épaisseur de la cuve (1 cm)

5.3. Dosage de la proline

La méthode utilisée est celle de Troll et Luidsley en 1955. Pour chaque échantillon prélevé (100 mg de la matière végétale), est immédiatement pesé, puis placé dans un tube à essai. Un volume de 2 ml de méthanol à 40 % est ajouté à l'échantillon, et le tout est chauffé à 85°C dans un bain-marie pendant 1h à 85°C. Après refroidissement, 1 ml de la solution d'extraction est ajouté à 2 ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1 ml du mélange eau distillée-acide acétique-acide orthophosphorique de densité 1.7 (120, 300, 80 : v/v/v). L'ensemble est porté à ébullition pendant 30 mn au bain-marie à 100°C, puis refroidi et additionné 5 ml de toluène.

Après agitation au Vortex, 5 mg de sulfates de sodium (Na₂ SO₄) est ajoutée dans chaque tube. La lecture de la densité optique se fait à 528 nm.

5.4. Dosage de protéines

5.4.1. Extraction

Dans le cas particulier des protéines pariétales, insolubles dans nos conditions expérimentales, il est nécessaire d'utiliser une extraction à la soude 1N avant un dosage colorimétrique par la méthode de Lowry (1951). Cette extraction à la soude permet d'obtenir les protéines solubles et les protéines insolubles (protéines totales).

Peser 2x2g de tissu foliaire (limbes matures de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance, tiges et racines), les broyer dans 1 ml de soude 1M. A la fin du broyage 3 ml de soude sont ajoutés. Laisser en contact pendant 1h 30mn (au minimum) à la température ambiante. Transvaser le broyat dans un tube à centrifuger et rincer le mortier et le pilon soigneusement avec 2 x 1mL de soude 1M. Le très fin broyat obtenu est centrifugé 10 minutes à 4000 RPM, puis le surnageant recueilli est amené à 10 ml dans une éprouvette (avec NaOH 1M). Le dosage est réalisé sur une partie aliquote après avoir dilué 10 fois et 20 fois l'extrait.

5.4.2. Dosage colorimétrique

Les protéines donnent en présence des réactifs de Lowry et de Folin, une coloration bleue caractéristique. La coloration finale résulte :

- De la réaction du biuret qui se produit avec le réactif de Lowry (cuivre en milieu alcalin) ;
- De la réduction des acides phosphotungstique et phosphomolybdique (réactif de Folin) par la tyrosine et le tryptophane des protéines. Dans la gamme de concentrations données, l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans la solution.

- Les solutions étalons sont obtenues à partir d'une solution de sérum-albumine à 1 g.l⁻¹, réaliser à 50 µg.ml⁻¹, 100 µg.ml⁻¹, 150 µg.ml⁻¹, 300 µg.ml⁻¹ dans des jaugés de 50 ml.

5.4.3. Mode opératoire

La méthode de Lowry consiste à préparer quatre types de solutions :

Solution A { 100 ml de Bicarbonate de sodium (Na₂CO₃ à 2% dans 0.1 N NaOH)
1 ml de Tartrate double Na et K à 2%
1 ml de Sulfates de cuivre (CuSO₄ à 1%)

Et ce juste avant le dosage, on prépare la solution B qui est constituée de réactif de Folin-Ciocalteu dilué 1/3.

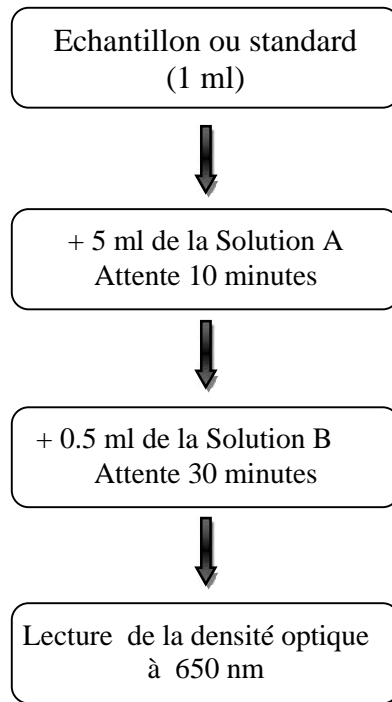


Figure 9 : Dosage de protéines

Les teneurs en protéines sont obtenus à partir de l'équation suivante :

$$Y = 1.4751 x$$

Y : densité optique

x : quantité de protéines en mg.gMF^{-1}

5. Analyse statistique

L'analyse de la variance a été appliquée à toutes les variables étudiées. Des différences significatives entre les différents traitements pour chaque paramètre mesuré ont été testées grâce au test de Newman-Keuls calculé au seuil de 5 %. Le logiciel utilisé est Excel STAT (2009). Pour déterminer la dépendance et la proportionnalité intervariables, le degré de coefficient de signification des corrélations (r) est calculé au seuil de 5 % ($P = 0,05$). Les corrélations existantes entre les stress et les différents métabolites identifiés sont mises en évidence par l'analyse en composantes principales (ACP) dont le principe est de représenter un phénomène multidimensionnel par un graphique à deux ou plusieurs dimensions.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats

Les paramètres de croissance (longueur de tiges, nombre de feuilles et surface foliaire, allongement caulinaire et repos apparent) et les paramètres biochimiques : teneurs en proline, sucres solubles (glucose, fructose, saccharose), quercitol, amidon et protéines totales ont été mesurés dans les différents organes des semis de chêne liège soumis ou non aux stress thermiques.

1. Les basses températures

1.1. Croissance en hauteur, surface foliaire et nombre de feuilles

L'analyse statistique des résultats obtenus révèle l'existence d'une différence très significative entre les différentes températures concernant les paramètres précédents pour la troisième vague de croissance de semis de chêne liège soumis à des basses températures comprises entre 5°C et -2°C durant une période de 3 heures (S1) (Annexe II.1). Les températures 5°C, 2°C et 0°C sont statistiquement similaires avec le témoin pour la croissance en hauteur (Figure 10a) et le nombre des feuilles (Figure 10b). La température -2°C a réduit la croissance en hauteur et le nombre des feuilles d'une façon considérable; ces taux sont respectivement de 32% et 25% par rapport au témoin ; alors que pour la surface foliaire aucune différence n'est observée pour les différentes températures (Figure 10c).

Les résultats obtenus lors du transfert des semis de chêne liège durant une période de 6 heures (S2) sont illustrés dans la figure 10. Les traitements 5°C et 2°C n'ont pas de différence significative avec le témoin pour la croissance en hauteur et le nombre de feuilles (Annexe II.1) ; tandis que les traitements 0°C et -2°C ont un effet néfaste en réduisant la croissance en hauteur (Figure 10a) et le nombre de feuilles enregistrées (Figure 10b). L'analyse de la variance pour la surface foliaire indique également une différence très significative entre les différentes températures (Figure 10c). Chaque température est significativement différente de l'autre. En effet, le test de Newman-Keuls accorde un groupe de moyenne différente pour chaque traitement ; A pour le témoin (25°C) avec 1145 mm² qui caractérise la plus forte moyenne de la surface foliaire, B pour la température 5°C, BC pour 2°C, C pour 0°C et enfin D pour la température -2°C qui caractérise la plus faible moyenne (634 mm²).

Cette même analyse statistique sur la croissance en hauteur, du nombre de feuilles et de la surface foliaire de semis de chêne liège soumis aux mêmes températures précédentes durant une période de 9 heures (S3) indique que les différences sont très significatives (Annexe II.1). Les réductions dues au stress au froid sont proportionnelles avec son intensité et elles sont illustrées par la figure 10. Les taux de réduction les plus importants sont observés à -2°C, ils sont de 62% pour la surface foliaire, 57% pour le nombre de feuilles et 72% pour la croissance en hauteur de la tige par rapport au témoin.

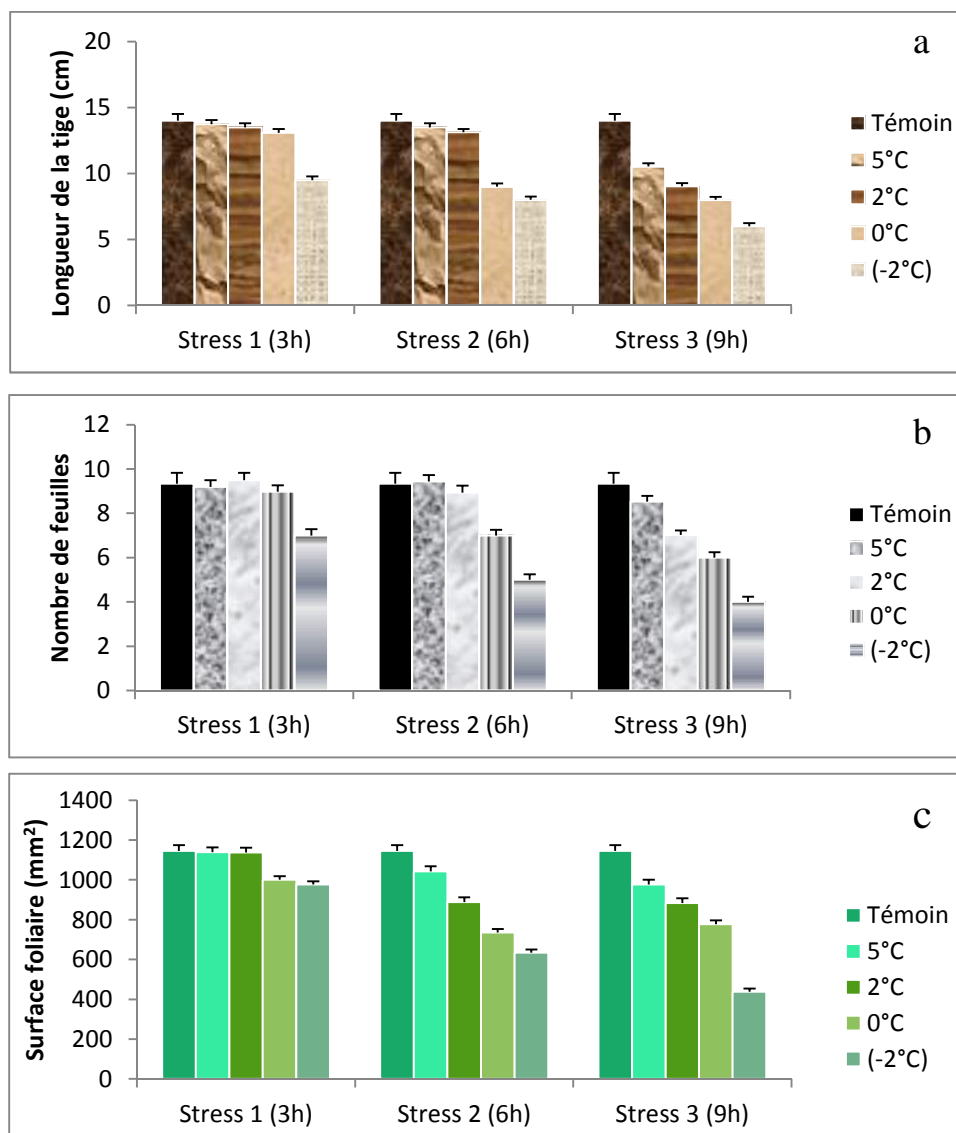


Figure 10 : Paramètres morphologiques a : hauteur des tiges ; b : nombre de feuilles, c : surface foliaire.

La comparaison de trois stress pour la hauteur de la tige, le nombre de feuilles et la surface foliaire montre des différences significatives entre eux (Annexe II.1). Le S1 vient toujours en premier groupe A pour les trois paramètres précédents ; alors que le S2 vient en 2^{ème} groupe pour la croissance en hauteur et le nombre de feuilles et occupe le même groupe avec le S3 pour la surface foliaire.

1.2. Repos apparent, allongement caulinaire et l'hétéroblastie

Les semis de chêne liège transférés à des températures comprises entre 5°C et -2°C durant une période de 3 heures (S1), 6 heures (S2) et 9 heures (S3), ont subi des changements au niveau des composantes spatio-temporelles.

D'après nos résultats, le chêne liège cultivé à 25°C ± 2°C (témoin) présente une croissance rythmique caractérisée par une succession d'unités structurales identiques (vagues ou flushs). Une vague de croissance dure en moyenne 5 semaines, réparties respectivement en une phase d'allongement caulinaire qui dure 15 jours et une phase de repos apparent de trois semaines (Tableau 2). Le nombre d'ensembles foliaires à limbe assimilateur diminue progressivement d'une vague de croissance à la suivante (Figure 11) et l'hétéroblastie reste faible et marquée par un nombre de 2 à 3 écailles.

Tableau 2: Durées moyennes (en jours) des phases d'allongement de la tige, de repos apparent du bourgeon apical et ensembles foliaires des semis de chêne liège cultivés à 25°C ± 2°C, en jours longs de 16h, (n=7).

Vagues de croissance	Allongement caulinaire (jours)	Repos apparent (jours)	Écailles	Limbes assimilateurs	Limbes avortés
1	19.33 ± 1.5	26.2 ± 3.2	2.7 ± 0.2	12.16 ± 1	1.7 ± 0.4
2	14.3 ± 1.4	21.3 ± 1.6	2.5 ± 0.4	10.2 ± 1.4	2.2 ± 0.2
3	15.6 ± 0.7	22.5 ± 3.6	2.2 ± 0.7	9.3 ± 1.6	2.4 ± 0.5
4	16 ± 1.2	20 ± 4.5	2.5 ± 1.0	9.0 ± 1.3	2.6 ± 0.5

Les phases d'allongement couvrent une période de deux semaines pour l'ensemble de semis traités durant 3h (S1) et elles sont identiques à celles du témoin. Les périodes de repos pouvant atteindre plus de 4 semaines, sont plus longues par rapport au témoin pour la 2^{ème} vague de croissance (Tableau 3).

Tableau 3 : Durées moyennes des phases d’allongement de la tige et de repos apparent (en jours) des semis de chêne liège cultivés à 25°C en jours longs de 16h et transférés pendant 3h (S1), 6h (S2) et 9h (S3) aux basses températures.

Facteurs	Vagues	Allongement caulinaire (jours)	Repos apparent (jours)	
Stress 1 (durée : 3h)				
Températures	5°C	2	14.7 ± 1.40	32.5 ± 3.53
		3	17.5 ± 3.53	18.2 ± 1.41
	2°C	2	14.7 ± 1.40	30.5 ± 3.53
		3	19.1 ± 9.89	15.5 ± 4.94
	0°C	2	14.7 ± 1.40	24.5 ± 6.36
		3	29.5 ± 16.3	17.5 ± 3.53
	-2°C	2	14.7 ± 1.40	11.0 ± 5.65
		3	46.1 ± 1.41	9.50 ± 3.53
Stress 2 (durée : 6h)				
Températures	5°C	2	14.7 ± 1.40	19.0 ± 5.65
		3	17.5 ± 3.53	26.0 ± 4.24
	2°C	2	14.7 ± 1.40	18.0 ± 2.82
		3	17.5 ± 3.61	22.5 ± 3.53
	0°C	2	14.7 ± 1.40	31.0 ± 2.82
		3	18.5 ± 2.12	17.0 ± 2.82
	-2°C	2	14.7 ± 1.40	32. ± 5.65
		3	24.5 ± 3.53	11.5 ± 2.12
Stress 3 (durée : 9h)				
Températures	5°C	2	14.7 ± 1.40	21.2 ± 1.71
		3	14.8 ± 1.90	22.1 ± 1.23
	2°C	2	14.7 ± 1.40	20.2 ± 2.41
		3	14.3 ± 2.82	19.5 ± 2.12
	0°C	2	14.7 ± 1.40	30.3 ± 2.82
		3	16.1 ± 0.82	23.5 ± 0.70
	-2°C	2	14.7 ± 1.40	30.5 ± 0.70
		3	10.5 ± 1.70	23.5 ± 4.94

Concernant la 3^{ème} vague de croissance, les durées des phases d'élongation sont légèrement supérieures au témoin pour les traitements 5°C et 2°C ; alors qu'elles sont augmentées fortement à 0°C et -2°C (29.5 ± 1.61 js et 46 ± 1.41 js). Si les durées d'allongement sont augmentées, les périodes de repos sont diminuées surtout pour la température -2°C ($9,5 \pm 3.53$ js). Le nombre de feuilles à limbe assimilateur est sensiblement diminué par rapport au témoin (Figure 12).

En ce qui concerne les semis soumis aux basses températures durant une période de 6 heures (S2), les phases d'allongement sont identiques aux témoins ; les périodes de repos sont importantes pour les traitements 0°C et -2°C, on note à la fin de la 2^{ème} vague de croissance en moyenne 1 mois pour l'ensemble des semis traités. La durée de repos de la 3^{ème} vague de croissance est plus courte pour la température -2°C et 0°C (11.5 ± 2.12 js ; 17 ± 2.82 js), elle est identique au témoin à 2°C, et sensiblement supérieure au témoin à 5°C (26 ± 4.24 js). Les phases d'allongement sont plus longues par rapport au témoin surtout pour le traitement -2°C (24.5 ± 3.53 js). Le nombre de feuilles est réduit à 50% par rapport à celui cultivé à 25°C.

Les durées de la phase d'allongement sont également similaires à celles des témoins cultivés à 25°C pour les températures 5°C et 2°C, elles sont augmentées plus que 4 semaines à 0°C et -2°C pour la 2^{ème} vague de croissance pour les semis de chêne liège transférés durant une période de 9 heures (S3) (Figure 13) . En ce qui concerne la 3^{ème} vague de croissance, les phases d'allongement de l'axe sont en durées sensiblement proches de celles observés chez le témoin pour les traitements 5°C, 2°C et 0°C ; par contre elles sont diminuées d'une façon très importante à -2°C ($10,5 \pm 0.70$ js). Les périodes de repos restent proches de celles du témoin pour l'ensemble des traitements. L'hétéroblastie est faible, marquée par un nombre réduit d'écailles.

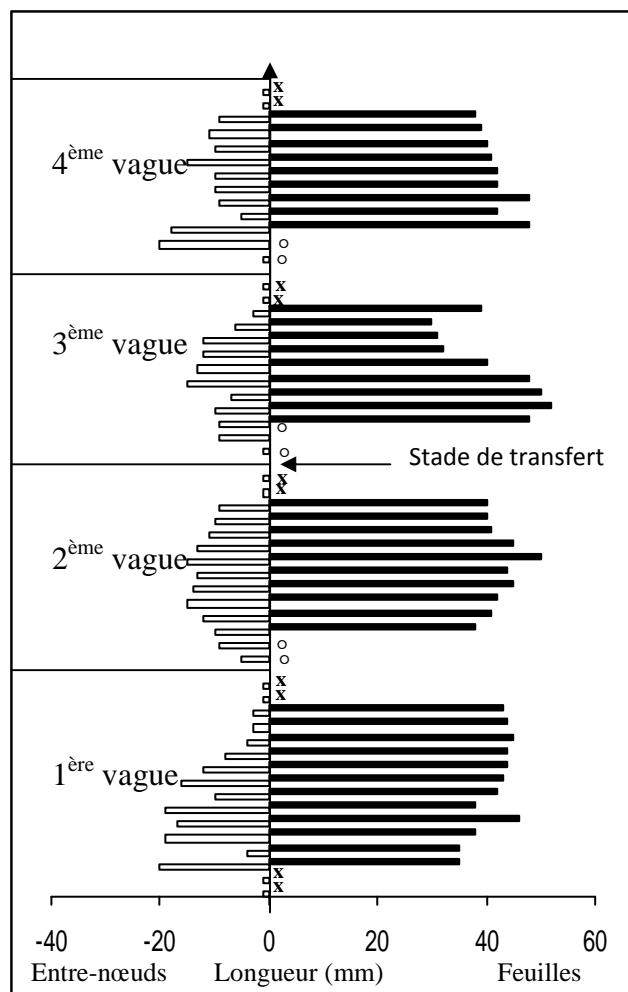


Figure 11: Morphogenèse d'un semis de chêne liège cultivé en conditions contrôlées à 25°C en jours longs de 16 heures (plant témoin). **o** : écailles ; **x** : limbes avortés.

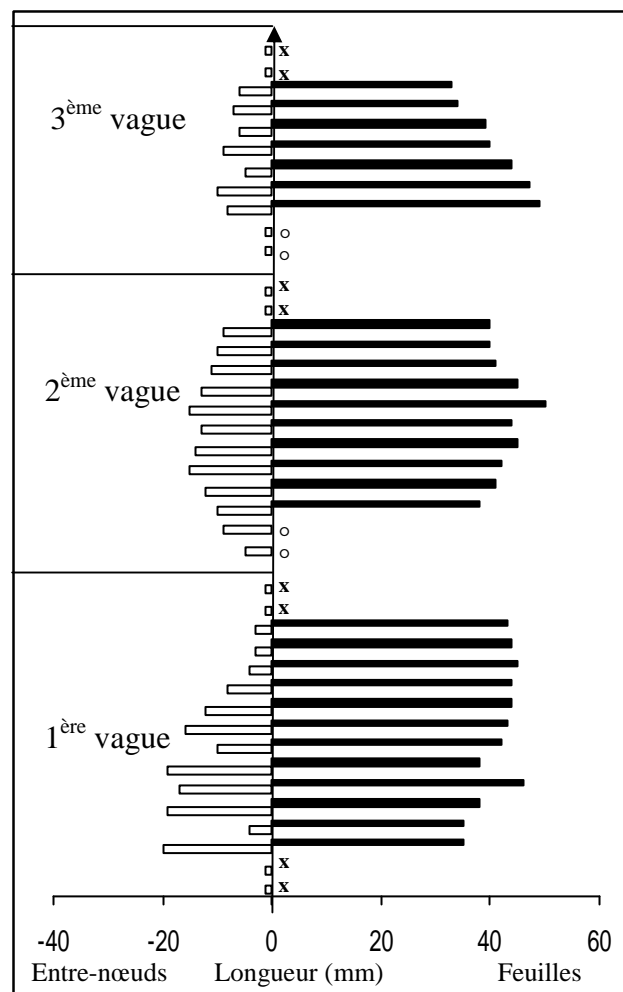


Figure 12: Morphogenèse d'un semis de chêne liège transféré à -2°C durant 3h (S1) puis retour aux conditions initiales de culture.

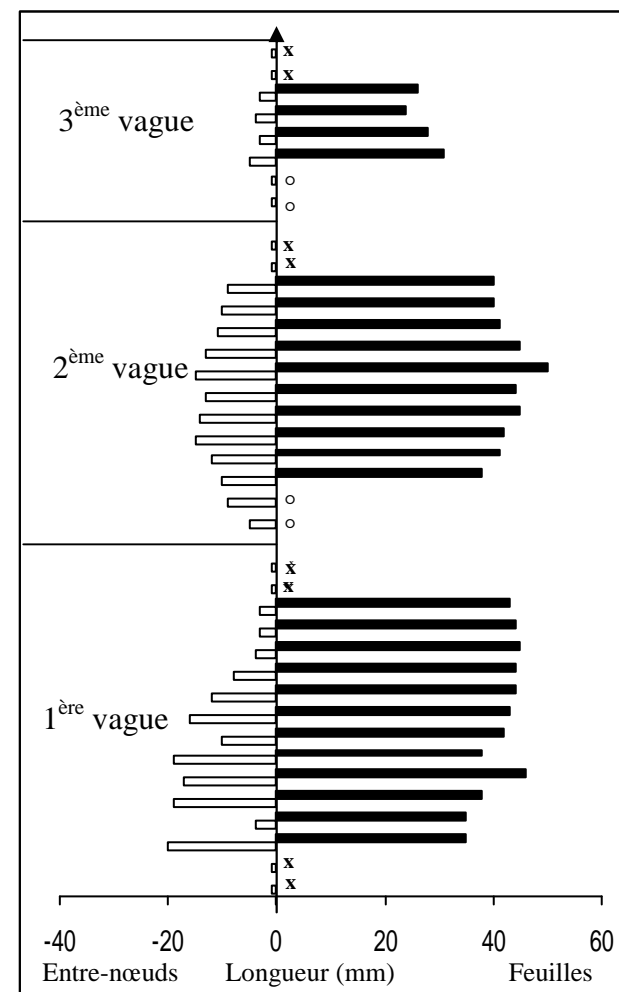


Figure 13: Morphogenèse d'un semis de chêne liège transféré à -2°C durant 9 h (S9) puis retour aux conditions initiales de culture.

1.3. Les caractères biochimiques

1.3.1. La proline

Les résultats obtenus indiquent qu'une évolution du contenu en proline dans les différents organes soumis aux basses températures durant une période de 3 heures (S1). Cette évolution est 2 fois plus importante à -2°C dans les feuilles de deux vagues de croissance et les racines (Figure 14a). Dans les tiges, une légère augmentation est à noter à 5°C, 2°C et 0°C, qui est respectivement de (40%, 51% et 24%) ; alors qu'elle est similaire au témoin pour le traitement -2°C. Comparativement aux feuilles de deux vagues de croissance, ainsi qu'aux tiges, les racines accumulent plus de proline. Les taux d'accumulation sont proportionnels à l'intensité de froid où ils varient entre 21 % à 5°C et 173% à -2°C.

Les mesures obtenues indiquent que les variations des teneurs en proline dépendent de la température et parfois de l'organe considéré pour les semis transférés durant une période de 6 heures (S2) (Figure 14b). A l'exception de la feuille de la vague 2 où la quantité de proline reste quasiment doublée, les quantités les plus importantes sont observées à 2°C. La valeur la plus élevée est observée chez les racines (8.32 $\mu\text{mol mg/M.S}$). Dans nos conditions expérimentales, l'évolution de la teneur en proline peut globalement être décomposée en deux phases bien distinctes : une phase d'accroissement observée entre 25°C et 2°C et une phase de décroissance observée entre 2°C et -2°C. Toutefois, cette diminution de la quantité de proline est plus rapide au niveau des feuilles que de la tige et la racine.

Au niveau des différents organes de semis de chêne liège, les basses températures appliquées durant 9 h (S3) ont provoqué des variations d'accumulation de proline (Figure 14c) où une augmentation considérable est obtenue à 5°C et 2°C (234.5% et 165%) ; alors que les teneurs en proline sont identiques au témoin à 0°C et restent inférieures à -2°C (31%) dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance. Au niveau de la 2^{ème} vague de croissance, les teneurs en proline sont similaires à celles de la vague précédente, avec une teneur maximale à 2°C et 5°C (128%). Au niveau des tiges et des racines, on note une accumulation forte à 2°C qui est respectivement (61% et 209%). Cependant, cette augmentation n'a pas été significative à 0°C. Ainsi, une diminution de 58% au niveau des tiges et de 52% au niveau des racines et donc marquée à -2°C.

L'analyse de la variance est très significative entre les températures, entre organes et entre les stress (Annexe II, Tableaux 2, 3 et 4). Selon les stress, les températures et les organes, les teneurs décroissantes sont dans l'ordre suivant :

[S2] > [S1] > [S3] ; [2°C] > [0°C] > [-2°C] > [5°C] > [Témoin] ; [R] > [T] > [V1] > [V2]

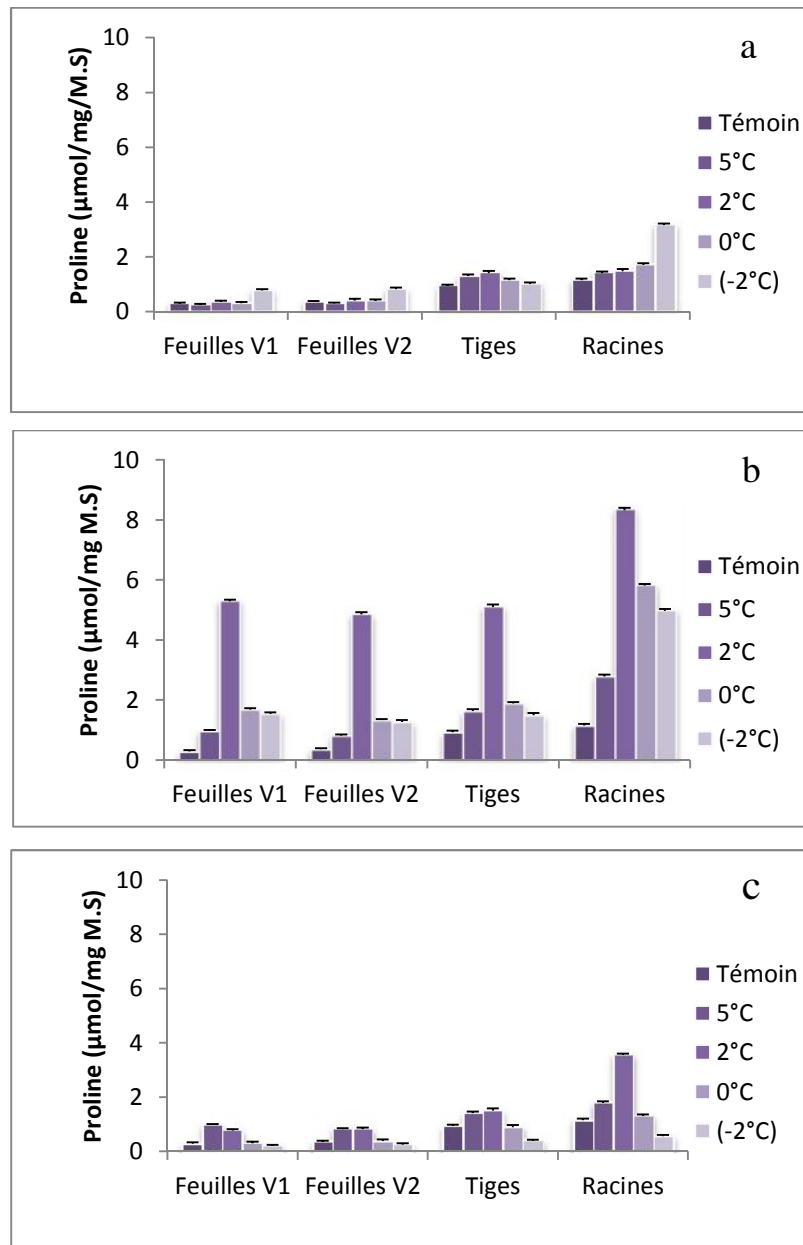


Figure 14: Teneur en proline chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures : a : S1 ; b : S2 ; c : S3.

1.3.2. Les protéines

Les résultats de la figure 15a montrent que les plus importantes teneurs en protéines sont retrouvées dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance, comparativement aux feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, aux tiges et aux racines. Les taux d'augmentation de protéines dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance des semis soumis aux basses températures durant une période de 3 heures (S1) sont très significatifs (Annexe II, Tableau 5). Les semis stressés produisent plus de protéines foliaires en comparaison avec le témoin. Les gains dus au stress au froid sont plus élevés et varient entre 22% au traitement -2°C à 107% au traitement 5°C. Au niveau des feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, une forte accumulation de protéines est observée à partir de 5°C, elle atteint son maximum à 2°C (40%), et une diminution à -2°C de 25%. Dans les tiges, une accumulation à 5°C de 42% est observée, puis elle retrouve son niveau initial à partir de 0°C. Au niveau racinaire, les taux d'augmentation sont inversement proportionnels à l'intensité de froid. Ces taux varient entre 88% à -2°C à 132% à 5°C.

Une Anova (5%) est effectuée sur les valeurs de protéines dans les semis transférés à des basses températures comprises entre 5°C et -2°C. Elle révèle une différence très hautement significative entre les traitements d'une part, et entre les organes d'autre part (Annexe II, Tableau 6). Au niveau des semis, l'Anova confirme qu'il y a une augmentation de protéines induite par le stress au froid. Cette augmentation est plus importante au traitement 5°C qui occupe le groupe A avec la moyenne la plus élevée et les traitements 2°C, 0°C et -2°C sont affectés successivement aux groupes B et C avec des moyennes plus élevées par rapport au témoin. Le groupe D correspond au témoin. Au niveau des organes, les différences sont très hautement significatives (test Newman-Keuls au seuil 5%). Les feuilles de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance (A et B) produisent une quantité plus élevée de protéines que celle des tiges et racines qui occupent le dernier groupe C avec les plus faibles moyennes.

Les plants stressés pendant 6 heures (S2) produisent des teneurs en protéines statistiquement différentes. A 2°C et 0°C, l'accumulation est nettement plus grande au niveau des feuilles de la 1^{ère} vague de croissance, elle est respectivement de 201% et 91% ; alors qu'on note une diminution de 24% au traitement -2°C. En ce qui concerne les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, une augmentation de la teneur en protéines est également augmentée à 2°C et 0°C ; les taux d'augmentation sont respectivement de 69% et 44% ; alors que pour les traitements 5°C et

-2°C, les teneurs en protéines sont identiques à celles de témoin. L'analyse de la variance indique que les différences entre les teneurs en protéines dans les tiges de semis stressés aux basses températures sont très significatives (Annexe II, Tableau 5). Les gains dus au stress thermique (basses températures) sont proportionnels avec son intensité sauf à 5°C où ils sont identiques au témoin (Figure 15b) et atteignent leur maximum à 0°C (62%). Comme pour les tiges, la teneur en protéines des racines de semis est globalement influencée positivement par le stress au froid. Les taux d'augmentation liées au stress thermique varient de 97% à 5°C à 119% à -2°C.

L'analyse statistique des résultats des teneurs en protéines chez les semis de chêne liège soumis à un stress thermique de 6 heures (S2), montre une accumulation très nette par rapport au témoin (Annexe II, Tableau 6). Les différences sont très hautement significatives entre les différentes températures. Les fortes moyennes sont enregistrées aux groupes A et B et correspondent successivement aux traitements 2°C et 0°C. Ainsi, le groupe C correspond au traitement -2°C et 5°C avec le témoin. On peut conclure que les basses températures ont induit une augmentation des protéines chez les semis de chêne liège. Au niveau des organes, l'analyse statistique montre également des différences très hautement significatives. Les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance (groupe A) accumulent plus de protéines par rapport à la 2^{ème} vague de croissance (groupe B) et aux tiges et aux racines qui occupent le dernier groupe C avec les plus faibles moyennes.

La teneur en protéines dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance des semis de chêne liège soumises aux basses températures durant 9 heures (S3) a augmentée de 84% au traitement -2°C, de 168% au traitement 2°C. Les résultats illustrés dans la figure 15c, montrent que le stress au froid a induit une accumulation remarquable de protéines dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance à 2°C et 5°C, la teneur en protéines est deux fois plus importante comparativement au témoin. Pour les autres traitements, les teneurs sont similaires au témoin. En comparant l'évolution de la quantité de protéines chez les tiges stressées à différentes températures, on note que les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus à la 2^{ème} vague de croissance. Le dosage des protéines totales, extraites à partir des racines des semis stressées, a montré une forte concentration à 5°C (234%).

L'analyse statistique des résultats des teneurs en protéines dans les semis transférés à un stress au froid compris entre 5°C et -2°C, montre une accumulation très nette par rapport au témoin. Les différences sont significatives entre les différents traitements. Les fortes moyennes sont enregistrées dont les groupes A et B correspondant successivement aux traitements 5°C, 2°C, 0°C et -2°C. Ainsi, le groupe C correspond au témoin avec la plus faible moyenne (Annexe II, Tableau 6). Au niveau

des organes, l'analyse statistique montre également des différences très significatives. Les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance accumulent plus de protéines par rapport à celles de la 2^{ème} vague de croissance, tiges et racines. D'après la figure 15, on remarque que les valeurs moyennes de protéines relevées au niveau de différents organes de semis de chêne liège soumis aux basses températures trois stress successifs se présentent dans l'ordre suivant (Annexe II, Tableau 7) :

S3] > [S2] > [S1]; [2°C] > [5°C] > [0°C] > [-2°C] > [Témoin]; [V1] > [V2] > [T et R]

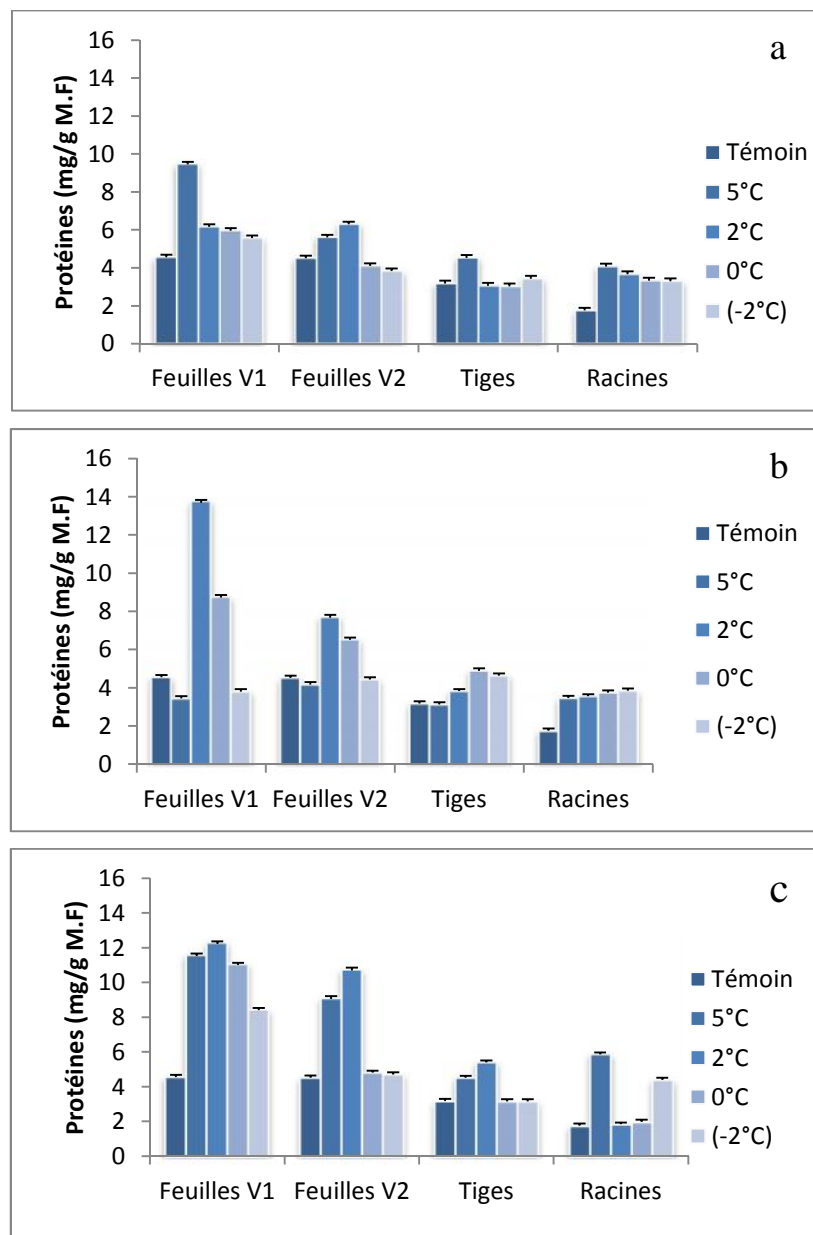


Figure 15 : Teneur en protéines totales chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures : a : S1 ; b : S2 ; c : S3.

1.3.3. Les sucres solubles

1.3.3.1. Le saccharose

Le saccharose est présent dans les feuilles témoins de deux vagues de croissance (Figure 16a). Il est également présent dans les feuilles stressées mais avec une quantité très faible. Contrairement aux feuilles, une légère augmentation est observée dans les tiges à 5°C (23%) avec une diminution pour les autres traitements et qui atteint son maximum de 47% à -2°C. Dans les racines, la teneur en saccharose est augmentée à 5°C et 2°C et elle est identique au témoin à 0°C et -2°C (Annexe II, Tableau 8).

L'analyse de la variance à deux critères de classification montre une différence très significative (Annexe II, Tableau 9). Pour les températures, le témoin et 5°C sont classés en premier groupe avec la plus grande moyenne, le second contient 2°C et le dernier groupe correspond à 0°C et -2°C avec les plus faibles moyennes. Pour les organes, les racines occupent le premier groupe et les feuilles correspondent au dernier groupe.

Les résultats de la figure 16b montrent que les teneurs en saccharose les plus faibles sont retrouvées dans les feuilles (S2), comparativement aux tiges et aux racines (plus de 12 mg/g M.S). Dans les tiges, les teneurs en saccharose diminuent légèrement à partir de 2°C avec une légère augmentation à 5°C (27%). Les teneurs en saccharose dans les racines sont supérieures à celles du témoin jusqu'à un niveau thermique de 2°C, puis diminue à partir de 0°C. Ces résultats sont confirmés par l'analyse statistique à un critère de classification (Annexe II, Tableau 8).

La variation entre les températures pour le caractère saccharose reste très significative et elle se structure en quatre groupes dont le traitement 5°C correspond au premier groupe avec la moyenne la plus élevée et le dernier comprend les températures 0°C et -2°C qui sont caractérisées par les moyennes les plus faibles. Elle est également très significative entre les organes dont les racines occupent le premier groupe avec la plus grande moyenne, le second correspond aux tiges et les deux derniers groupes correspondent respectivement aux feuilles de la 2^{ème} et la 1^{ère} vague de croissance (Annexe II, Tableau 9).

Les mesures obtenues dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance de semis de chêne liège transférés durant une période de 9 heures (S3) indiquent que les teneurs en saccharose du témoin sont supérieures à celles des traitements (Figure 16c). Dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, une augmentation à 2°C et 5°C est observée par rapport au témoin, elle est similaire à ce dernier à 0°C alors qu'elle diminue à -2°C (36%). Dans les tiges, une augmentation à 5°C (94%) est obtenue, par contre une diminution est obtenue à -2°C et 0°C. La teneur en saccharose à 2°C est similaire à celle du témoin. Dans les racines, les résultats obtenus à 2°C sont identiques à ceux du témoin ; une augmentation est observée pour les traitements 0°C et -2°C et atteint son maximum à 5°C (100%).

L'analyse de variance montre une variation significative entre les températures pour le caractère saccharose dont le premier groupe correspond à 5°C qui est caractérisée par la moyenne la plus forte. Il n'y a pas de différence entre le témoin et 2°C qui occupent le second groupe. Les derniers groupes se constituent respectivement des températures -2°C et 0°C. Des différences significatives de la teneur en saccharose ont été obtenues entre les quatre organes étudiés (Annexe II, Tableau 9). Les racines semblent donner les meilleurs résultats par rapport aux tiges et aux feuilles avec une moyenne très élevée (21.44 mg/g M.S).

L'analyse de la variance à trois critères de classification montre une différence très significative (Annexe II, Tableau 10). La comparaison des moyennes sépare les températures en trois groupes, le premier constitue le traitement 5°C qui accumule plus de saccharose par rapport aux autres températures. Ainsi, les racines occupent le premier groupe avec la plus forte moyenne, viennent ensuite les tiges et les feuilles. Concernant les stress, le troisième stress se classe au 1^{er} groupe ; ce qui signifie que la durée de stress influe sur l'accumulation de saccharose alors que le premier stress correspond au dernier groupe.

[S3] > [S2] > [S1]; [5°C] > [Témoin] > [2°C] > [-2°C] > [0°C]; [R] > [T] > [V2] > [V1]

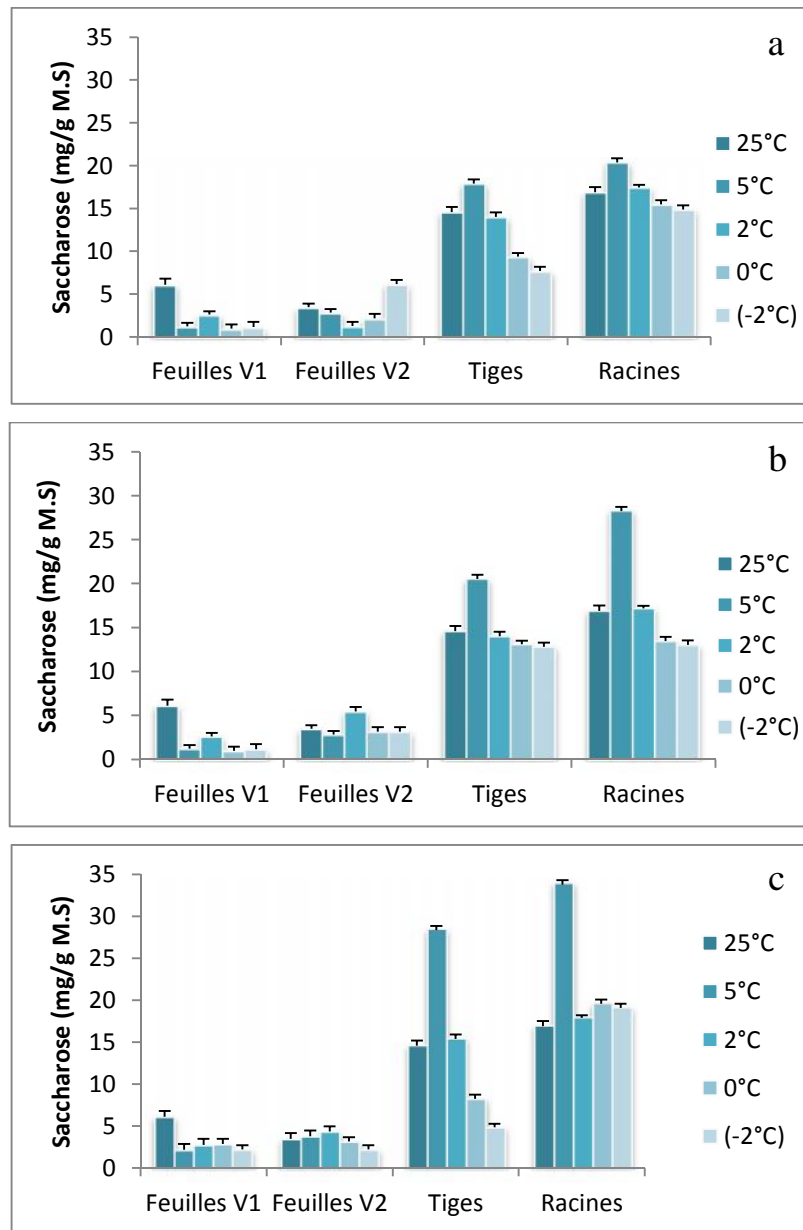


Figure 16 : Teneur en saccharose chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures : a : S1 ; b : S2 ; c : S3.

1.3.3.2. Le glucose

Les résultats de la teneur en glucose au niveau des différents organes de semis de chêne liège transférés 3 heures (S1) sont illustrés dans la figure 17a. Elle augmente dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance à 5°C et 2°C (26% et 33%) et statistiquement, il n'y a pas une différence entre ces deux températures puisqu'elles sont classées dans le même groupe A; alors qu'une diminution constante est observée pour les autres traitements qui occupent le même groupe C (Annexe II, Tableau 11).

Dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance soumises au froid, le contenu en glucose diminue significativement par rapport à celui du témoin et le plus faible taux est enregistré à -2°C (40%). Le contenu en glucose retrouvé dans les tiges est quasi similaire à celui obtenu dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance où les traitements 2°C et 5°C sont marqués par les moyennes les plus élevées qui sont respectivement 10.45 et 11.2 mg/g M.S ; alors que l'analyse statistique pour les autres températures ne donne pas des différences significatives par rapport au témoin (Annexe II, Tableau 11). Dans les racines, une diminution très importante de son contenu est observée à partir de 5°C et atteint son maximum à -2°C.

Globalement, l'effet de basses températures sur l'accumulation de glucose au niveau des semis est un caractère variable (Annexe II, Tableau 12). Le test Newman-Keuls, comparant simultanément les moyennes, répartit les quatre températures en deux groupes dont le premier est composé du témoin avec 2°C et 5°C et le second regroupe les températures restantes. Comme pour les températures, les organes présentent une variation très importante pour l'accumulation de glucose. Le test Newman-Keuls permet la constitution de quatre groupes dont le premier et le second sont respectivement constitués des feuilles de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance alors que le troisième comprend les tiges et le dernier correspond aux racines.

Les teneurs en glucose les plus élevées sont obtenues au niveau des feuilles de la 1^{ère} vague de croissance (Figure 17b) pour les semis transférés durant une période de 6 heures (S2). Pour les feuilles soumises aux basses températures, les résultats obtenus à 5°C sont similaires à ceux du témoin alors qu'une diminution de 36% est notée à 0°C. Ces diminutions sont plus importantes dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance où le taux de glucose a chuté de 58% à 0°C. Dans les tiges, une augmentation à 2°C de 52% et des diminutions pour les autres traitements ont toutefois été observées.

Au niveau racinaire, la diminution de glucose aux différentes températures est de 41% à 5°C et elle est plus importante à -2°C (800%).

Les résultats de l'analyse de variance de l'accumulation de glucose au niveau de semis montrent une variation hautement significative. Le test de comparaison des moyennes (Newman-Keuls) range les quatre températures en trois groupes homogènes dont le premier comprend le témoin avec la moyenne la plus élevée par rapport aux deux groupes qui englobent les traitements et marquent les moyennes les plus faibles. La variation entre organes pour ce caractère reste significative et similaire à celle du stress précédent (S1) (Annexe II, Tableau 12).

Les résultats de l'analyse de la variance montrent des différences significatives pour la teneur en glucose dans les différents organes de semis soumis à des basses températures comprises entre 5°C et -2°C pour une période de 9 heures (S3) (Figure 17c). Ainsi, ces températures ont induit une diminution de la teneur en glucose dans les feuilles de deux vagues de croissance et les racines et une augmentation au niveau des tiges est à noter où elle est très importante à 2°C (97%) (Annexe II, Tableau 12).

Pour les semis de chêne liège ayant subi trois stress successifs (S3), la comparaison des moyennes de la teneur en glucose donne des différences très significatives (Annexe II, Tableau 12) dont le groupe A comprend le témoin avec la moyenne la plus élevée et les groupes restants comprennent les traitements avec les moyennes faibles. La même comparaison effectuée sur la teneur en glucose dans les différents organes révèle l'existence des différences significatives où le groupe A comprend les feuilles de deux vagues de croissance et les racines correspondent toujours au dernier groupe.

La comparaison des moyennes de semis de chêne liège transférés durant une période de 3h, 6h et 9h révèle l'existence des différences significatives d'une part entre les températures, les organes et d'autre part entre les stress (Annexe II, Tableau 13). Les basses températures induisent une diminution de l'accumulation de glucose par rapport au témoin. Ainsi les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance accumulent plus de glucose par rapport aux feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, aux tiges et aux racines. L'accumulation de glucose au niveau du 1^{er} stress est plus élevée par rapport aux 3^{ème} et 2^{ème} stress.

En fonction de stress, des températures et des organes, la répartition du glucose se fait en moyenne dans l'ordre suivant :

[S1] > [S3] > [S2]; [Témoin] > [2°C] > [5°C] > [-2°C] > [0°C]; [V1] > [V2] > [T] > [R]

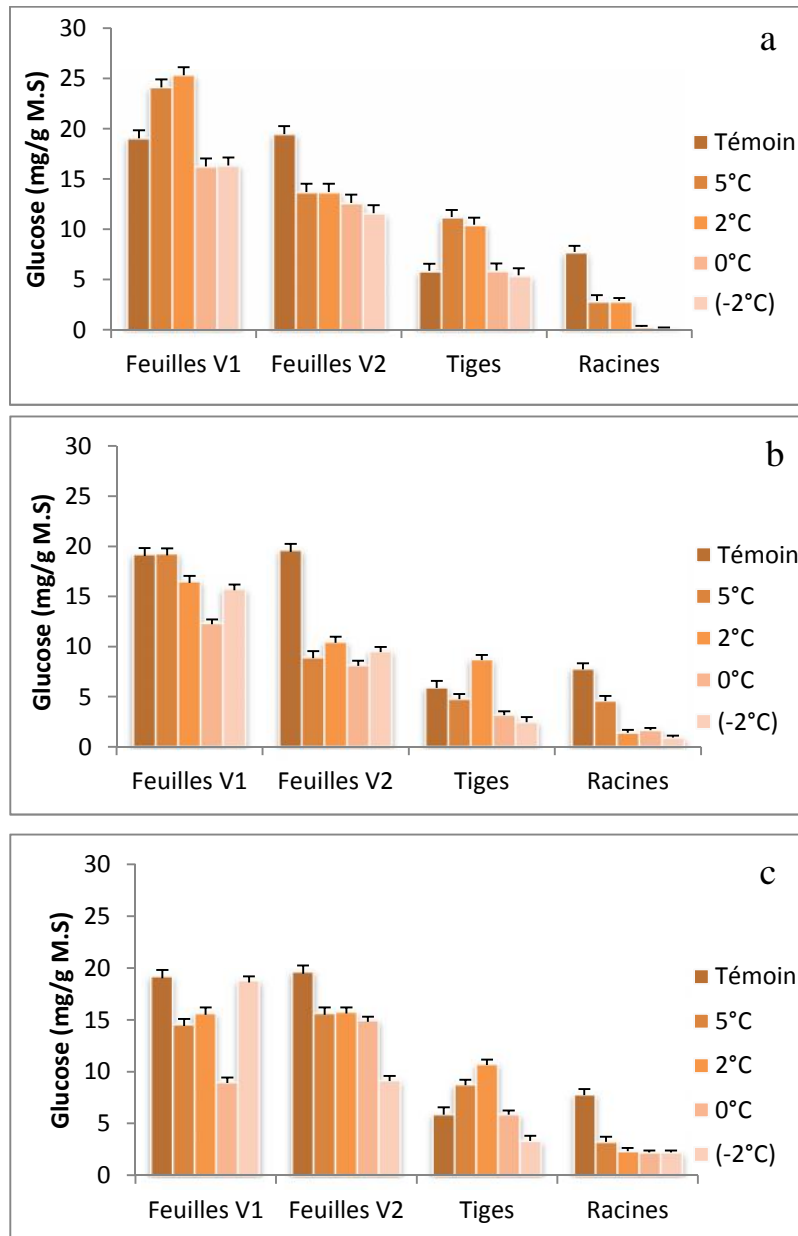


Figure 17 : Teneur en glucose chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures : a : S1 ; b : S2 ; c: S3.

1.3.3.3. Le fructose

A l'instar du glucose, les quantités de fructose sont plus importantes dans les feuilles que les autres organes pour les différents stress (Figure 18a). A l'exception des températures 2°C et 5°C où les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance (S1) qui ont accumulés plus de fructose par rapport au témoin avec des taux respectivement (34% et 22%) ; les feuilles stressées durant une période de 3 heures (S1) présentent moins de fructose avec un niveau très faible à -2°C et qui sont statistiquement indifférentes. Les tiges placées à 5°C et 2°C contiennent plus de fructose (77% et 54%) alors que celles de -2°C présentant une réduction de leur teneur. Les teneurs en fructose dans les racines sont augmentées pour les basses températures positives avec un maximum à 2°C (203%) (Annexe II, Tableau 14).

L'analyse de la variance à deux critères de classification montre qu'il existe une différence très significative d'une part entre les traitements et d'autre part entre les organes pour le fructose (Annexe II, Tableau 15). Ce caractère présente une variation très forte. La comparaison des moyennes sépare les traitements en quatre groupes, le premier, constitue les traitements 5°C et 2°C, le second comprend le témoin et les groupes restants englobent les autres températures. La variation entre les organes est également très forte pour ce caractère. Les feuilles de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance présentent les deux groupes A et B alors que les tiges et les racines présentent successivement les groupes C et D.

Les quantités de fructose diminuent quand les feuilles sont soumises aux basses températures durant 6 heures (S2), avec un niveau très faible à -2°C (Figure 18b). Par contre les tiges placées à 2°C contiennent plus de fructose (58%) alors que celles à 5°C, 0°C et -2°C présentent une réduction de leur teneur, comparativement au témoin. Dans les racines, une augmentation des teneurs en fructose est observée pour tous les traitements avec un maximum de 164% à 2°C par rapport au témoin.

L'analyse de la variance à deux critères de classification montre une différence très significative entre les traitements et entre les organes pour le caractère fructose (Annexe II, Tableau 15). Ce caractère présente une variation très forte. La comparaison des moyennes sépare les traitements en quatre groupes, le premier, constitue le témoin avec la moyenne la plus élevée, les groupes restants englobent les autres températures. La variation entre les organes est également très forte pour ce caractère.

Les feuilles de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance présentent les deux premiers groupes A et B alors que les tiges et les racines correspondent au groupe C.

Les teneurs en fructose diminuent quand les feuilles sont également soumises aux basses températures durant 9 heures (S3). Par contre les tiges placées à 0°C contiennent plus de fructose (94%) alors que celles à 2°C ne présentent aucune différence avec le témoin. Dans les racines, le fructose n'est observé que dans le témoin (Figure 18c). L'analyse de la variance à deux critères classe le témoin en premier groupe (A). Les feuilles présentent les moyennes les plus élevées par rapport aux tiges et aux racines (groupe A) (Annexe II, Tableau 15).

La comparaison des moyennes de semis de chêne liège transférés durant une période de 3h, 6h et 9h révèle l'existence des différences significatives d'une part entre les températures, les organes et d'autre part entre les stress (Annexe II, Tableau 16) selon la répartition suivante :

[S1] > [S2] > [S3]; [Témoin] > [2°C] > [5°C] > [0°C] > [-2°C]; [V1] > [V2] > [T] > [R]

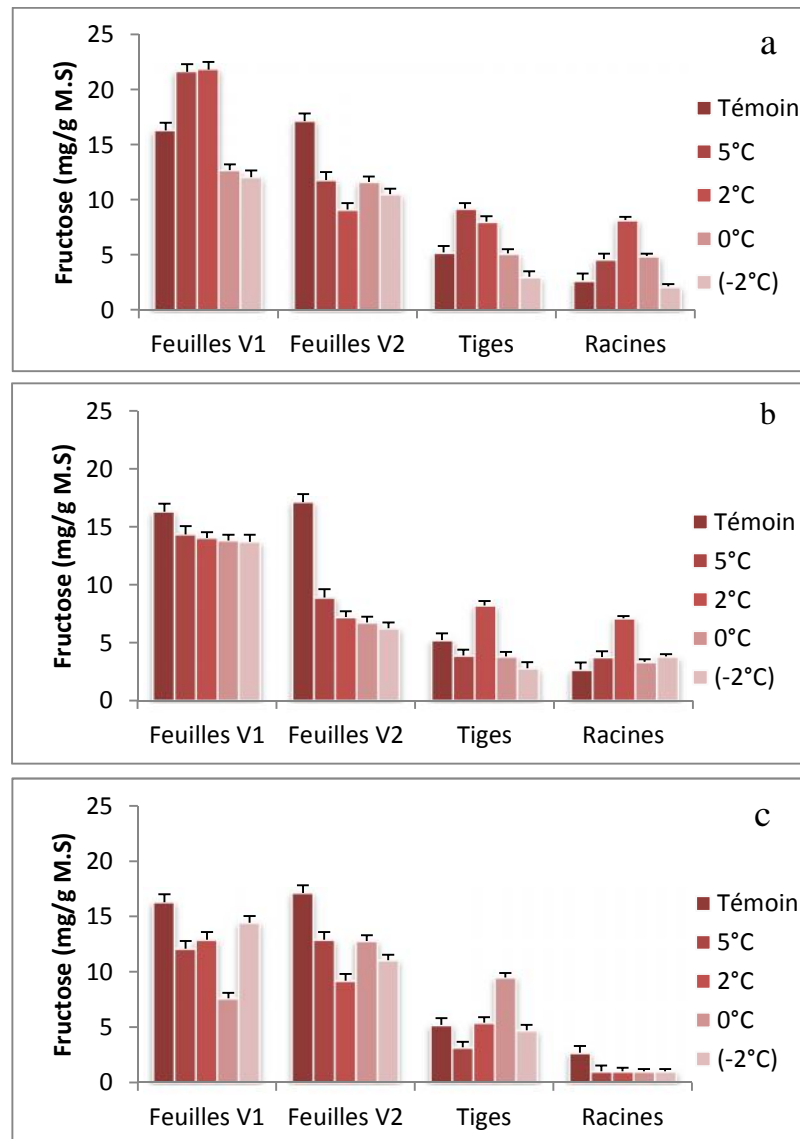


Figure 18 : Teneur en fructose chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures : a : S1 ; b : S2 ; c : S3.

1.3.4. Le quercitol

La teneur en quercitol diminue dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance soumises aux basses températures comprises entre 5°C et -2°C (S1). Cette diminution est similaire pour toutes les températures qui est de 25%. Par contre, elle augmente significativement dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance de 2 à 3 fois respectivement à 5°C et -2°C par rapport au témoin. En ce qui concerne les tiges, l'augmentation est moins importante par rapport aux feuilles de la 2^{ème} vague de croissance ; elle varie de 24% à 5°C et de 47% à -2°C.

Le contenu en quercitol dans les racines est similaire à celui du témoin à 2°C et 5°C alors qu'une augmentation d'environ 58% est observée à 0°C et -2°C (Figure 19a).

Une Anova (5%) est effectuée sur les valeurs de quercitol dans les semis transférés à des basses températures comprises entre 5°C et -2°C (S1). Elle révèle une différence très hautement significative entre les traitements d'une part, et entre les organes d'autre part (Annexe II, Tableau 18). Au niveau des semis, l'Anova confirme qu'il y a une augmentation de quercitol induite par le stress au froid. Cette augmentation est plus importante pour le traitement -2°C qui occupe le groupe A avec la moyenne la plus élevée alors que les traitements 5°C, 2°C et 0°C sont affectés successivement aux groupes B et C avec des moyennes plus importantes par rapport au témoin ; ce dernier correspond au groupe D. Au niveau des organes, les différences sont très hautement significatives. Les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance (A) produisent une quantité 5 fois plus de quercitol que celle des racines qui occupent le dernier groupe C avec les plus faibles moyennes. Les feuilles de la 1^{ère} vague et les tiges occupent le second groupe (B).

Les taux d'augmentation de quercitol dans les différents organes de semis soumis à des basses températures durant une période de 6 heures (S2) sont proportionnels à l'intensité de froid, plus particulièrement pour les feuilles (Figure 19b). Les taux d'augmentation de quercitol dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance sont respectivement 146%, 190%, 211% et 245% à 5°C, 2°C, 0°C et -2°C. Les variations de quercitol dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance sont plus importantes que celles observées chez les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance. Elles passent de 460% à 5°C à 642% à -2°C. Les teneurs de quercitol au niveau des tiges pour les différents traitements manifeste des variations d'accumulation distinctes avec des pourcentages d'augmentation de 340% à -0°C. Dans les racines, et par rapport au témoin, les teneurs en quercitol augmentent dès 5°C (307%), restent quasiment stables jusqu'à 0°C avant d'atteindre un maximum à -2°C (536%) (Annexe II, Tableau 17).

L'analyse statistique des résultats des teneurs en quercitol chez les semis de chêne liège transférés à un stress compris entre 5°C et -2°C (S2), montre une accumulation très nette par rapport au témoin. Les différences sont très hautement significatives entre les différentes températures (Annexe II, Tableau 18). Les fortes moyennes sont enregistrées au groupe A correspondant aux traitements -2°C et 0°C. Le dernier groupe D est affecté au témoin qui est marqué par la plus faible moyenne.

Au niveau des organes, l'analyse statistique montre également des différences très hautement significatives. Les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance (groupe A) accumulent plus de quercitol par rapport à la 1^{ère} vague de croissance (groupe B), aux tiges et aux racines qui occupent successivement les groupes C et D avec les plus faibles moyennes.

La teneur en quercitol dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance des semis de chêne liège soumises aux basses températures durant 9h (S3) a diminué de 32% aux traitements 5°C et 2°C et une augmentation à 0°C (37%). Les résultats illustrés dans la figure 19c, montrent que le stress au froid a induit une accumulation de quercitol dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance à 5°C, 2°C et 0°C et reste identique à -2°C. En comparant l'évolution de la quantité de quercitol chez les tiges stressées à différentes températures, on note que les résultats obtenus montrent une augmentation à 0°C (50%) avec une légère diminution à 5°C, 2° et -2°C (Annexe II, Tableau 17). Le dosage de quercitol, extrait à partir des racines des semis stressées, montre qu'il existe une forte concentration à 0°C (58%).

L'analyse statistique des résultats des teneurs en quercitol dans les semis transférés à un stress au froid compris entre 5°C et -2°C (S3), montre des différences significatives entre les différents traitements. Les fortes moyennes sont enregistrées dont les groupes A et B correspondant successivement aux traitements 0°C, 2°C, et 5°C. Ainsi, le groupe C correspond au témoin et -2°C avec les plus faibles moyennes (Annexe II, Tableau 18). Au niveau des organes, l'analyse statistique montre également des différences très significatives. Les feuilles de deux vagues de croissance accumulent plus de quercitol par rapport à celles des tiges et des racines.

La comparaison des moyennes de semis de chêne liège transférés durant une période de 3h, 6h et 9h révèle l'existence des différences significatives d'une part entre les températures, les organes et d'autre part entre les stress. Les basses températures induisent une augmentation de quercitol par rapport au témoin. Ainsi les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance accumulent plus de quercitol par rapport aux feuilles de la 1^{ère} vague de croissance, tiges et racines. L'accumulation de quercitol au niveau du 2^{ème} stress est plus élevée par rapport aux 1^{er} et 3^{ème} stress (Annexe II, Tableau 19).

En fonction de stress, des températures et des organes, la répartition du quercitol se fait en moyenne dans l'ordre suivant :

[S2] > [S1] > [S3]; [-2°C] > [0°C] > [5°C] > [2°C] > [Témoin]; [V2] > [V1] > [T] > [R]

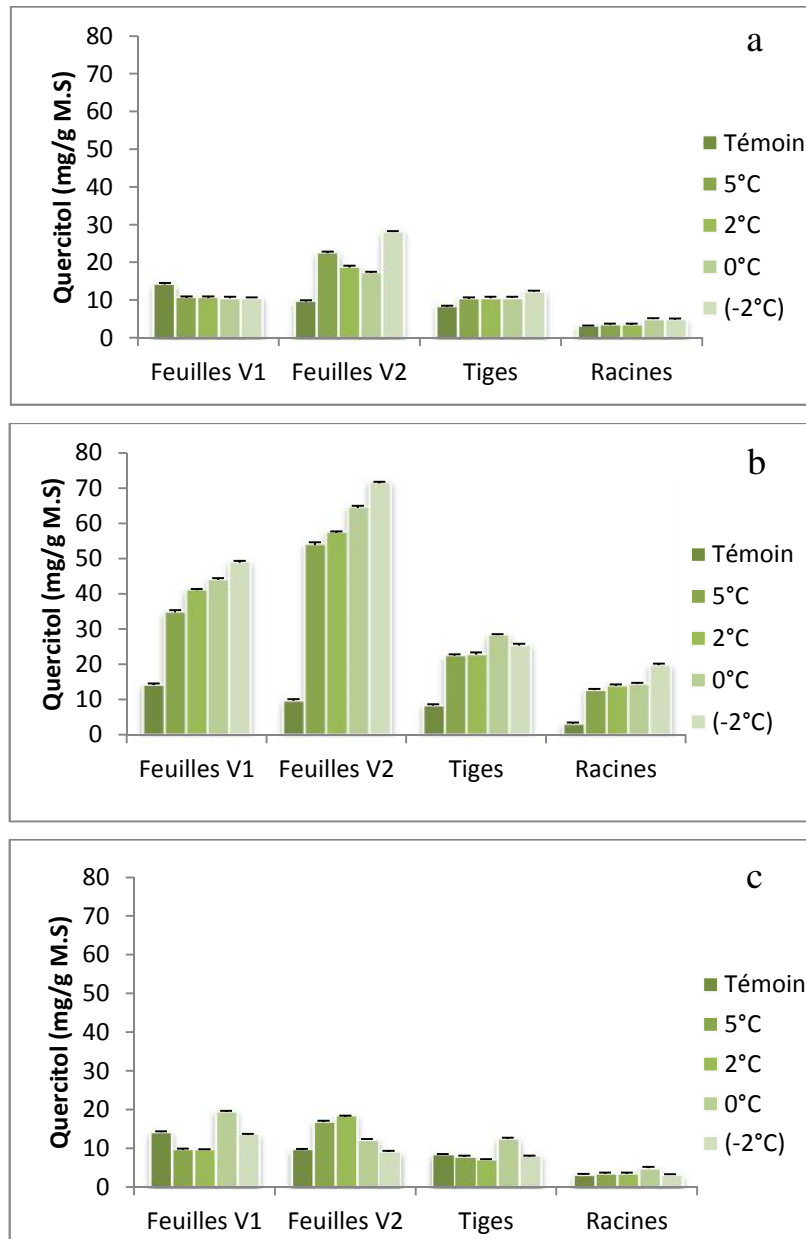


Figure 19 : Teneur en quercitol chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures : a : S1 ; b : S2 ; c : S3.

1.3.5. L'amidon

La quantité d'amidon diminue significativement dans les feuilles des deux vagues de croissance (Figure 20a). Dans les tiges, cette quantité diminue à partir de 5°C (32%) ; elle atteint son maximum à -2°C (68%). Les quantités en amidon dans les racines sont les plus importantes par rapport à celles des feuilles et des tiges (Annexe II, Tableau 20); ainsi une augmentation est obtenue dès 5°C et atteint son maximum à 0°C (51%) alors qu'une légère diminution est observée à -2°C (12%).

Les analyses statistiques de l'accumulation de l'amidon au niveau de semis de chêne liège transférés 3 heures (S1) confirment ces résultats (Annexe II, Tableau 21) et indiquent que le premier groupe correspond à 0°C avec la forte moyenne. Il n'y a pas de différence significative entre le témoin et les traitements 5°C et 2°C qui occupent le second groupe. Ces mêmes statistiques montrent aussi que les racines accumulent plus d'amidon (groupe A) par rapport aux tiges (B) et aux feuilles de deux vagues de croissance (C).

Il est intéressant de noter que les quantités d'amidon les plus élevées sont retrouvées dans les racines de semis transférés durant une période de 6h (S2), et ce quelque soit la température. Dans nos conditions expérimentales, nous observons une quantité très faible d'amidon dans les feuilles. Dans les tiges et les racines, nous notons une chute très significative de la teneur en amidon à 5 et à 2°C, qui est suivie par une augmentation selon l'intensité du froid (Figure 20b). Les basses températures ont réduit l'accumulation de l'amidon d'une manière significative (Annexe II, Tableau 21). Les analyses statistiques au niveau des différents organes donnent des résultats similaires à ceux du stress précédent.

Les concentrations de l'amidon des semis transférés entre 5°C et -2°C (S3) sont inférieures à celles du témoin dans les feuilles de deux vagues de croissance et des tiges tandis qu'une augmentation est uniquement observée dans les racines à -2°C (20%) (Figure 20c). Ainsi, les analyses statistiques de l'accumulation de l'amidon au niveau de semis confirment ces résultats et indiquent que le premier groupe correspond à -2°C et au témoin avec les plus grandes moyennes. Les analyses statistiques au niveau des différents organes donnent des résultats similaires à ceux des deux stress précédents (Annexe II, Tableau 21).

Les résultats de l'analyse de la variance rapportés sur le tableau 22 (Annexe II), montrent une variation hautement significative entre les différents traitements appliqués sur des semis de chêne liège durant une période de 3 heures (S1), 6 heures (S2) et 9 heures (S3), entre les organes et entre les différents stress. En fonction de ces trois variables, la répartition d'amidon suit la séquence suivante :

[S1] > [S2] > [S3]; [Témoin] > [0°C] > [-2°C] > [2°C] > [5°C]; [R] > [T] > [V1] > [V2]

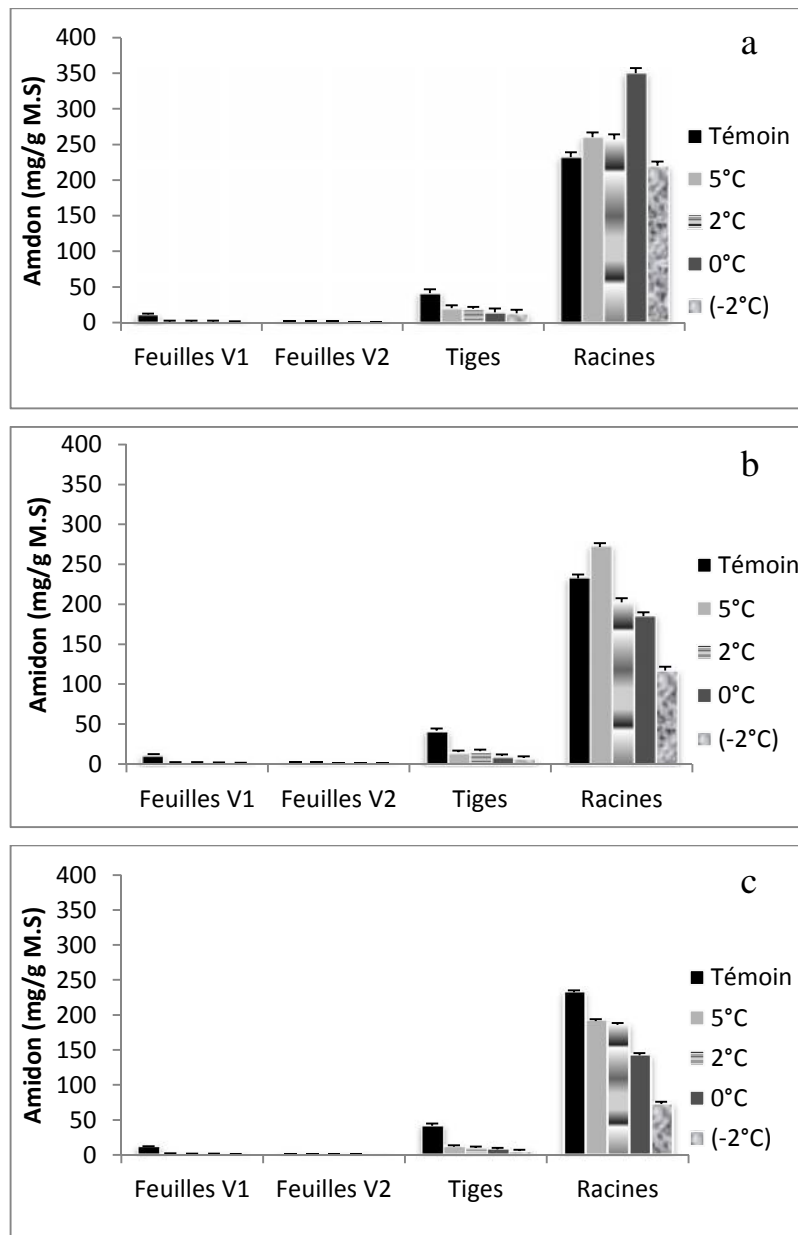


Figure 20 : Teneur en amidon chez les semis de chêne liège soumis aux basses températures : a : S1 ; b : S2 ; c : S3.

2. Les hautes températures

2.1. Croissance en hauteur, surface foliaire et nombre des feuilles

La surface foliaire est mesurée au niveau de la 3^{ème} vague de croissance pour chaque stress (Figure 21). Pour les deux stress : S1 (3 heures) et S2 (6 heures), l'analyse statistique ne fait apparaître aucune influence des hautes températures sur ce paramètre par rapport au témoin. Par contre pour le stress 3 (9 heures), on note une légère diminution de la surface foliaire lorsque la température du milieu augmente jusqu'à 44°C, soit une surface foliaire de 976.40 mm². Les analyses statistiques confirment les résultats précédents (Annexe III, Tableau 1).

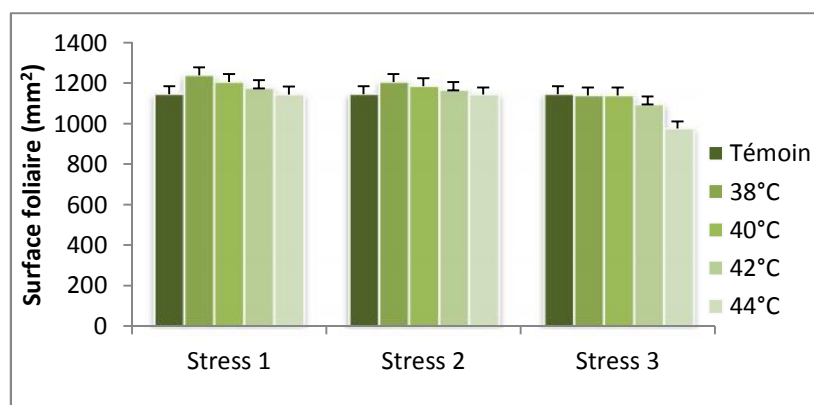


Figure 21 : Surface foliaire de la 3^{ème} vague de croissance de semis de chêne liège stressés.

La figure 22 illustre la croissance de nombre de feuilles de trois stress. L'analyse de la variance à un critère signale une différence significative en fonction des traitements. Ces résultats sont vérifiés par le biais du test de Newman et Keuls à 5%, faisant ressortir 4 groupes pour S1 et S2 et 2 groupes pour S3 où le traitement 38°C marque toujours le nombre le plus élevé de feuilles. Pour S1 et S2, la croissance du nombre de feuilles stressées est supérieure aux feuilles témoins quelque soit l'intensité du stress. Par contre pour S3 et à l'exception de 38°C, les résultats obtenus sont similaires à ceux du témoin. Ces résultats sont confirmés statistiquement (Annexe III, Tableau 1).

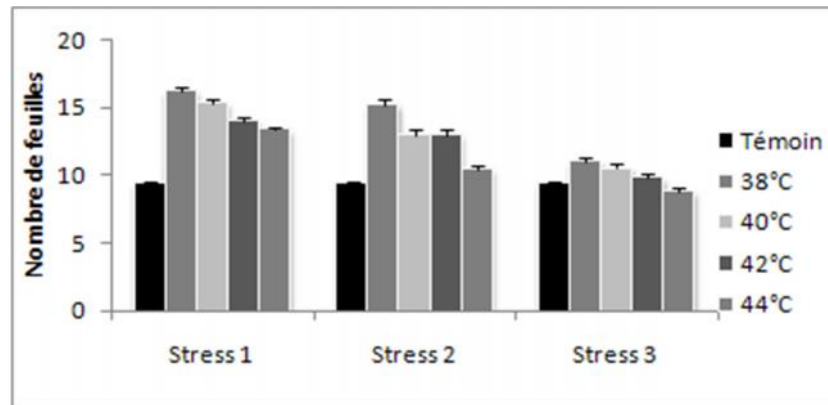


Figure 22 : Nombre de feuilles de la 3^{ème} vague de croissance de semis de chêne liège stressés

D'après la figure 23, la longueur des tiges des semis du chêne liège transférés à un stress thermique de 3 heures est plus importante que celle du témoin quelque soit la température considérée.

L'analyse de la variance à un critère de classification appliquée aux moyennes des températures montre une différence très significative ($p < 0.002$). En effet, le test de Newman et Keuls à 5%, fait ressortir trois groupes différents, où on note que le taux de croissance le plus élevé est enregistré à 38°C et 40°C (groupe A), les températures 42°C et 44°C ayant un taux de croissance modérée, appartenant au groupe AB, enfin le troisième groupe B qui est destiné au témoin, présente le taux de croissance le plus faible (Annexe III, Tableau 1).

La figure 23 illustre la variation de la longueur des tiges des semis du chêne liège soumis à un stress thermique de 6 heures. Elle montre une évolution assez différente en fonction des températures où 38°C marque la longueur de la tige la plus importante (groupe A) par rapport au témoin et 40°C qui occupent statistiquement le second groupe AB. Par opposition, les températures 42°C et 44°C possèdent les taux de croissance les plus faibles par rapport au témoin, d'où une affectation au groupe B.

Contrairement aux résultats précédents, les résultats illustrés par la figure 23, montre l'évolution de la longueur de la tige des semis du chêne liège qui ayant subi trois stress successifs (9 heures). La longueur la plus importante est obtenue pour le témoin et la température 38°C ; alors que l'augmentation de la température influe négativement sur la croissance de la tige et le taux le plus faible est au niveau de la température 44°C.

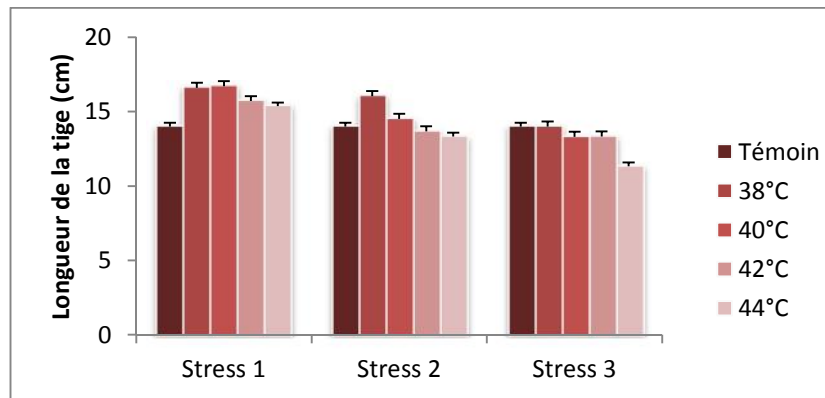


Figure 23 : hauteur des tiges de semis du chêne liège stressés.

2.2. Les composantes temporelles

A l'exception de la température 44°C où tous les individus soumis à un stress thermique de 3 heures (S1) présentent des phases d'allongement de 4 semaines à la 2^{ème} vague de croissance, les autres températures (38°C, 40°C et 42°C) sont semblables au témoin (Tableau 4). Si les durées d'allongement sont semblables, les durées de repos sont variables entre les températures et les vagues de croissance.

Chez les semis de la 2^{ème} vague de croissance, la phase de repos est élevée par rapport au témoin ; elle varie entre 66.5 jours \pm 3.2 à 38°C à 31 jours à 44°C.

A la 3^{ème} vague de croissance, les durées de repos sont identiques à celles du témoin sauf pour la température 44°C où la durée chute significativement à 10.5 jours \pm 1.5.

Concernant les semis ayant subi un stress thermique de 6 heures (S2), la croissance par vagues est bien maintenue quelque soit l'intensité thermique. Aux phases d'allongement de durées variables de 18.5 jours à 38°C à 33 jours à 44°C, font suite des périodes de repos assez longues à 38°C et 40°C, soient 39 jours \pm 1.5 et 57 jours \pm 1.2 ; alors qu'elles sont légèrement supérieures au témoin à 42°C et 44°C pour la seconde vague de croissance.

Pour la 3^{ème} vague de croissance, ces phases d'élongation sont augmentées d'une semaine à 38°C et 40°C, identiques au témoin à 42°C alors qu'elles sont légèrement réduites à 44°C (10 jours \pm 2). Les périodes de repos à la 2^{ème} vague de croissance suivent la même évolution que celles des phases d'allongement pour les semis transférés à 38°C, 40°C et 42°C alors qu'elles sont légèrement augmentées à 44°C.

La durée de la phase d'élongation de la tige est légèrement réduite pour la 2^{ème} vague de croissance à 38°C (9 jours ± 0.62) et tend à augmenter progressivement jusqu'à 44°C (44 jours ± 2.5) chez les semis de chêne liège ayant subi un stress thermique de 9 heures (S3). A la 3^{ème} vague de croissance, cette durée est augmentée avec une moyenne de 8 jours à 38°C et reste identique pour les températures 40°C, 42°C et 44°C. Si les phases d'élongation augmentent proportionnellement avec l'intensité du stress, les durées de repos augmentent inversement avec ce stress où on note 61 jours ± 2.25 à 38°C à la 2^{ème} vague de croissance. A la 3^{ème} vague de croissance, les durées de repos sont augmentées d'un mois à 38°C et restent identiques au témoin pour les autres températures.

Tableau 4 : Durées moyennes des phases d'allongement de la tige et (A.C) de repos apparent (R.A) (en jours) des semis de chêne liège cultivés à 25°C en jours longs de 16h et transférés pendant 3h (S1), 6h (S2) et 9h (S3) aux hautes températures.

Stress		Stress 1		Stress 2		Stress 3	
T (°C)	V	A.C	R.A	A.C	R.A	A.C	R.A
Témoin	V2	14.30±1.4	21.3±1.6	-	-	-	-
	V3	15.50±0.7	22.0±3.6	-	-	-	-
38°C	V2	14.70±1.40	66±1.41	18.5±1.15	57±1.2	9±2.62	61±2.35
	V3	15.10±1.6	21±2.8	24.5±2.5	23±1.6	23±2.5	31±1.73
40°C	V2	13.60±2.60	65±1.82	22±2.25	39±1.5	16±1.62	54±1.73
	V3	15.70±1.5	20±3.25	20±1.55	22±1.2	14.5±2.28	21±2.3
42°C	V2	14±2.5	31±1.32	25±1.8	24±0.5	20.5±1.41	49.5±2.25
	V3	14.5±3	21±2.25	14±3.8	21±3.3	15±1.5	22±1.15
44°C	V2	26±1.2	27±1.18	33±1.41	24.2±0.8	44±2.5	30±2.15
	V3	17.1±2	10.5±1.5	10.2±2.1	36±1.3	16±0.2	20±4.5

2.3. Caractères biochimiques

2.3.1. Proline

Les résultats de la figure 24a montrent que les teneurs les plus importantes en proline sont retrouvées dans les racines, comparativement aux feuilles de deux vagues de croissance et aux tiges. Les taux d'augmentation de proline dans les racines des semis soumis aux hautes températures comprises entre 38°C et 44°C durant une période de 3 heures (S1) sont très significatifs ($P < 0.0001$). Ces taux sont similaires à ceux du témoin à 38°C puis augmentent à partir de 40°C (29%) et atteignent leur maximum de 285% à 44°C. Au niveau des feuilles de deux vagues de croissance et des tiges, une accumulation de proline est également observée à partir de 38°C, elle atteint son maximum à 44°C avec respectivement 354% dans les feuilles de la vague 1 ; 378% dans les feuilles de la vague 2 et 235 % dans les tiges.

Chez les semis transférés aux températures précédentes durant une période de 6 heures (S2), les mesures obtenues indiquent que les variations des teneurs en proline dépendent d'une part de la température et d'autre part de l'organe considéré (Figure 24b). A l'exception des tiges où la quantité de proline reste quasiment constante à 38°C et 40°C, les quantités les plus importantes sont observées à 44°C et la teneur la plus élevée est obtenue chez les racines (6.85 $\mu\text{mol/mg M.S}$) (Annexe III, Tableau 2).

L'exposition des semis de chêne liège aux hautes températures comprises entre 38°C et 44°C durant 9 heures (S3) a induit en général une augmentation importante de la teneur en proline dans les différents organes (Figure 24c). L'accumulation de la proline augmente proportionnellement avec la température et atteint son maximum à 44°C dans les différents organes. L'analyse de la variance à 2 critères de classification signale une différence très significative en fonction de hautes températures ($p < 0.0001$). Le test de Newman Keuls au seuil de 5% révèle l'existence de 4 groupes homogènes, le groupe A comprend la température 44°C avec la moyenne la plus élevée (4.05 $\mu\text{mol/mg M.S}$) alors que le groupe D correspond au témoin avec la plus faible moyenne (0.68 $\mu\text{mol/mg M.S}$). L'effet des hautes températures sur l'accumulation de la proline dans les différents organes des semis de chêne liège montre que celle-ci est toujours plus importante au niveau des racines (Annexe III, Tableau 3).

Les valeurs en proline en fonction de température et de stress présentent les séquences suivantes (Annexe III, Tableau 4) :

[S3] > [S2] > [S1]; [44°C] > [42°C] > [40°C] > [38°C] > [Témoin]; [R] > [V2] > [T] > [V1]

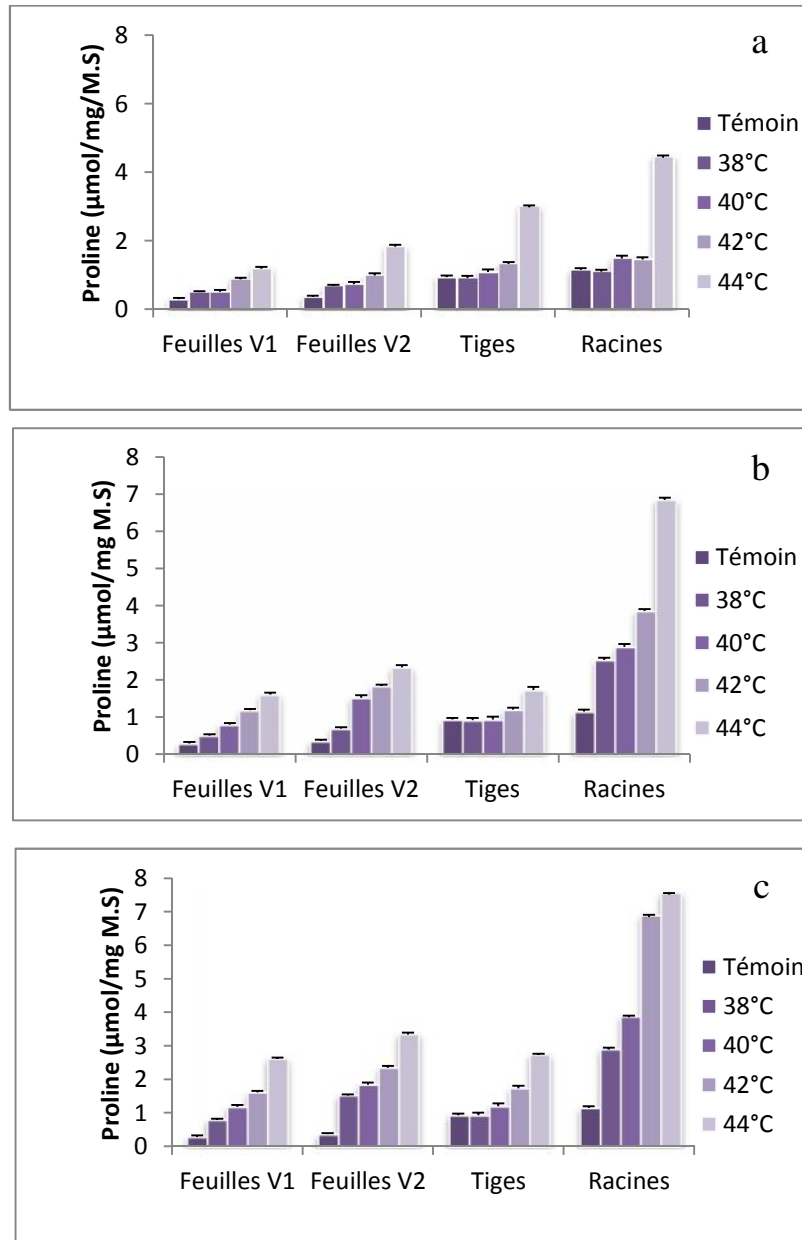


Figure 24: Teneur en proline chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures: a: S1 ; b: S2 ; c: S3.

3.2. Protéines

Lors de notre expérimentation, la comparaison de la concentration des protéines des semis de chêne liège stressés à des températures comprises entre 38°C et 44°C durant une période de 3 heures, montre une variation très hautement significative ($p < 0.000$). Au niveau des feuilles de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance, les traitements appliqués, présentent des fluctuations entre les deux conditions (témoin et stressées). Nous avons observé une augmentation de la quantité des protéines à partir de 38°C dans les différents organes et atteint son maximum à 44°C. Les valeurs moyennes des protéines dans les différents organes des semis du chêne liège sont illustrées par la figure 25a. Les feuilles de deux vagues de croissance signalent les moyennes les plus élevées en occupant le groupe A selon le test Newman-Keuls à 5% ; alors que les valeurs les plus faibles sont obtenues au niveau des tiges et des racines qui correspondent au groupe B (Annexe III, Tableau 5).

Pour les semis soumis à une durée de stress de 6 heures (S2), l'accumulation des protéines dans les différents organes montre une diminution importante selon l'intensité du stress appliqué par rapport au témoin (Figure 25b). La quantité protéique a augmenté de manière très significative entre les quatre températures dans chaque organe (Annexe III, Tableau 5). Ces variations confirmées par l'analyse de la variance à deux critères de classification qui montre des différences très significatives en fonction des températures ($p < 0.0001$) et en fonction des organes. On enregistre les valeurs les plus élevées au niveau de deux vagues de croissance par rapport aux tiges et aux racines et au traitement 38°C par rapport aux autres températures stressantes et au témoin (Annexe III, Tableau 6).

Les différents stress appliqués ont des effets sur l'accumulation des protéines chez les semis du chêne liège. Les taux de protéines obtenus à une exposition de température comprise entre 38°C et 44°C sont résumés sur la figure 25c. L'analyse de la variance à un critère de classification montre qu'il existe de différence entre les températures stressantes 38°C, 40°C, 42°C, 44°C et le témoin. Ces températures induisent l'augmentation de la teneur en protéines au niveau de différents organes (Annexe III, Tableau 5).

La comparaison des moyennes des taux des protéines relatives aux traitements au seuil de 5% montre l'existence de 4 groupes. Le groupe A correspond à la température 38°C au quelle est attribue la plus grande teneur et le dernier groupe correspond au témoin avec la moyenne la plus

faible. Ainsi, les feuilles comprennent les teneurs les plus fortes en protéines par rapport aux tiges et aux racines (Annexe III, Tableau 1).

L'analyse de la variance à 3 critères montre que l'accumulation de protéines durant 3h (S1) est supérieure aux stress 3 et stress 2.

[S1] > [S3] > [S2]; [38°C] > [40°C] > [42°C] > [44°C] > [Témoin]; [V2] > [V1] > [T] > [R]

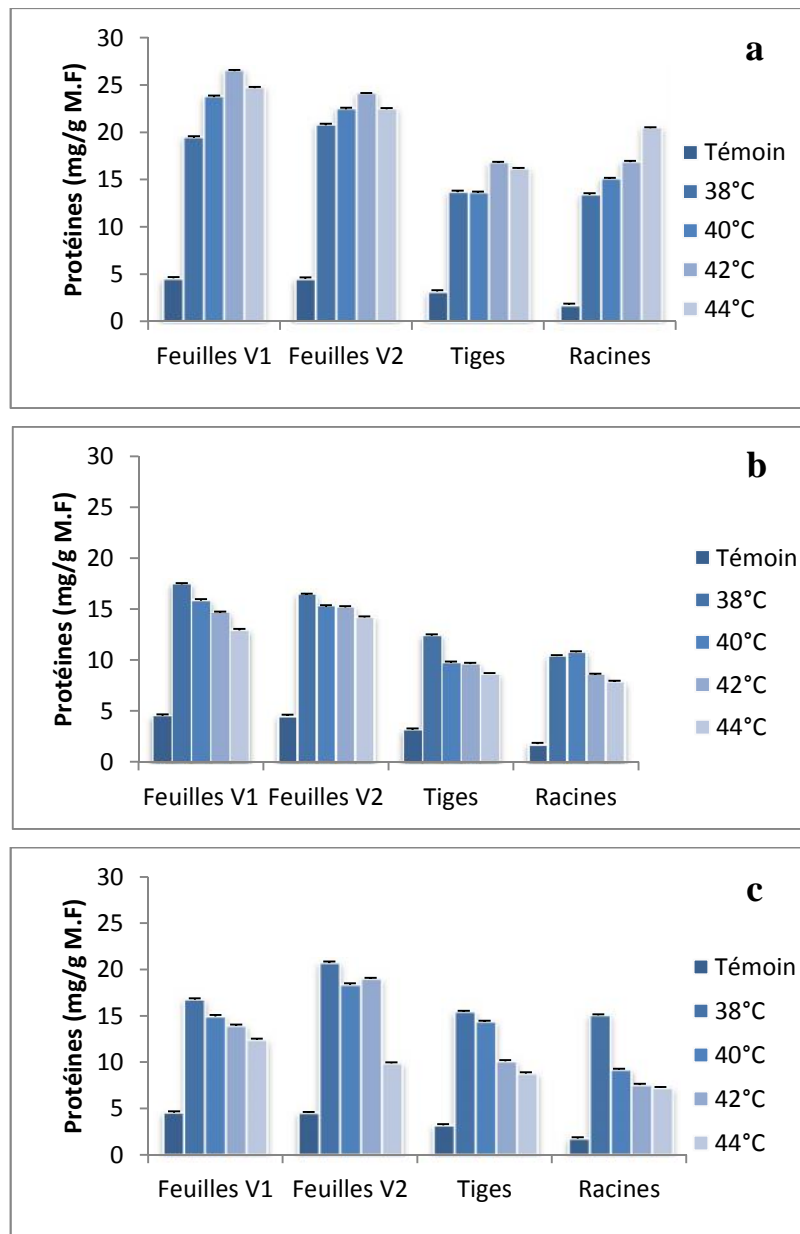


Figure 25: Teneur en protéines chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.

2.3.3. Les sucres solubles

2.3.3.1. Le saccharose

Les résultats de la figure 26 montrent que les plus faibles teneurs en saccharose sont retrouvées dans les feuilles quelque soit la durée et l'intensité du stress comparativement aux tiges et aux racines. Dans les feuilles, une légère accumulation du saccharose est observée chez les semis placés à 38°C pour les deux premiers stress (S1 et S2) et devient plus importante dans les tiges et les racines, puis diminue d'une manière considérable en fonction de la température et la durée du stress (S3). Ces résultats sont confirmés statistiquement par l'analyse de la variance à deux critères fixes par ($p < 0.000$ et $p < 0.0001$), où la teneur du saccharose est toujours importante à 38°C par rapport au témoin et aux autres températures stressantes (Annexe III, Tableaux 8 et 9).

Les résultats des teneurs en saccharose selon les différents organes des semis, de température et l'intensité de stress ($p < 0.0001$) montrent une nette augmentation des racines par rapport aux tiges et aux feuilles. Ces variations sont confirmées par l'analyse de la variance à deux critères et à 3 critères de classification ($p < 0.0001$). La comparaison des moyennes relatives aux quatre traitements au seuil de 5% montre que la température 38°C et le témoin occupent le premier groupe avec la valeur la plus importante ; les autres températures occupent les groupes B, C et D avec les moyennes les plus faibles (Annexe III, Tableaux 9 et 10).

De ces résultats, il convient de retenir les points essentiels :

- La teneur en saccharose varie selon l'organe et le niveau du stress thermique.
- L'accumulation du saccharose varie dans le sens racines, tiges, feuilles (1^{ère} vague de croissance et 2^{ème} vague de croissance) pour toutes les températures : [R] > [T] > [V1] > [V2]

En fonction des températures et des stress, les teneurs en saccharose varient dans le sens :

[38°C] > Témoin] > [40°C] > [42°C] > [44°C; [S1] > [S2] > [S3]

Les valeurs les plus élevées sont enregistrées au niveau des racines par rapport aux autres organes et pour 38°C (S1) par rapport aux autres températures.

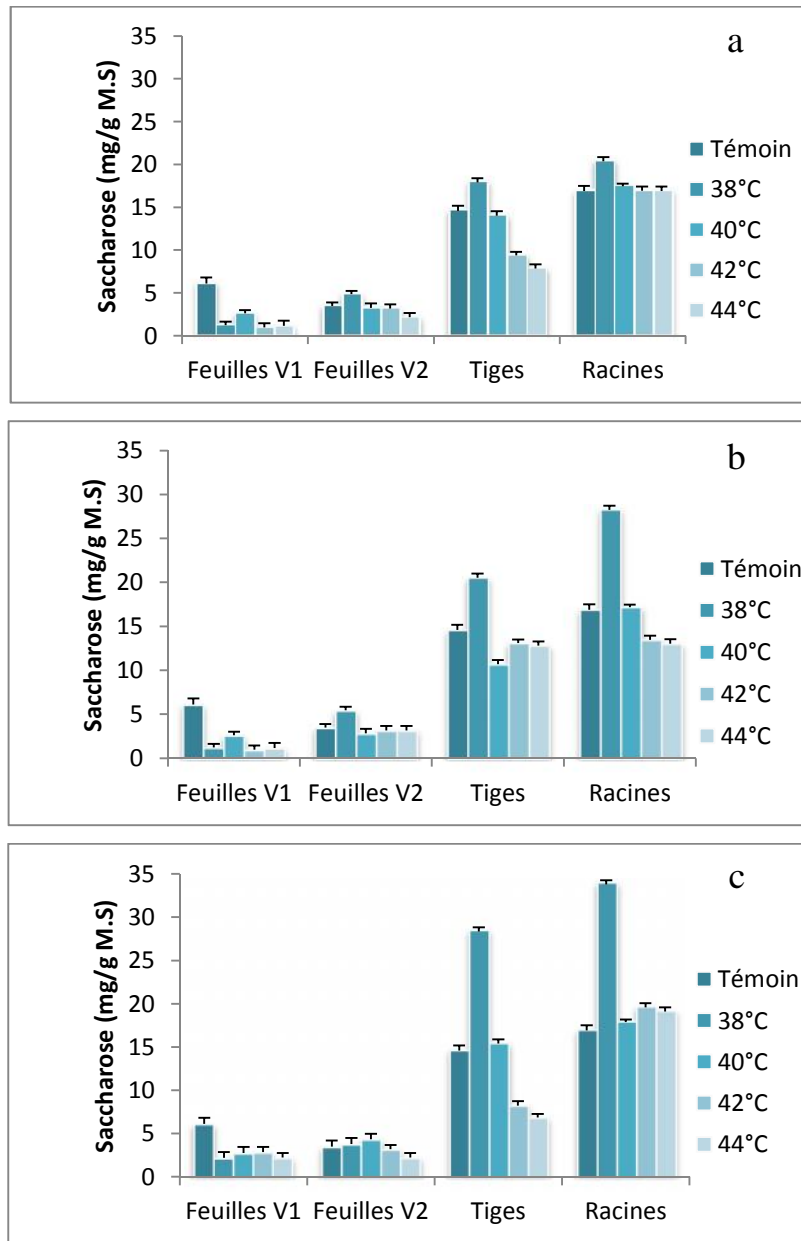


Figure 26 : Teneur en saccharose chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.

2.3.3.2. Le glucose et le fructose

Les résultats de la teneur en glucose et fructose au niveau des différents organes des semis de chêne liège transférés 3 heures (S1) et 6 heures (S2) sont illustrés dans les figures 27 et 28. Cette teneur augmente légèrement dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance stressées à 38°C (S1) sans être significative ; alors qu'elle diminue pour les autres traitements et le taux le plus bas est obtenu à 44°C, soit 42% pour le fructose et 46% pour le glucose dans les feuilles transférées deux stress successifs (6h). Dans les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, leur contenu diminue significativement par rapport à celui du témoin et le taux le plus faible est enregistré à 44°C (73% pour le fructose 74% pour le glucose). Dans les tiges, une augmentation de glucose et fructose à 38°C et 40°C est obtenue et des diminutions pour les traitements restants ont toutefois été observées. Au niveau des racines, une diminution de glucose très importante est observée à partir de 38°C et atteint son maximum de 70% à 44°C quelque soit la durée de stress. Contrairement au glucose et à l'exception de la température 44°C où les racines présentent des teneurs en fructose similaires au témoin; les racines stressées durant une période de 3h et 6h accumulent plus de fructose avec un niveau très élevé à 38°C (103% pour les racines stressées 3h et 52% pour une durée de 6h) (Annexe III, Tableaux 11 et 14).

Au cours du stress aux hautes températures, l'accumulation de glucose et de fructose est différente au niveau des organes et en fonction de température. De ce fait, les teneurs les plus élevées en glucose sont enregistrées au niveau du témoin; alors que les plus faibles sont enregistrées à 44°C pour tous les stress. Ainsi pour les organes, les résultats obtenus indiquent que les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance accumulent les quantités les plus élevées en glucose et les racines accumulent les plus faibles. Ces résultats sont statistiquement confirmés à l'aide de l'analyse de la variance à 2 critères de classification ($p < 0.0001$) (Annexe III, Tableau 12). Concernant le fructose, les analyses statistiques montrent que les résultats sont similaires à ceux du glucose sauf pour la température 38°C (S1) où les teneurs obtenues sont identiques à celles du témoin (Figures 28a et 29a).

Pour les semis soumis à un stress compris entre 38°C et 44°C pendant 9h (S3), les résultats obtenus montrent qu'il y a une diminution du glucose et du fructose dans les différents organes quelque soit l'intensité du stress ; les taux les plus faibles sont enregistrés à 44°C (Figures 27c et 28c).

L'analyse de la variance à 2 critères de classification montre que le témoin correspond au 1^{er} groupe A, viennent ensuite les autres températures en occupant les groupes B et C et les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance se classent également en 1^{er} groupe par rapport aux feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, aux tiges et aux racines qui occupent successivement les groupes B et C (Annexe III, Tableaux 12 et 15) .

La comparaison des moyennes de semis du chêne liège transférés durant une période de 3h, 6h et 9h révèle l'existence des différences significatives d'une part entre les températures, les organes et d'autre part entre les stress (Annexe III, Tableaux 13 et 16) Les hautes températures induisent une diminution de l'accumulation de glucose et de fructose par rapport au témoin.

Ainsi les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance accumulent plus du glucose et du fructose par rapport aux feuilles de la 2^{ème} vague de croissance, aux tiges et aux racines. L'accumulation du glucose et du fructose est plus élevée au niveau du 1^{er} stress par rapport aux autres stress. Les séquences des moyennes du glucose et du fructose au niveau des différents organes des semis ayant subi des stress sont respectivement suivantes :

Pour le glucose :

[S1] > [S3] > [S2]; [Témoin] > [38°C] > [40°C] > [42°C] > [44°C]; [V1] > [V2] > [T] > [R]

Pour le fructose:

[S1] > [S2] > [S3]; [Témoin] > [38°C] > [40°C] > [42°C] > [44°C]; [V1] > [V2] > [T] > [R]

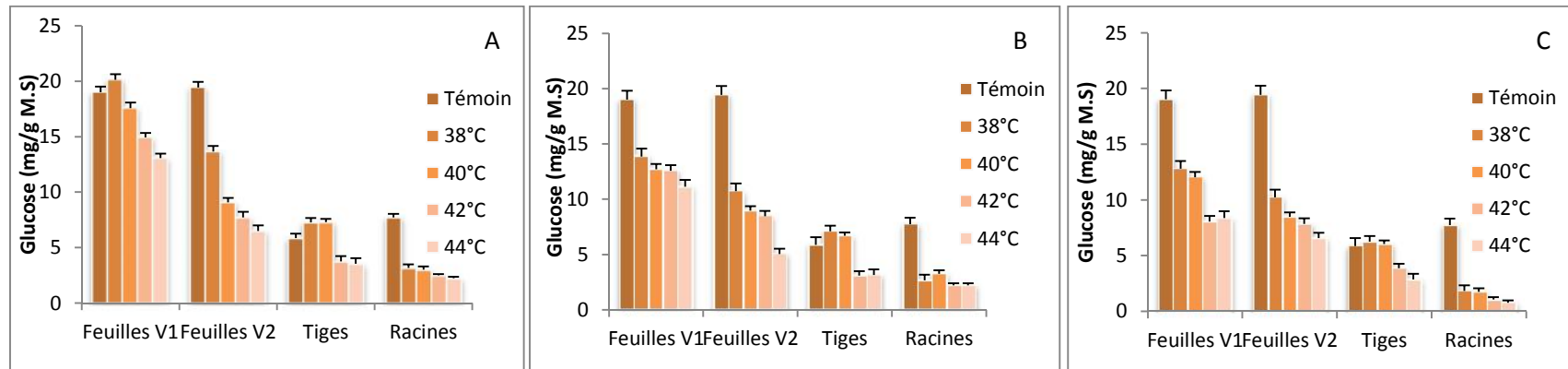


Figure 28: Teneur en glucose chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures: a: S1 ; b: S2 ; c: S3.

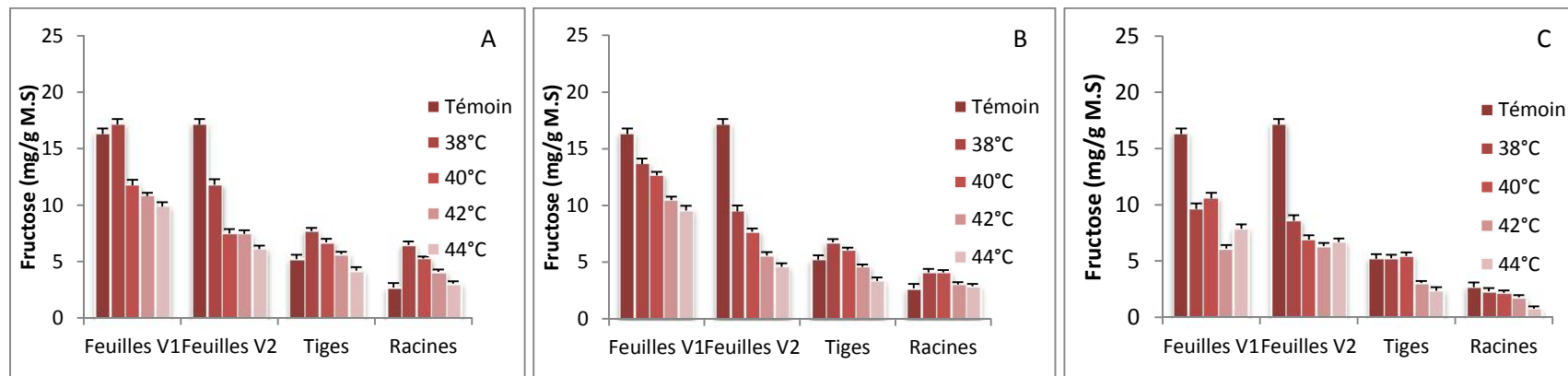


Figure 29: Teneur en fructose chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures: a: S1 ; b: S2 ; c: S3.

2.3.4. Quercitol

A l'exception de la température 44°C où les feuilles de V1 de semis de chêne liège transférés à un stress thermique compris entre 38°C et 44°C durant 3h accumulent plus de quercitol par rapport au témoin ; la teneur en quercitol pour les autres traitements reste similaire à celle du témoin (Figure 30a). Elle augmente d'une manière significative dans les feuilles de V2 où elle est 3 fois plus importante à 44°C. En ce qui concerne les tiges, la teneur la plus forte est obtenue à 42°C et 44°C ; alors qu'à 38°C et 40°C, la teneur est identique à celle du témoin. Le contenu en quercitol dans les racines reste toujours supérieur à celui du témoin en atteignant son maximum à 40°C (40%) (Annexe III, Tableau 17).

Une anova (5%) est effectuée sur les teneurs de quercitol des semis précédents (S1) indique une différence significative entre les traitements et les organes (Annexe III, Tableau 18). Au niveau des semis, l'Anova confirme une accumulation de quercitol de 2 fois plus à 42°C et 44°C qui correspondent au groupe A avec la moyenne la plus élevée alors que les traitements 40°C et 38°C sont similaires au témoin en occupant le même groupe B ($p < 0.0001$). Au niveau des organes, les différences sont très significatives dont les feuilles de V2 accumulent plus de quercitol par rapport aux feuilles de V1, tiges et racines.

Les teneurs en quercitol au niveau des feuilles de V1 pour les différents traitements (S2) manifeste deux phases : la première phase entre 38°C et 42°C où cette teneur est identique à celle du témoin ; la seconde correspond à 44°C avec une d'augmentation de (24%). Concernant les feuilles de V2 et les tiges, l'augmentation de quercitol est plus importante que celle de V1 quelque soit l'intensité de stress et elle plus importante à 40°C où cette augmentation est respectivement de 144% et 68,5% par rapport au témoin. Dans les racines et par rapport au témoin, les teneurs en quercitol augmentent dès 38°C et atteignent leur maximum à 44°C (100%).

L'analyse statistique à 2 critères de classification (organes, températures) des résultats de la teneur en quercitol chez les semis de chêne liège soumis à un stress thermique de 6h (S2), montre une accumulation très nette par rapport au témoin (Figure 30b). Les différences sont très significatives entre les différents traitements. Les fortes moyennes sont obtenues à 40°C, 44°C, 42°C et 38°C qui correspondent respectivement aux groupes A et B. Ainsi, le dernier groupe C est affecté au témoin avec la plus faible moyenne (Annexe III, Tableau 18). Au niveau des

organes, l'analyse statistique donne les mêmes résultats que ceux du stress précédent (S1) où les feuilles V2 accumulent également la teneur la plus forte par rapport aux autres organes.

Les résultats de (S3) montrent une augmentation de quercitol dans les différents organes avec l'intensité de stress (Figure 29c). Ces résultats sont confirmés statistiquement par l'analyse de la variance à deux critères fixes qui montrent que la température 44°C occupe le 1^{er} groupe. En fonction des températures et des stress (Annexe III, Tableau 19), les teneurs en saccharose varient dans le sens:

[S3] > [S2] > [S1]; [44°C] > [42°C] > [40°C] > [38°C] > Témoin; [V2] > [V1] > [T] > [R]

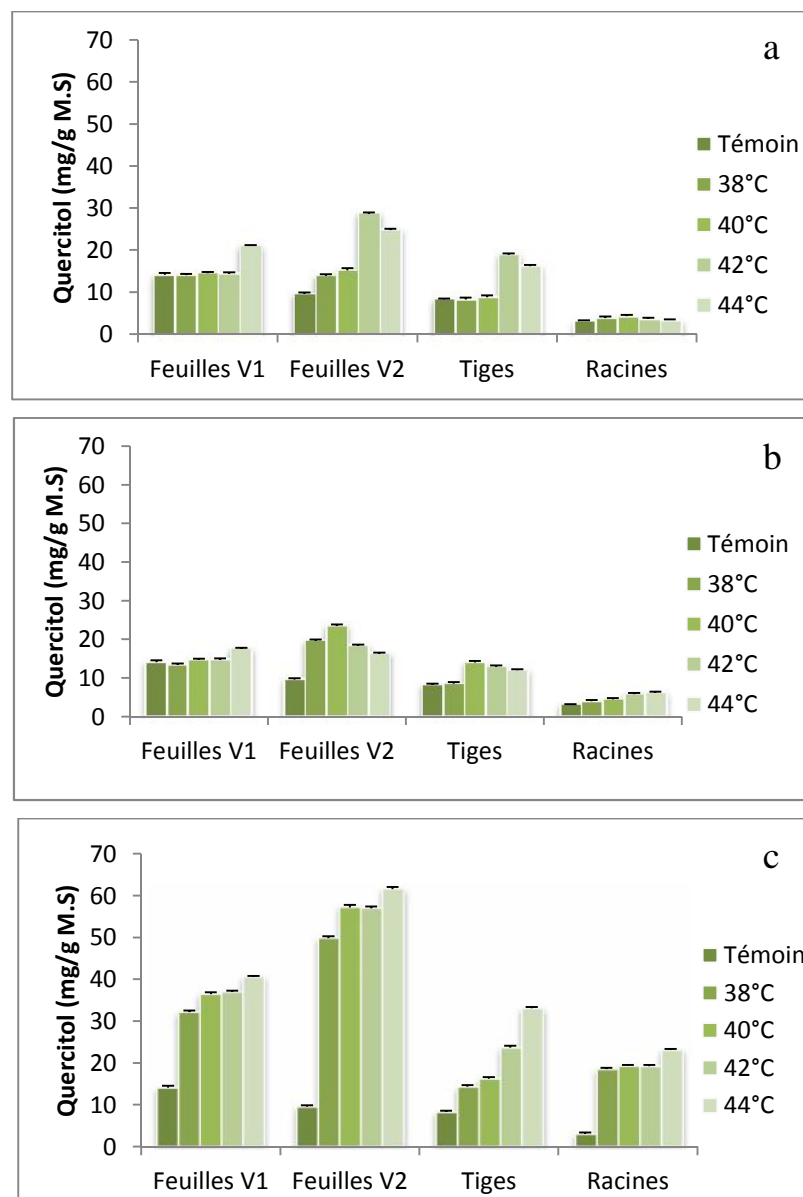


Figure 29: Teneur en quercitol chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.

2.3.5. Amidon

La quantité d'amidon diminue significativement dans les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance et les tiges (Figure 30a); ces taux de diminution augmentent avec l'intensité du stress et les plus bas sont observés à 44°C et atteignent une concentration de 90% dans les feuilles de la vague 1 de croissance et 70% dans les tiges. Contrairement aux feuilles de la 1^{ère} vague et aux tiges, les feuilles de la 2^{ème} vague et les racines présentent des taux d'amidon plus importants à 38°C quelque soit la durée du stress qui sont respectivement (720% et 77% pour une durée de 3h). Ces taux diminuent à 40°C alors qu'ils retrouvent leur niveau initial à partir de 42°C dans les racines. Pour les semis transférés durant une période de 6 h et 9h, excepté la température 38°C augmentation importante d'amidon pour S1 et S2 ; les autres températures sont marquées par des diminutions des taux d'amidon qui deviennent plus importantes avec l'intensité et la durée de stress dans les différents organes. L'analyse de la variance à un critère signale une différence très significative en fonction de température ($p < 0.001$). Ainsi, les résultats illustrés par les figures 30b et 30c montrent une grande différence entre les organes et entre les températures, ceci est confirmé statistiquement par l'analyse de la variance à 2 critères de classification qui montre qu'il existe une différence significative entre les organes où la moyenne la plus élevée est affichée au niveau des racines quelque soit la durée du stress ; alors que les feuilles de la 1^{ère} vague de croissance (S1) et les feuilles de la 2^{ème} vague de croissance (S2 et S3) présentent les plus faibles moyennes en amidon (Annexe III, Tableaux 20 et 21).

La figure 30 nous montre qu'il existe des différences de la teneur en amidon selon les différents organes des semis du chêne liège soumis à 3 stress successifs (S1, S2 et S3), ces variations sont confirmés par l'analyse de la variance à 3 critères de classification qui montre des différences très significatives entre les températures, entre les organes et entre les stress (annexe 21). On enregistre les valeurs les plus élevées au niveau des racines, la comparaison des moyennes par le biais du test de Newman et Keuls fait ressortir 3 groupes homogènes où le premier groupe A concerne les racines, alors que le dernier groupe C correspond aux feuilles de la 2^{ème} vague de croissance. En fonction de température, les teneurs en amidon les plus élevées sont enregistrées à 38°C et les plus faibles à 44°C. Ainsi, l'accumulation d'amidon est plus élevée à S1 et plus faible à S3. On a les séquences suivantes :

$$[S1] > [S2] > [S3]; [38^{\circ}\text{C}] > [\text{Témoins}] > [40^{\circ}\text{C}] > [42^{\circ}\text{C}] > [44^{\circ}\text{C}]; [R] > [T] > [V1] > [V2]$$

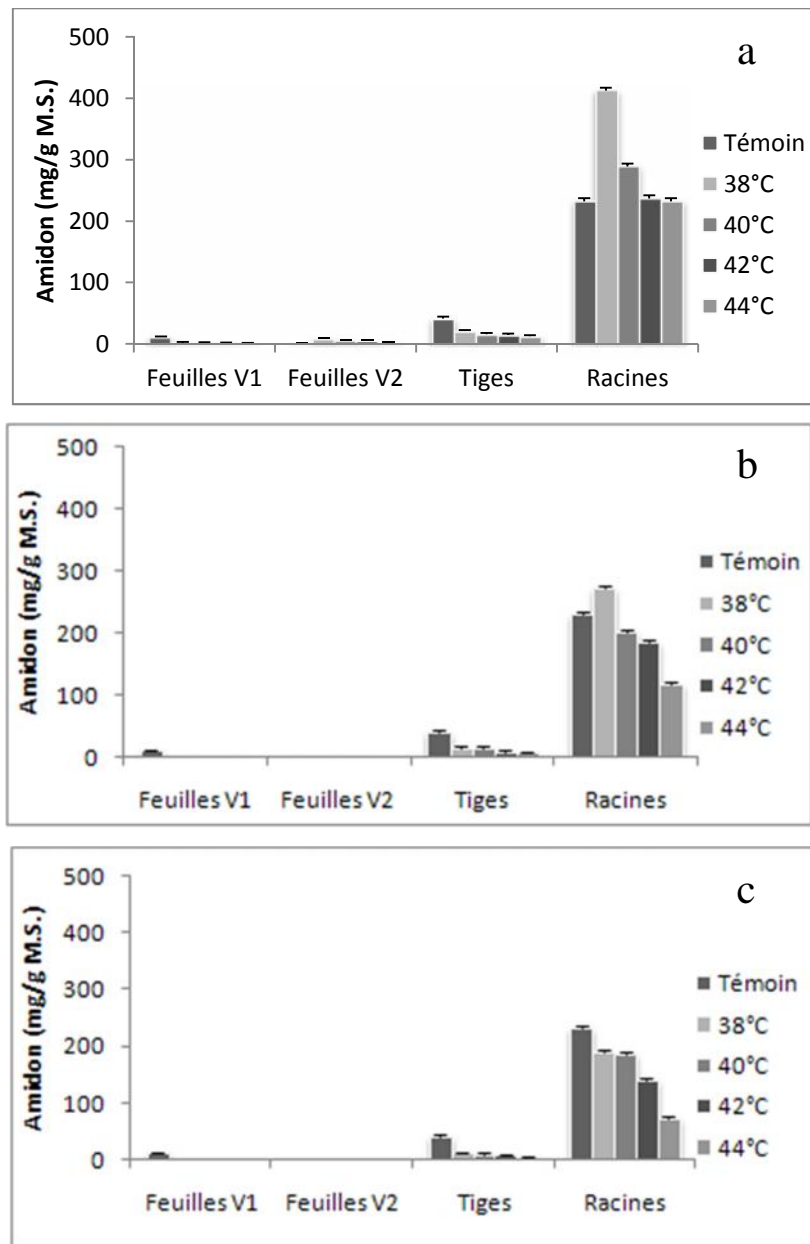


Figure 30 : Teneur en amidon chez les semis de chêne liège soumis aux hautes températures.

3. L'analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales effectuée sur les différents paramètres (morphologiques : hauteur de la tige, nombre de feuilles et surface foliaire) et biochimiques (proline, saccharose, glucose, fructose, protéines solubles totales, quercitol et amidon) identifiés et quantifiés lors des différents stress (S1 : 3h, S2 : 6h et S3 : 9h) dans les différents organes (feuilles de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance, tiges et racines) chez les semis du chêne liège soumis à une gamme de température comprise entre -2°C et 44°C est illustrée par la figure 31. Le plan 1, 2 est retenu, car il rend compte d'un maximum d'informations sur les corrélations existantes entre la distribution de ces paramètres et les stress thermiques.

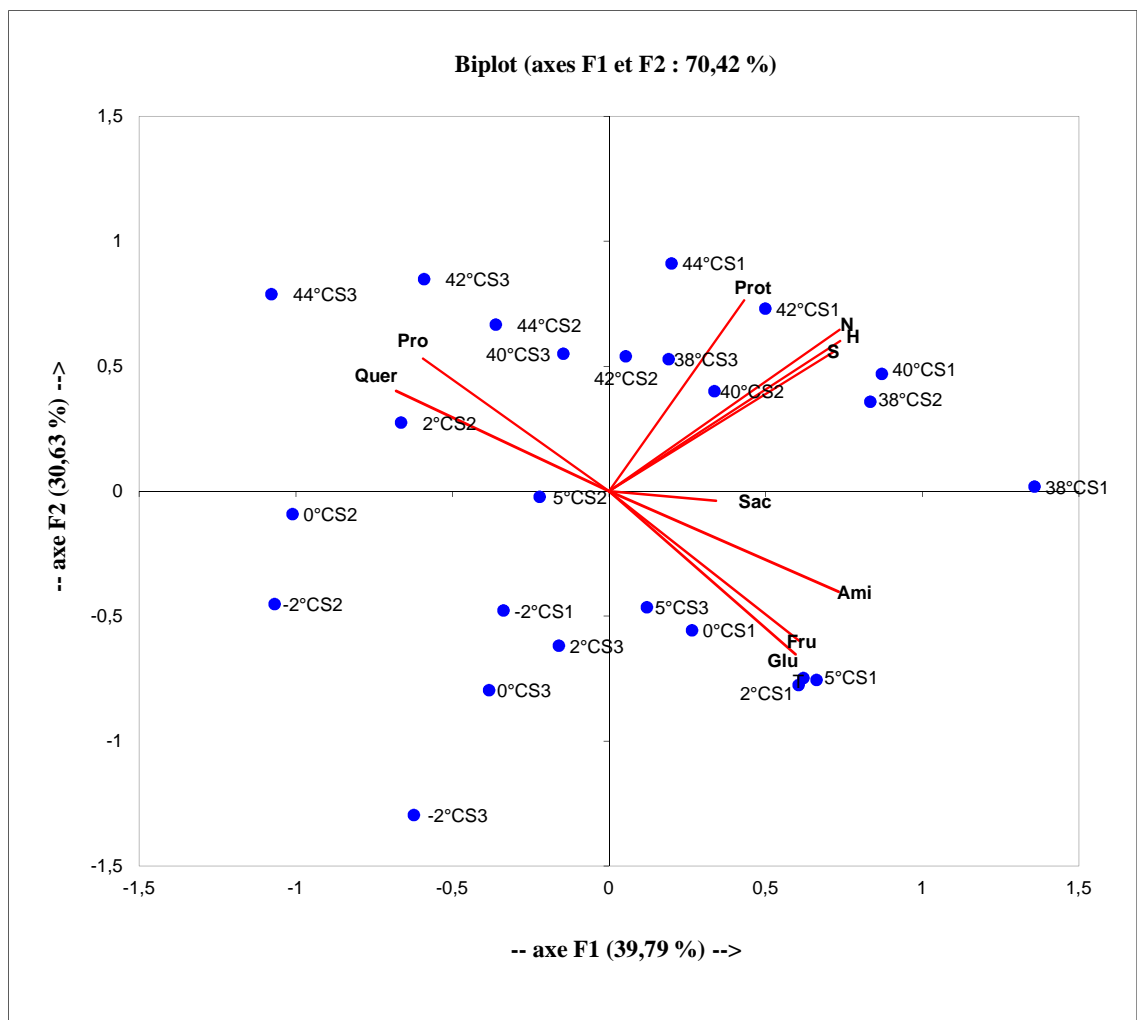


Figure 31 : Cercle de corrélations. Ami : amidon ; Glu : glucose ; Fru : fructose ; Pro : proline ; Prot : protéines ; Quer : quercitol ; Sac : saccharose ; H : hauteur de la tige ; N : nombre de feuilles ; S : surface foliaire ; T : témoin.

L'axe 1 est représenté par les paramètres morphologiques (hauteur, nombre de feuilles et surface foliaire) et biochimiques (fructose et amidon) dans la mesure où ces derniers présentent les plus fortes contributions. À l'opposé, le quercitol et la proline sont négativement représentés (Annexe IV). L'axe 2 est représenté par les protéines totales et le glucose.

L'affinité des différents paramètres avec les stress thermiques est confirmée par l'analyse en composantes principales (ACP), ce qui met en évidence l'influence de la variabilité thermique sur l'accumulation de métabolites dans les différents organes de semis de chêne liège. En effet, trois groupes homogènes sont obtenus par l'ACP. Le premier groupe (G I) présente des affinités avec le stress thermique (hautes températures : 40°C S1, 42°C S1, 44°C S1, 38°C S2, 40°C S2 et 42°C S2 et 38°C S3) et regroupant les paramètres morphologiques (hauteur de la tige, nombre de feuilles et surface foliaire) et biochimiques (protéines totales). Le second groupe II (G II) est situé toujours sur le même axe du cercle des corrélations. Il correspond aux basses températures 5°C S1, 2°C S1, 0°C S1 et 5°C S3 se caractérise par l'amidon, le fructose et le glucose. Le troisième groupe (G III) se caractérise par les hautes températures 44°C S2, 44°C S3, 42°C S3, 40°C S3 et une basse température 2°C S2 ; il regroupe le quercitol et la proline. En effet, quand les soumis sont soumis aux variations thermiques, leur quantité de sucres solubles diminue au profit d'une accumulation de la proline et du quercitol, ceci est confirmé par des fortes corrélations négatives (Tableau 5). Ainsi, d'autres corrélations positives sont également observées entre les différents paramètres morphologiques et les protéines totales.

Tableau 5 : Matrice de corrélation

	H	N	S	Glu	Fru	Sac	Ami	Pro	Prot	Quer
H	1	0.928	0.920	0.131	0.203	0.194	0.238	-0.014	0.670	-0.170
N	0.928	1	0.852	-0.005	0.082	0.173	0.307	-0.082	0.809	-0.244
S	0.920	0.852	1	0.146	0.132	0.241	0.163	-0.088	0.579	-0.241
Glu	0.131	-0.005	0.146	1	0.897	0.350	0.531	-0.507	-0.335	-0.540
Fru	0.203	0.082	0.132	0.897	1	0.177	0.610	-0.449	-0.288	-0.466
Sac	0.194	0.173	0.241	0.350	0.177	1	0.041	-0.244	0.084	-0.068
Ami	0.238	0.307	0.163	0.531	0.610	0.041	1	-0.736	0.148	-0.680
Pro	-0.014	-0.082	-0.088	-0.507	-0.449	-0.244	-0.736	1	0.038	0.670
Prot	0.670	0.809	0.579	-0.335	-0.288	0.084	0.148	0.038	1	-0.057
Quer	-0.170	-0.244	-0.241	-0.540	-0.466	-0.068	-0.680	0.670	-0.057	1

En gras, valeurs significatives (hors diagonale) au seuil $\alpha=0,050$ (test bilatéral)

II. Discussion

La diversité des rythmes biologiques est grande (Millet, 1987). Selon les espèces et le climat, la succession d'étages de ramifications nettement distinctes souligne l'existence d'une activité rythmique de la croissance (Crabbé, 1993). L'étude de la croissance en conditions contrôlées (25°C) de chêne liège montre qu'elle est rythmique et beaucoup plus rapide qu'en conditions naturelles. La rythmicité, de nature endogène, se manifeste à la fois dans l'espace et dans le temps. Les pousses de la Saint-Jean, au mois de juin de l'été (Summer shoots) en climat tempéré, sont causées par la croissance du bourgeon terminal. Cette croissance par « flush » caractérise beaucoup de végétaux ligneux ; elle est polycyclique et se réalise par vagues successives. Elles sont régulières chez les chênes. Sous ce climat, beaucoup d'espèces montrent la même type de croissance : le Hêtre (Lavarenne *et al.*, 1971), le Noisetier (Barnola, 1976), le Noyer (Mauguet *et al.*, 1977), le Mélèze (Owen et Molder, 1979) et le chêne pédonculé (Alatou *et al.*, 1989). Sous d'autres climats, la croissance par vagues est surtout fréquente chez les arbres tropicaux : l'Hévéa (Halle et Martin, 1968), le Manguier (Parisot, 1985), le Terminalia (Maillard, 1987). La croissance par vagues intéresse tous les chênes étudiés jusqu'à présent, mais particulièrement analysée chez les chênes pédonculés (Champagnat *et al.*, 1986 ; Alatou *et al.*, 1989 et 1990), les chênes rouges (Farmer, 1975, Hanson *et al.*, 1988), le chêne afarès et le chêne zeen (Alatou *et al.*, 1995).

Le chêne liège cultivé à 25°C ± 2°C (témoin) présente une croissance rythmique caractérisée par une succession de vagues et une phase de repos apparent. Le repos n'est qu'apparent, car des promordia foliaires sont formés sans arrêt. En ce qui concerne les composantes spatiales, le nombre d'ensembles foliaires à limbes assimilateurs diminue d'une vague à l'autre. L'hétéroblastie reste faible (2 à 3 écailles). D'après nos résultats, nous constatons que le témoin est identique à celui décrit par Alatou (1990) qui montre une capacité régulière d'allongement des entre-nœuds, même faible, associée à une organogenèse toute aussi régulière qui permet d'orienter le développement vers une croissance prolongée voire continue.

Le froid a une influence sur les périodes de repos. Ainsi la période d'application du stress a une influence sur la durée de repos, Parmentier (1993) remarque que si ces stress sont appliqués au début de la vague de croissance, le 5^{ème} - 6^{ème} jours de la vague, les repos sont égaux aux témoins dans le cas d'un passage à 5°C pendant 8 jours. En ce qui concerne l'allongement de

la tige, il est en relation avec l'émission des feuilles qui est plus active quand l'allongement de la tige est plus intense et qui diminue lorsque la croissance caulinaire ralentit (Maillard, 1987 ; Viemont, 1984 in Alatou, 1990).

Nos résultats indiquent que le passage d'un étage à l'autre reste marqué par une feuille de petite dimension associée à un entre-nœud plus court, et par un nombre d'écailles égal à 2 en moyenne. Sur le plan morphologique : on constate qu'il y a un lien entre la longueur de la feuille et celle de l'entre-nœud observé pour les semis transférés à différentes températures. Selon Maillard (1987), cette relation entre la longueur de la feuille et l'entre-nœud dans le cas de *Terminalia superba* n'est pas générale; chez le Mandarinier commun, la longueur des feuilles varie d'une façon aléatoire. Les feuilles exercent une influence stimulatrice sur la croissance des entre-nœuds; ainsi, Maillard (1987) pense que les feuilles exercent très tôt un rôle régulateur sur les divisions cellulaires et donc sur la croissance à venir des entre-nœuds.

La base fondamentale du rythme semble être la composante la plus stable du rythme. Les très jeunes feuilles en croissance ont vraisemblablement un rôle majeur dans le déterminisme de la croissance rythmique, il nous semble que les besoins en protéines nécessaires à leur édification et à leur constitution pourraient se faire aux dépens de la croissance de l'entre-nœud associé, favorisant de ce fait leur accumulation près du méristème (Alatou, 1990).

L'acclimatation au froid est un processus complexe impliquant des changements physiologiques et métaboliques sous contrôle génétique. Les plantes qui restent actives pendant l'hiver doivent maintenir leur métabolisme primaire essentiel pour conserver une croissance minimale. Elles doivent lutter contre le froid qui diminue la vitesse des réactions enzymatiques, ce qui a des conséquences sur la plupart des processus biologiques (Stitt et Hurry, 2002). Des composées peuvent jouer le rôle d'osmoprotecteurs. Ce sont des protéines solubles, la proline, la glycine bêtaïne, le sorbitol ou des polyamides mais aussi des sucres solubles. Ces constituants sont hautement solubles et non toxiques pour l'organisme. Les osmoprotecteurs servent à augmenter la pression osmotique dans le cytoplasme et peuvent aussi stabiliser les protéines et les membranes quand les températures sont défavorables (Breton *et al.*, 2000).

Nos résultats sur les semis de chêne liège montrent que l'action des basses températures se traduit par des variations dans les taux de proline, protéines totales, sucres solubles

(glucose, fructose, saccharose), amidon et le quercitol. De plus, ces variations diffèrent selon l'organe considéré, reflétant probablement des mécanismes de tolérance différents. Les teneurs en proline de semis de chêne liège soumis aux basses températures manifestent des variations selon la température appliquée (Annexe II, Tableaux 3 et 4). En effet, elles sont faibles dans les conditions normales (témoin). Ces résultats sont en accord avec ceux de Knu et Chen (1986) montrant que la teneur en proline est très faible dans les feuilles et les organes productifs en conditions favorables ; alors qu'elles sont plus ou moins élevées dans les différents organes des semis transférés aux basses températures, avec une accumulation relativement plus forte dans les racines. Cette accumulation préférentielle de la proline dans le système racinaire a déjà été observée et résulterait du transfert à longue distance de la proline des parties aériennes vers les racines (Vezina et Paquin, 1982). Toutefois, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'une régulation différentielle de la biosynthèse de la proline dans les feuilles et les autres organes de la plante, telle que la racine. Maris *et al.* (1969 in Zerrad *et al.*, 2006), ont signalé que l'augmentation de la proline était nette au niveau des racines et elle peut être due aussi bien à l'inhibition de l'oxydation des protéines qu'à la dégradation de protéines en leur précurseur.

La proline, localisée principalement dans le cytoplasme, agirait comme un cryoprotectant durant l'exposition de la plante à des températures gélives (Galiba, 1994). Son accumulation durant l'endurcissement a été associée à une augmentation de la tolérance au froid chez plusieurs plantes (Dörffling *et al.*, 1998). L'utilisation de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* (Nanjo *et al.*, 1999) et de tabac (Kavi Kishor *et al.*, 1995), ou la découverte du mutant *Eskimo* (Xin et Browse, 1998) qui sont capables de surproduire ou d'accumuler la proline a permis d'établir de façon convaincante l'existence d'un lien entre l'accumulation de la proline et le degré de tolérance au gel de ces espèces. A 2°C, la teneur en proline est la plus élevée par rapport au reste des traitements. Ce résultat semble en parfait accord avec celui rencontré chez les plantes de *Solanum commersonii* dont l'acquisition de la résistance au gel comporte une succession d'événements ; à 2°C, la plante accumule des sucres solubles et de la proline. Ce phénomène s'accompagne successivement d'une augmentation de la pression osmotique et d'un accroissement sensible de la quantité d'acide abscissique et de la synthèse de protéines solubles. A basse température, l'effet n'affecte pas seulement le métabolisme de la proline, mais aussi le transport de son lieu de synthèse, qui est la feuille au site de résistance qui apparaît comme un point crucial dans l'acquisition de la résistance des plantes aux agressions (Vezina et Paquin, 1981).

La proline libre augmente dans le collet et les racines de la luzerne durant l'endurcissement au gel (Paquin et Pelletier, 1981), dans les racines de chêne liège (Rached-Kanouni et Alatou, 2005). Toutefois, le fait que les taux les plus élevés de la proline ont uniquement été trouvés à 2°C, nous pouvons déduire que la tolérance des semis de chêne liège aux basses températures n'est pas liée uniquement à la présence de proline et que d'autres molécules participeraient à cette réponse adaptative. Les acides aminés comme la proline, sont impliqués dans la tolérance au froid. Le contenu en proline a été corrélé à la tolérance au froid chez l'*Eucalyptus* (Teulières, 1990). D'autre part, lorsque le gène de la P5CS (intervenant de la voie de biosynthèse de la proline) est surexprimé chez le tabac, le taux de proline élevé observé est corrélé à une augmentation de la tolérance au gel (Konstantinova *et al.*, 2002). Chez l'*Eucalyptus*, le gène codant une P5CS a été isolé à partir d'une culture cellulaire exposée au froid (El Kayal, 2004).

L'analyse de la variance de la teneur en protéines totales est très hautement significative entre les traitements, les organes et les stress appliqués (Annexe II, Tableau 7). La comparaison des moyennes révèle l'existence de quatre groupes homogènes où le premier (A) correspond au traitement 2°C avec la moyenne la plus élevée, les groupes (B) et (C) correspondent successivement aux traitements 5°C, 0°C et -2°C et le dernier groupe correspond au témoin avec la plus faible moyenne. Les protéines de choc thermique ou HSP (Heat Shock Protein) sont des protéines chaperonnes qui aident au repliement, à l'assemblage et au transport des protéines. Souvent induites par la chaleur, certaines le sont aussi par le froid et protégeraient ainsi les protéines de la dénaturation et de l'agrégation (Sung *et al.*, 2001).

En plus des acides aminés libres, l'endurcissement au froid induit des changements quantitatifs et qualitatifs importants dans la composition protéique. Une augmentation de la concentration des protéines totales durant l'endurcissement au froid a été démontrée chez plusieurs plantes (Mckenzie *et al.*, 1988 in Dionne, 2001). En plus de représenter une réserve azotée assurant la reprise printanière, les protéines pourraient jouer un rôle important dans la tolérance au gel des plantes pérennes. Parmi les protéines qui s'accumulent au cours de l'endurcissement au froid, certaines ont des rôles enzymatiques connus requis pour les changements métaboliques observés lors de l'acclimatation au froid. Par exemple, Gibson *et al.* (1994) ont isolé un gène (FAD8) codant pour une désaturase des acides gras pouvant altérer la composition lipidique et la fluidité membranaire chez *Arabidopsis*. D'autres protéines induites par le froid ont des rôles associés aux changements morphologiques ou aux changements

développementaux induits par les basses températures. L'induction des HSPs ne requiert pas une augmentation brutale de la température: elles ont été détectées dans des plantes cultivées au champ, après un accroissement graduel de la température, comme ceux qui sont susceptibles d'être observés dans des conditions normales de croissance (Hopkins, 2003). On peut conclure que les basses températures ont induit une augmentation des protéines dans les semis de chêne liège. Ces résultats sont en conformité avec les recherches de plusieurs auteurs dont Davis et Gilbert (1970) ; McKenzie *et al.*, (1988). Parmi les protéines qui sont impliquées dans la tolérance au froid, les CBF qui sont isolés chez plus de 50 genres de dicotylédones et monocotylédones.

La voie *CBF* représente 5 à 15 % des changements de transcrits en réponse au froid chez *Arabidopsis* (Hannah *et al.*, 2006). Par ailleurs, il est montré chez *Arabidopsis* que le régulon *CBF* (>100 gènes ayant un CRT/DRE) correspond à 12 % des gènes répondant au froid, mais les 72 % des gènes régulés par le froid sont affectés directement ou non par l'expression des *CBF* (Cook *et al.*, 2004). Les mêmes auteurs démontrent que le métabolisme est largement (80 %) modifié dans les plantes d'*Arabidopsis* surexprimant le *CBF* comme dans les plantes acclimatées au froid. Ces éléments de la littérature mettent en évidence l'importance de la voie *CBF* dans la réponse au froid des plantes.

En amont du régulon *CBF*, le gène *ICE1* (Inducer of *CBF* Expression) a été identifié chez *Arabidopsis* à travers un clonage positionnel sur un mutant *ice1* dont l'expression du *CBF3/DREB1A* est modifiée. *ICE1* code un facteur de transcription de type MYC/bHLH (basic helix-loop-helix) qui régule l'expression du *CBF3/DREB1A* en réponse au froid (Fig. 16). La surexpression d'*ICE1* dans des plantes transgéniques résulte en une augmentation de la tolérance au gel, suggérant un rôle activateur d'*ICE1* dans la réponse au stress froid. Un signal froid est nécessaire pour l'activation des protéines ICE par phosphorylation, mais le mécanisme de transduction du signal n'est pas encore connu (Chinnusamy *et al.*, 2003). L'analyse moléculaire du promoteur du *CBF2/DREB1C* a mis en évidence de multiples éléments cis probablement impliqués dans l'expression de gènes induits par le froid (Shinwari *et al.*, 1998 ; Zarka *et al.*, 2003). D'autres éléments de cette voie ont été isolés comme par exemple HOS1 (Lee *et al.*, 2001) et FRY2 (Xiong *et al.*, 2002) identifiés comme protéines répresseurs de transcription des *CBF* alors que LOS4 est un régulateur positif (Gong *et al.*, 2002). Des *CBF* ont aussi été identifiés chez les plantes tropicales à feuilles caduques commel'hévéa (*Hevea brasiliensis*).

Chez les plantes tropicales à feuilles persistantes les plus proches d'*E. gunnii*, un *EgCBF1* répondant au froid est isolé chez *E. globulus* (Gamboa *et al.*, 2007). Enfin, deux *CBF* induits par le froid ont été isolés chez l'espèce tolérante *Poncirus trifoliata* et l'espèce sensible *Citrus paradisi* (Champ *et al.*, 2007). Ainsi, aujourd'hui, des gènes *CBF* ont été identifiés chez environ 13 genres de plantes ligneuses. Les séquences *CBF* des ligneux sont assez conservées entre les espèces et les fonctions sont communes avec celles des plantes herbacées dicotylédones, mais des caractéristiques de ces *CBF* sont moins bien connues que chez les autres espèces. Cependant les espèces ligneuses à feuillage persistant comme l'*Eucalyptus* possèdent des mécanismes plus complexes en réponse au froid que les espèces ligneuses à feuillage caduque.

Le rôle cryoprotecteur des HSPs proviendrait de la protection contre la déshydratation cellulaire, du maintien du transport des métabolites cellulaires et de la protection de l'intégrité de certaines protéines (Houde *et al.*, 1995). Bien que la génétique des HSPs et la régulation de l'expression de leur gènes soient peu à peu décryptées, on ne connaît que relativement peu de choses sur leur rôle dans la cellule ; les HSPs sont synthétisées très rapidement après un accroissement brutal de la température et des ARNm nouvellement transcrits sont détectables en 3 à 5 minutes. Les HSPs représentent la plus grande part des protéines nouvellement synthétisées. Il existe, par exemple, dans le chloroplaste une protéine qui se lie à la Rubisco et qui permet l'assemblage des grandes et des petites sous unités pour former la protéine fonctionnelle (Vierling, 1990).

Ainsi, plusieurs protéines induites par le gel n'ont pas de fonction connue et on ne leur attribue que des rôles potentiels (Thomashow, 1999). Lors de l'acclimatation au froid, une augmentation du taux d'insaturation des acides gras constituant des lipides membranaires et une augmentation de rapport phospholipides sur protéines sont observées dans les membranes (Dionne, 2001). L'analyse statistique révèle l'existence de trois groupes homogènes, le premier groupe correspond aux feuilles de la première vague de croissance qui caractérise la moyenne la plus élevée, le second groupe correspond aux feuilles de la deuxième vague de croissance, le troisième correspond aux tiges et aux racines avec les moyennes les plus faibles. La croissance de la partie aérienne, et surtout celles des feuilles, est généralement plus sensible que celles des racines. Ces dernières ne sont pas des tissus importants de stockage ; leur croissance continue et les niveaux bas de concentration en protéines peuvent indiquer que les racines sont des absorbeurs permanents avec des besoins constants durant la période de croissance des parties

aériennes en vagues (Alaoui-Sossé *et al.*, 1994) et explique la faible teneur en protéines à leurs niveaux. Il semble toutefois que la synthèse de protéines spécifiques soit nécessaire à l'endurcissement. Ainsi, la cycloheximide, antibiotique qui inhibe la traduction cytoplasmique et l'actinomycine, inhibiteur de la transcription, empêchent l'endurcissement. A l'opposé, le chloramphénicol, inhibiteur de la traduction dans le chloroplaste, n'agirait pas sur l'acquisition de la résistance au froid (cas de la chlorelle). Chez *Solanum commersonii*, l'effet de la cycloheximide est particulièrement important pendant les premiers jours de l'endurcissement. Pour la même espèce, l'acquisition de la résistance au gel comporte une succession d'événements. A 2°C, la plante accumule d'abord des sucres solubles, principalement des diholosides entre le troisième et le quatrième jour, puis des triholosides. Ce phénomène s'accompagne successivement d'une augmentation de la pression osmotique, d'un accroissement sensible de la quantité d'acide abscissique et de la synthèse de protéines solubles (Côme, 1992).

La comparaison des moyennes révèle l'existence de deux groupes homogènes, le premier comprend le troisième stress, avec la plus forte moyenne et le deuxième comprend les stress 1 et 2 avec des moyennes faibles. L'accumulation de solutés comme les protéines solubles dans le cytoplasme contribuant à la survie des cellules en cas de gel, en réduisant les pertes d'eau durant la déshydratation induite par la cristallisation de l'eau extracellulaire pour former la glace (Dionne, 2001). L'acclimatation au froid permet de différencier les plantes sensibles au froid de celles qui sont tolérantes. L'endurcissement, quant à lui, différencie les plantes sensibles au gel des plantes tolérantes. L'acclimatation au froid est un processus complexe impliquant des changements physiologiques et métaboliques sous contrôle génétique (Bourion *et al.*, 2003). Les protéines solubles et certaines protéines thermostables induites par le froid se sont accumulées dans les couronnes durant l'endurcissement et dans certains cas les concentrations maximales ont coïncidé avec le maximum de tolérance au froid du pâturin annuel (Dionne, 2001). L'acclimatation aux basses températures exige de l'énergie, produite par la lumière et la photosynthèse qui implique apparemment des modifications de l'expression génique.

Durant l'acclimatation, la synthèse protéique augmente et des modifications du profil des synthèses protéiques interviennent (Hopkins, 2003). Une synthèse importante de protéines dites solubles accompagne ou précède l'acquisition de la résistance au gel. Ce phénomène est associé à une modification des proportions des différents iso-enzymes des peroxydases, de l'invertase, des phosphatases, etc...

Chez les végétaux supérieurs, le saccharose synthétisé dans le cytoplasme des organes chlorophylliens s'accumule au cours de la phase végétative dans les tissus pérennes et en particulier dans les parenchymes de réserves des rameaux et des racines (Yamaki, 1992). Le saccharose qui constitue la forme principale de transport de sucres chez les végétaux, joue d'autres rôles dans la physiologie de la plante. Ainsi, son rôle dans la réponse au froid a largement été argumenté et différentes fonctions telles que la cryoprotection des protéines et des membranes et le maintien de l'osmolarité (Sakai et Larcher, 1997 ; Uemura et Steponkus, 1997 ; Améglio *et al.*, 2000 ; Sung *et al.*, 2003). Chez *Arabidopsis*, le saccharose serait impliqué dans le maintien de l'activité photosynthétique pendant l'exposition à des températures fraîches. Un mutant de la fructose-1,6 bisphosphatase, une enzyme clé de la voie de la biosynthèse de saccharose, est incapable de maintenir une activité photosynthétique suffisante soumise à 5°C et par conséquent tolère très peu le gel (Strand *et al.*, 2003). Dans nos conditions expérimentales, l'évolution des teneurs en saccharose des semis de chêne liège indique clairement que les tiges et les racines accumulent largement plus de saccharose que les feuilles, chez lesquelles les teneurs en saccharose sont importantes à 5°C et inférieures à celles du témoin pour les traitements 2, 0 et -2°C (Annexe II, Tableau 10). Ce manque d'accumulation de saccharose dans les feuilles soumises aux basses températures semble être en contradiction avec les données de la littérature (Strand *et al.* 1999 ; Hurry *et al.* 2000). Ceci n'est pas le cas pour les tiges et les racines des semis de chêne où le saccharose pourrait provenir en partie de la mobilisation locale ou distale des réserves carbonées (Sauter, 1988a et b). Chez le Noyer, cette mobilisation a été décrite dans le cadre de la réparation de l'embolie hivernale des vaisseaux du xylème (Améglio *et al.*, 2000).

L'acclimatation des arbres au froid, qui commence à l'automne, est concomitante avec une augmentation de la concentration des sucres dans les cellules. Par exemple, des peupliers cultivés en pot et préalablement acclimatés sont capables, sans doute en partie grâce à l'accumulation de sucres, de résister à des températures allant jusqu'à -196°C (Sakai et Yoshida, 1968). De même, Alvarez *et al.* (2004) ont mesuré ces variations chez le pois, pour les variétés Champagne et Tèrese. Lorsqu'elle est acclimatée, la variété résistance présente une accumulation spécifique de saccharose et de raffinose dans les feuilles et les racines. Le glucose et le fructose s'accumulent également au cours de l'acclimatation au froid, mais dans des proportions non discriminantes entre les deux variétés.

Plusieurs fonctions ont été proposées pour les sucres dans le rôle de protection des cellules contre les dégâts du gel : ils pourraient agir comme cryoprotecteurs de certains enzymes (Carpenter *et al.*, 1986), participer à la stabilisation des membranes cellulaires pendant les mouvements d'eau liées aux phases successives de déshydratation/expansion (Gusta *et al.*, 1996 ; Danyluk *et al.*, 1998) ou encore agir comme osmolytes pour empêcher une déshydratation excessive des cellules pendant le gel. L'idée d'un rôle important des sucres dans l'acclimatation au froid a également été renforcée par l'étude de mutants ou de plants transgéniques d'*Arabidopsis*. Par exemple le mutant *eskimo1* et les plants surexprimant le facteur de transcription CBF3/DREB1a (CRT)-Binding factor/Dehydration-responsive element-binding factor) présentent de manière constitutive, une tolérance au gel accrue et corrélée à une teneur en sucres plus forte que chez les plants sauvages (Xin et Browse, 1998 ; Gilmour *et al.*, 2000). Le mutant *sfr4* (*sensitive-to-freezing4*) est, quant à lui, incapable de s'acclimater au froid et présente des teneurs en sucres plus faibles que les plants sauvages (Mckown *et al.*, 1996 ; Uemura *et al.*, 2003). Chez *Eucalyptus gunnii*, une accumulation de saccharose, de fructose, de glucose et de raffinose a été observée au cours de l'acclimatation (Leborgne *et al.*, 1995a). Le rôle des sucres dans la tolérance au gel est toutefois resté longuement controversé. Il restait en effet à savoir si l'augmentation des teneurs en sucres est un effet ou une cause de la tolérance au froid. Pour répondre à cette question, Uemura et Steponkus (1997) ont incubé des plantules d'*Arabidopsis* dans une solution de saccharose à 400 mM. Des protoplastes issus de ces plantules présentaient une tolérance au gel identique à celle de plantules acclimatées de manière classique. Teulieres *et al.* (1989) ont réalisé des cultures cellulaires de feuilles d'*Eucalyptus* qui peuvent être acclimatées au froid. Dans un premier temps, grâce à ce système, Leborgne *et al.* (1995b) ont montré une corrélation positive entre le contenu en sucres de ces cellules et leur tolérance au froid après acclimatation, ainsi qu'une amélioration de cette tolérance lors d'un ajout exogène de sucres dans la culture. Ces observations suggèrent donc que l'accumulation de sucres pendant la phase d'acclimatation au froid pourrait être un mécanisme efficace de résistance au gel. Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Travert *et al.* (1997) comparant la résistance au gel de cellules en culture issues de deux génotypes d'*Eucalyptus* hybrides : *Eucalyptus gunnii* / *Eucalyptus globulus* qui résiste bien au gel et *Eucalyptus cypellocarpa* / *Eucalyptus globulus* qui est sensible au gel. Ces auteurs montrent que les cellules du génotype résistant accumulent plus de sucres, notamment du saccharose et du fructose, que les cellules du génotype sensible.

Les hexoses, notamment le glucose et le fructose, jouent un rôle tout aussi important dans la tolérance au froid car ils peuvent conduire sous l'action de saccharose phosphate synthase à la synthèse de saccharose de même qu'ils constituent le motif élémentaire de la molécule d'amidon (Kingston-Smith *et al.*, 1998). Nos résultats montrent que dans les semis de chêne liège, le glucose et le fructose sont généralement plus présents dans les feuilles que les tiges et les racines et ce quelque soit la température (Annexe II, Tableaux 13 et 16). Cependant, cette teneur diminue à mesure que la température décroît et cette diminution est plus marquée chez les feuilles jeunes (feuilles de la vague 2) que les feuilles adultes (feuilles de la vague 1). Même si les hexoses participent également à la tolérance au froid des différents tissus (Sakai et Larcher, 1997), nous ne pouvons pas déduire que le mécanisme de tolérance des feuilles de semis de chêne aux basses températures reposerait principalement sur une accumulation de ces sucres solubles. Ceci indique que le rôle spécifique d'un composé dans la tolérance au froid des plantes est très peu probable. En effet, quelques études récentes suggèrent que les sucres solubles en combinaison avec les protéines pourraient protéger l'intégrité des membranes chez les plantes exposées aux températures gélives. L'accumulation de sucres dans les cellules peut accroître la tolérance à la déshydratation chez les plantes via leur « effet osmotique » qui limite les pertes d'eau par la cellule. Par exemple, chez le chêne et le cornouiller, les monosaccharides, particulièrement le glucose et le fructose, seraient majoritairement responsables de l'ajustement osmotique consécutif à un stress hydrique (Gebre et Tschaplinski, 2002). Des peupliers soumis à un stress hydrique présentent un ajustement osmotique compris entre 0,23 et 0,48 MPa dont 48% peuvent être attribués à des solutés organiques, parmi lesquels on trouve le saccharose, le glucose et le fructose (Gebre *et al.*, 1994).

D'autres composants qui ont été liés à la tolérance au gel sont les cyclitols (polyols isocycliques ou aliphatiques) (Orthen et Popp, 2000). Chez le *Q. robur*, le quercitol (L-1, 3, 4/2,5-cyclohexanepentol) est le cyclitol prédominant [Popp, 1997]. Il est intéressant de noter que chez les semis de chêne, les teneurs en quercitol augmentent suite à leur passage aux basses températures (Annexes II, Tableau 19). En effet, bien que les teneurs en quercitol augmentent fortement dans les tiges et les racines dès l'application de 5°C, cette augmentation est encore plus forte dans les feuilles, notamment celles de la vague 2. Ces résultats indiquent que parmi les molécules solubles dosées (saccharose, hexoses, protéines totales, proline et quercitol) dans cette étude, le quercitol jouerait un rôle de premier plan dans la réponse des feuilles de semis de chêne aux basses températures. Ceci semblerait être moins marqué pour les tiges, qui accumulent le saccharose et les racines qui renferment des teneurs élevés en proline et saccharose.

L'application des conditions de stress hydrique conduit à une accumulation du quercitol dans les tissus foliaires d'*Eucalyptus* (Paul et Cockburn, 1989 ; White *et al.*, 2000 ; Adams *et al.*, 2005 ; Merchant *et al.*, 2006 ; Merchant et Ladiges, 2007). Passarinho *et al.* (2006) ont montré que la transcription du gène codant l'O-méthyltransferase d'inositol impliquée dans la production de quercitol est induite par les basses températures. En outre, le quercitol a été récemment impliqué dans l'ajustement osmotique dans les espèces d'*Eucalyptus* durant les périodes de stress hydrique et de stress salin. Par conséquent, le quercitol agit en tant que cryoprotectant dans des feuilles de *Quercus suber* dont il est le plus dominant. On le trouve dans les feuilles, les brindilles, l'écorce et les bourgeons et contribue jusqu'à 3.3% de la matière sèche (Thomas *et al.*, 2004). Les cyclitols (quercitol) ont un rôle dans la séquestration de l'énergie photochimique excessive, dans la stabilisation des composants cellulaires et dans la signalisation de stress (Merchant *et al.*, 2006). L'effet de l'environnement sur la composition en métabolites organiques des feuilles du chêne liège cultivé en champs a été étudié afin de déterminer une variation quantitative saisonnière (Passarinho *et al.*, 2006). Il en ressort que deux dérivés de cyclitol, l'acide quinique et le quercitol sont les métabolites organiques principaux des feuilles. Tandis que l'acide quinique prédominait pendant l'été, le quercitol était prédominant pendant l'automne-hiver. Le rôle protecteur de quercitol pendant la saison hivernale reste à discuter et sur la base de la similitude structurale, on suggère que l'acide quinique pourrait avoir une importance identique, avec un rôle protecteur contre la chaleur et la haute irradiation.

Parmi les composés stockés, l'amidon constitue le produit de réserve le plus abondant. L'évolution de son contenu montre une diminution significative au niveau des feuilles où l'hydrolyse est parfois totale. Côme (1992) a signalé que depuis longtemps qu'un accroissement de la quantité des sucres solubles et la pression osmotique à l'acquisition de la résistance au gel et l'abaissement de la température extérieure. De telles variations sont particulièrement nettes chez *Acer saccharum*, où l'amidon disparaît presque totalement au profit des sucres solubles. De nombreuses espèces présentent le même comportement : chez *Prunus persica* (Marquat *et al.*, 1999), *Olea europaea* (De le Rosa *et al.*, 2000), *Piceas abies* et *Pinus pinaster*. A l'instar des feuilles et des tiges, une augmentation de l'amidon est enregistrée au niveau des racines soumises au froid par rapport aux racines témoins. L'amidon s'accumule à la base des tiges et dans les racines durant l'automne, pour ensuite être hydrolysé graduellement et donner du saccharose à mesure que l'endurcissement au froid des plants s'intensifie. Dans les tiges et les racines, l'évolution du contenu en saccharose montre qu'elle suit une évolution inverse de celle du contenu en amidon (*Prunus persica* : Marquat *et al.*, 1999 ; Aue *et al.*, 2000 ; *Malus pumila*:

Brunel, 2001). L'accumulation des réserves de sucres solubles et de l'amidon dans les racines au cours de l'acclimatation est, cependant, considérée comme facteur déterminant du niveau de tolérance au gel chez la luzerne. Chez les arbres, les études à ce sujet se sont montrées décevantes bien que des auteurs aient mesuré les concentrations dans des territoires très précis (Bonhomme, 1998 ; Brunel, 2001 ; Maurel *et al.*, 2004). Chez le Fraisier, les études ont concerné surtout les organes à fort pouvoir de stockage de glucides : les rhizomes et les racines. Ainsi, Raynal-Lacroix *et al.*, (1999) ont trouvé que les racines principales accumulent de l'amidon jusqu'à 170 mg/g M.S, et les rhizomes jusqu'à 70 mg/g M.S. Il a été montré que les quantités totales de sucres augmentaient durant l'hiver chez les plants en pépinière (Lopes *et al.*, 2002) et diminuaient assez régulièrement dès le passage en chambre froide (Verpont, 2003). Les proportions respectives d'amidon et de sucres solubles sont évidemment reliées aux conditions de température subies, à travers l'interconversion amidon/saccharose ; cela a été confirmé y compris dans les tissus du bourgeon par (Robert *et al.*, 1999). Menoud (1992) avait trouvé la même chose chez le rosier, avec un renseignement supplémentaire que cette interconversion peut être assez rapide et que, par la suite, les concentrations en saccharose et en hexoses diminuaient. Le rôle spécifique d'un composé dans la tolérance au froid des plantes est très peu probable.

Le comportement des semis de chêne liège stressés à des différents niveaux de hautes températures montre une augmentation très importante des quantités de proline libre dans les différents organes avec l'intensité et la durée de stress. En effet, elles sont faibles dans les conditions normales (témoin) ; alors qu'elles sont plus élevées dans les différents organes des semis transférés aux hautes températures, avec une accumulation relativement plus forte dans les racines. De nombreux travaux rapportent que la proline s'accumule dans la plante lorsqu'elle se trouve en conditions défavorables (Sivaramakrishnan *et al.*, 1988) ce qui traduit le caractère de la résistance aux stress (Greenway et Munns, 1980). Stewart et Lee (1974) in Zerrad (2006), suggèrent que la proline à de fortes concentrations agisse comme soluté pour l'ajustement osmotique, et aussi pour servir de réservoir de composés azotés et de carbone pour une utilisation ultérieure dans la croissance.

Selon Feitosa *et al.*, (2001), Meloni *et al.*,(2004), le rôle attribué à la proline dans la réponse des plantes aux stress reste parfois controversé ; pour Quien *et al.* (2001), son accumulation contribue à l'acquisition de cette résistance grâce au maintien de la turgescence cellulaire chez de nombreuses espèces, créée par l'ajustement osmotique dont la proline est responsable. Ces résultats sont confirmés par des recherches de plusieurs auteurs tels que

Barnetts et Naylor (1966). La proline localisée principalement dans le cytoplasme, agirait comme cryoprotectant lors d'exposition de la plante à des températures hausses (Chaitanya et Sundar, 2001). Elle stabilise les structures subcellulaires (Bohnert *et al.*, 1995) et contrecarrer les radicaux libres.

Le mécanisme de l'accumulation de la proline permet de penser à la présence de sites de résistance de la plante à la contrainte. En effet, le transport de la proline de la source au site de la résistance est admis depuis longtemps comme un paramètre important dans l'acquisition de cette résistance (Bellinger *et al.*, 1989). Paquin (1986) signale que la proline serait synthétisée dans les feuilles et transportée vers ces sites; d'autres rapportent que l'acide aminé migre chez diverses plantes glycophytes vers les feuilles. Nos résultats montrent que les semis de chêne liège conduit sous des différents niveaux de stress thermique accumule plus de proline dans les racines, on a enregistré la plus forte accumulation à 44°C pour un stress thermique de 9 heures ($7,51 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/g MS}$) (Annexe III, Tableau 4). Cette compartimentation racinaire du composé aminé présume que la résistance de cette espèce à ces niveaux de températures chaudes est acquise dans ces organes. Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux qui confirment que la proline se localiserait dans les racines chez le Retam (Ighil Hariz, 1990).

Les protéines ont aussi connu une variation de leur concentration après le stress thermique (hautes températures). On a enregistré une forte accumulation à 44°C pour une période de 3h (Annexe III, Tableau 6). Donc, les protéines s'accumulent suite à un stress à la chaleur. Cette augmentation est due a une activation d'un ensemble de gènes permettant la synthèse des protéines spécifiques associées aux stress tels que les protéines " LEA" qui assurent une protection de l'ensemble vitale des protéines cellulaires (David et Grongnet, 2001) et les protéines de choc thermique qui permettent un maintien des structures protéiques et membranaires de la cellule végétale (Baker *et al.*, 1988). L'implication des HSP dans le phénomène nommé «thermotolérance» a été démontrée. Les HSP ainsi synthétisées permettent la «renaturation» des protéines et la récupération de l'activité enzymatique (Souren *et al.*, 1999). La durée de stress thermique affecte négativement la teneur en protéines. Les cellules, qui ont été soumises à un pré-choc thermique avant d'être soumises à un autre stress, présentent une résistance accrue lors du deuxième stress. En fonction des organes, l'accumulation des protéines est plus importante au niveau des feuilles par rapport aux tiges et aux racines. Nos résultats sont en accord avec la tendance généralement recensée dans la littérature voulant que le système

racinaire soit moins affecté que la partie aérienne en cas de stress. Heller (1998) signale que les protéines se rencontrent dans les feuilles et dans les organes de réserves à 1-3% d'azote protéique.

Depuis longtemps, il est connu que le taux des sucres augmente considérablement chez des plantes soumises aux différents types de stress ; en effet, cela a été vérifié par Chunyang (2003) chez des adultes d'*Eucalyptus microtheca* sous différents stress hydriques. Les principaux sucres solubles accumulés sous stress sont : le glucose, fructose et le saccharose (Hare et al., 1998) et ces derniers semblent jouer un rôle très important dans le maintien d'une pression de turgescence qui est à la base des différents processus contrôlant la vie d'une plante. L'augmentation de l'accumulation en sucres solubles pourraient avoir un rôle de protection des membranes. Ils permettent également une préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines (Darbyshire, 1974) ; ou un rôle osmotique empêchant la déshydratation des cellules et le maintien de la balance de la force osmotique pour garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevés que possible (Bouzoubaa et al., 2001).

La présence de ces sucres solubles en période de chaleur et de sécheresse protégerait les thylakoïdes de l'altération irréversible des membranes et exercerait une action favorable sur la résistance protoplasmique à la sécheresse. (Marguery, 1992) affirme que la température associée à l'insolation, pourrait être un facteur déterminant pour l'accumulation des sucres. Nos résultats montrent que chez les semis de chêne liège, le glucose et le fructose sont généralement plus présents dans les feuilles que les tiges et les racines et ce quelque soit la température (Annexe III, Tableaux 13 et 16). Cependant, cette teneur diminue à mesure que la température croît et cette diminution est plus marquée chez les feuilles jeunes (feuilles de la vague 2) que les feuilles adultes (feuilles de la vague 1). Même si les sucres protègent les membranes contre la déshydratation (Schwab et Gaffe, 1986) et participent au maintien des réactions de phosphorylation, de production d'énergie et protègent les processus de synthèse des enzymes, ce qui impliquerait une meilleure tolérance de la plante à la sécheresse, nous ne pouvons pas déduire que le mécanisme de tolérance des feuilles de semis de chêne aux hautes températures reposerait principalement sur une accumulation de ces sucres solubles. Ceci indique que le rôle spécifique d'un composé dans la tolérance à la chaleur des plantes est très peu probable. En effet, la réduction de la teneur en glucose et fructose au niveau des différents organes de semis de chêne liège avec l'augmentation de la température est en parfait accord avec ceux de

Chaitanya sur les plantes de Mûrier exposées à un choc thermique court (Chaitanya, 2001). La température élevée de la feuille affecte le métabolisme des sucres.

Les sucres peuvent également servir de composés solubles compatibles pour l'ajustement osmotique, comme de nombreuses autres molécules (proline, glycine-bétaïne ou pinitol). Ainsi, les enzymes liés au métabolisme des sucres semblent avoir une importance majeure dans la tolérance au stress. Nombreuses études ont mis en évidence l'accumulation de sucres solubles lors de la dessiccation. Une idée principale en ressort : différents sucres solubles peuvent être présents dans des tissus bien hydratés, mais le saccharose est préférentiellement accumulé dans les tissus en déshydratation.

Nos résultats en saccharose chez les semis de chêne liège ont montré des différences entre les traitements et les stress thermiques appliqués. Ils sont plus élevés pour traitement 38°C (S1 et S2) ; alors qu'ils diminuent pour les autres traitements ; ainsi, ils sont plus élevés au niveau des racines par rapport aux tiges et aux feuilles. Un exemple frappant a été montré à partir de feuilles de *Craterostigma plantagineum* où le sucre majeur (2-octulose) dans les tissus bien hydratés (représentant 90% des sucres présents) est transformé en saccharose lors d'un stress hydrique. Le saccharose représente alors 40% du poids sec (Bianchi *et al.*, 1991). Chez cette même espèce, l'induction lors d'un stress hydrique des messagers codants pour la sucrose synthase (Susy) semble indiquer que l'accumulation du saccharose est régulée au niveau transcriptionnel (Kleines *et al.*, 1999). Déjardin *et al.* (1999) ont aussi démontré l'existence d'un gène codant pour une Susy qui est spécifiquement induite au cours du stress hydrique chez *Arabidopsis*. Cette augmentation semble directement reliée à la diminution du potentiel hydrique au sein de la cellule. Elle est très remarquable au niveau des racines que des coléoptiles et accompagnée par une dégradation de certains disaccharides d'où l'accumulation des sucres réducteurs qui ont montré, eux également, une augmentation de la concentration durant la période de stress pour deux variétés de blé dur (Zeerad *et al.*, 2006).

Enfin, les sucres peuvent avoir un impact sur la régulation de l'expression des gènes. En effet, certains gènes sont directement régulés par le taux de glucose dans la cellule. On pourra citer par exemple le gène codant pour la protéine GRR1 (glucose regulated repressor) isolé chez *Saccharomyces cerevisiae* qui est impliqué dans les cascades de transduction qui font intervenir le glucose. La protéine GRR1 joue aussi un rôle dans la dégradation des protéines. Enfin, GRR1

intervient dans la régulation du cycle cellulaire *via* la dégradation des cyclines Cln1 et Cln2 spécifiques de la phase G1.

Le saccharose et l'amidon sont les premiers glucides stables, issus des processus photosynthétiques du cycle de Calvin et de la voie du glycolate. L'amidon s'accumule dans le chloroplaste, tandis que le saccharose synthétisé dans le cytosol est stocké dans la vacuole ou transféré vers les organes puits. L'amidon des tissus chlorophylliens a fait l'objet de nombreux travaux. En conditions naturelles, les changements de teneur en amidon et en sucres solubles, spécialement le saccharose, ont été bien décrits dans les jeunes arbres pendant le cycle végétatif (Sleigh *et al.*, 1984; Dickson *et al.*, 1990 in Alaoui-Sossé, 1994).

Les faibles quantités de sucres, spécialement l'amidon dans les feuilles de chêne liège (Annexe III, Tableau 22) pourraient être dues à la baisse de régulation de la photosynthèse sous les hautes températures. Cependant, la diminution réelle de la quantité des sucres sous les hautes températures reste incertaine. Mais, on peut croire que sous un traitement des hautes températures, une diminution de la capacité d'utilisation de triose phosphate par l'intermédiaire de la synthèse du saccharose peut réduire les niveaux de carbohydrates dans ces feuilles.

Les hautes températures affectent également la balance saccharose-amidon qui pourrait être due à l'altération d'UDP saccharose synthase par les hautes températures (Leonardos *et al.*, 1996). A cette hypothèse, le traitement des plants de Mûrier par les hautes températures semble affecter les quantités des métabolites photosynthétiques comme les variations de la teneur de G6P ou F6P (Chaitanya, 2001). Sauter et Kloth (1987) in Decourteix, (2005) ont montré que la teneur en saccharose du parenchyme xylémien, Chez le Peuplier, elle est très forte en août, pendant la période de dépôt de l'amidon, faible à la fin de l'automne, et maximale en janvier. La quantité de fructose et glucose reste constante tout au long de l'année.

Nos résultats montrent que le quercitol s'accumule en grande quantité dans les différents organes des semis du chêne liège et en particulier dans les feuilles (Annexe III, Tableau 19). Les cyclitols sont un groupe de solutés compatibles qui se produisent avec des concentrations importantes dans un large éventail d'espèces végétales (Popp *et al.*, 1997). Les cyclitols comme le pinitol, le quebrachitol et le quercitol peuvent s'accumuler avec des quantités relativement importantes, jusqu'à un pourcentage très élevé de matière sèche de la plante entière (Merchant *et*

al., 2006a), et il a été démontré qu'ils s'accumulent en réponse à la sécheresse (Nguyen et Lamont, 1988) ou de la salinité, ce qui suggère également son rôle dans la tolérance au stress.

Dans le cas de l'Eucalyptus, des études en serre ont montré l'accumulation du quercitol dans les feuilles de certaines espèces en réponse au stress salin et à la sécheresse (Adams *et al.*, 2005; Marchant et Adams 2005). D'autres études sur l'Eucalyptus ont montré que les cyclitols et le quercitol en particulier, sont les principaux solutés organiques dans les feuilles (Adams *et al.* 2005). Plouvier (1963 in Merchant et Adams, 2005) a d'abord isolé le D-quercitol dans plusieurs espèces, y compris *E. obliqua*. Plus récemment, Popp *et al.* (1997) a noté une accumulation de D-quercitol dans *Quercus robur*.

CONCLUSION

Conclusion

Le but principal de ce travail est de caractériser les différentes réponses des semis de chêne liège soumis aux différents stress thermiques et de préciser les variations morphologiques et biochimiques sous cette contrainte.

Le chêne liège est une espèce cible de choix par son intérêt économique (liège) et par sa forte exposition aux températures extrêmes. Ce dernier point est particulièrement intéressant pour l'étude des mécanismes de tolérance aux températures extrêmes car le chêne liège pourrait mettre en œuvre des processus particuliers afin de parvenir à résister durant l'hiver et l'été. Le système d'osmorégulation est l'une des réponses défensives des plantes face aux stresses abiotiques tels, le déficit hydrique, les basses et les hautes températures...

Pour l'ensemble des résultats concernant les paramètres morphologiques, l'effet de l'intensité de stress thermique est significatif pour toutes les variables analysées. Pour le développement des jeunes plants de chêne liège ; en conditions de basses températures, le taux de croissance de la hauteur de la tige, la surface foliaire et le nombre de feuilles des semis ayant subi un stress décroît avec la durée et l'intensité de stress. Contrairement aux résultats obtenus pour les basses températures, une croissance maximale pour les paramètres précédents pour les semis de chêne liège soumis à un stress thermique (hautes températures) de 3h (S1) a été observée. L'intensité de stress n'affecte pas le plastochrone apparent mais il affecte négativement la hauteur de la tige à partir de 42°C pour le 2^{ème} stress et 40°C pour le 3^{ème} stress.

L'effet du stress thermique (basses et hautes températures) est très hautement significatif pour les paramètres biochimiques. Nos résultats montrent que les semis de chêne liège sont aptes à accumuler les différents osmolytes comme la proline, les sucres solubles (saccharose, fructose, glucose), quercitol et les protéines dans les différents organes en réponse au stress thermique. L'accumulation de la proline a été bien marquée au niveau des racines, aux températures 2°C et 44°C indiquant la capacité de résistance du chêne liège vis-à-vis la contrainte thermique. Cette accumulation est préférentielle chez les racines. Les osmorégulateurs comme la proline et la glycine beta ne jouent un rôle important dans l'ajustement et la stabilisation osmotique des cellules des plantes.

Pour les teneurs en sucres solubles (saccharose, fructose et glucose) et l'amidon, le stress thermique provoque leur diminution au niveau de tous les organes.

On remarque une accumulation importante de quercitol à des températures extrêmes (-2°C et 44°C), cette dernière est bien marquée au niveau des jeunes feuilles (2^{ème} vague de croissance). Toutefois, pour les niveaux de stress thermique modéré (2°C et 38°C), une hausse de l'accumulation des protéines totales aux niveaux des feuilles de la 1^{ère} et la 2^{ème} vague de croissance est obtenue.

En conclusion, nous avons constaté que le chêne liège manifeste effectivement des traits d'adaptation morpho-biochimique en réponse à des fluctuations thermiques tels que la proline et le quercitol pour les hautes températures, ce qui explique le caractère thermophile de l'espèce. L'éventail thermique probable est compris entre -2°C et 44°C.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références bibliographiques

Abu-Abied M., Golomb L., Belausov E., Huang S.J., Geiger B., Kam Z., Staiger C.J. and Sadot E. (2006). Identification of plant cytoskeleton-interacting proteins by screening for action stress fiber association in mammalian fibroblasts. *Plant J.*, **48**: 367-379

Acharya B.R. and Assmann S.M. (2009). Hormone interactions in stomatal function. *Plant Molecular Biolog.*, **69**: 451-462

Adams M.A., Richter A., Hill A.K. and Colmer T.D. (2005). Salt tolerance in *Eucalyptus* spp.: identity and response of putative osmolytes. *Plant Cell and Environment*, **28**: 772-787

Alaoui-Sossé B., Parmentier C., Dizengremel P. and Barnola P. (1994). Rhythmic growth and carbon allocation in *Quercus robur*. Starch and sucrose. *Plant Physiology and Biochemistry*, **32**: 331-339

Alatou D., Barnola P., Lavaranne S. and Gendraud M. (1989). Caractérisation de la croissance rythmique du chêne pédonculé. *Plant Physiol. Bioch.*, **27(2)**: 275-280

Alatou D. (1990). Recherches sur le déterminisme de la croissance rythmique du chêne : *Quercus pedunculata* Ehrh – *Quercus merbekii* Durieu – *Quercus suber* L. – Etude morphologique, biochimique et ecophysiologique. *Thèse de doctorat d'Etat en Sciences Naturelles ISN., Univ. Constantine*, 109p.

Alatou D., Aissani R. and Bousba D. (1995). Les composantes de la croissance de deux chênes méditerranéens. *Sciences et technologie*, **6**: 7-22

Alatou D., Younsi S., Chouiel M., Kanouni M. and Benderradji M.E. (2007). Essai de la régénération assistée du chêne-liège (*Quercus suber* L.) : par semis direct et par transplantation. *Annales de la Recherche Forestière en Algérie*, **13**: 48-63

Al-Khatib K. and Paulsen G.M. (1999). High-temperature effects on photosynthetic processes in temperate and tropical cereals. *Crop Sci.*, **39**: 119-125

Allakhverdiev S.I., Feyziev Y.M., Ahmed A., Hayashi H., Aliev J.A., Klimov V.V., Murata N. and Carpentier R. (1996). Stabilization of oxygen evolution and primary electron transport reactions in photosystem II against heat stress with glycinebetaine and sucrose. *J. Photochem. Photobiol.*, **34**: 149-157

Amamdier L. (2006). Synthèse : "Vers la conception d'un programme intégré de recherche pour promouvoir l'amélioration et la restauration des forêts de chêne liège et de chêne vert. Séminaire "Vitalité des peuplements de chêne liège et chêne vert : situation actuelle, état des connaissances et actions à entreprendre", 25-26 octobre, 2006, Evora, Portugal. WWF, 2006

Apel K. and Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **55**: 373-399

Aranda I., Pardos M., Puertolas J., Jimenez M.D. and Pardos J.A. (2007). Water use efficiency in cork oak (*Quercus suber*) is modified by interaction of water and light availabilities. *Tree physiology*, **27**: 671-677

- Artus N., Uemera M., Steponkus P.L., Gilmour S.J., Lin C. and Thomashow M.F. (1996).** Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 13404-13409
- Araus J.L., Slafer G.A., Reynolds M.P. and Royo C. (2002).** Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Ann. Bot.*, **89**: 925-940
- Asada K. (1999).** The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology Molecular Biology*, **50**: 601-639
- Aue H.L., Lecomte I., Gendraud. M. and Petel G. (1999).** Change in plasma membrane ATPase activity during dormancy release of vegetative peach-tree buds. *Physiol. Plant.*, **106**: 41-46
- Badawi M., Danyluk J., Boucho B., Houde M. and Sarhan F. (2007).** The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFS. *Molecular Genetics and Genomics.*, **277(5)**: 533-54
- Badawi M. (2008).** Fonctions génomiques de la famille des facteurs de transcription *ap2* chez les céréales. *Doctorat en Biologie, Université du Québec à Montréal*, 264p.
- Baker S.S., Wilhelm K.S. and Thomashow M.F. (1994).** The 5'-Region of *Arabidopsis-Thaliana* *Cor15a* Has Cis-Acting Elements That Confer Cold-Regulated, Drought-Regulated and Aba-Regulated Gene-Expression. *Plant Mol.Biol.*, **24**: 701-713
- Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.D., Tripp J., Weber C., Zcelinski D. and Von Koskull-Doring P. (2004).** Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.*, **29**: 471-487
- Barnola P., Crochet A., Pavan E., Gendraud M. and Lavarenne S. (1986).** Modification du métabolisme énergétique et de la perméabilité dans le bourgeon apical et l'axe sous-jacent au cours de l'arrêt de croissance momentané de jeunes plants de Chênes. *Physiologie végétale*, **24**: 307-314
- Barnola P., Alatou D., Parmentier C. and Vallon C. (1993).** Approche du déterminisme du rythme de croissance endogène des jeunes Chênes pédonculés par modulation de l'intensité lumineuse. *Annales des Sciences forestières*, 67-76
- Bartels D. and Sunkar R. (2005).** Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24**: 23-31
- Barnetts N.M. and Naylor A.W. (1966).** Amino acids and protein metabolism in bermuda during water stress. *Plant physiol.*, **41**: 1222-1230
- Bellinger Y. and Larher F. (1987).** Proline accumulation in higher plants: a redox buffer ? *Plant Physiology (Life Sci. Adv.)*, **6**: 23-27
- Berrahoumi N. and Regato P.(2008).** Les subéraies: l'univers cache du chêne liège IN Berrahoumi N., Escute X., Regato P. and Stein C. *l'univers du chêne, une ressource de richesse pour la nature et les hommes*, 8-14

- Bianchi G., Gamba A., Murelli C., Salamini F. and Bartels D. (1991).** Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant J.*, **1**: 355-365
- Blum A. and Ebercon A. (1980).** Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.*, **21**: 43-47
- Boehringer S.A. (1984).** Methods of enzymatic food analysis using single reagents". *Boehringer Mannheim GmbH*, 79p.
- Bohnert H.J., Nelson D.E. and Jensen R.G. (1995).** Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.*, **7**: 1099-1111
- Bolwell G., Bindschedler L., Blee K., Butt V., Davies D., Gardner S., Gerrish C. and Minibayeva F. (2002).** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, **53**: 1367-1376
- Bonhomme R., Rageau R., Richard J.P., Gendraud M. and Erez A. (1998).** Influence of temperature and photoperiod on dormant peach buds. Biological and biochemical approaches. *Acta Hortic.*, 539-547
- Boter M., Ruíz-Rivero O., Abdeen A. and Prat S. (2004).** Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. *Genes & Development*, **18**: 1577-1591
- Boudy P. (1955).** Economie forestière Nord Africaine, description forestière de l'Algérie et de la Tunisie T. IV, *Larose edit. Paris*, 483p.
- Bourion V., Lejeune-Hénaut I., Munier-Jolain N. and Salon C. (2003).** Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *Europ. J. Agronomy* **19**: 535-548.
- Bouzoubaa Z., El Mourid M. and El Gharous M. (2001).** Manuel d'analyse chimique et biochimique des plantes. *Ann. Sci. For. Eds., INRA Maroc*
- Bray E.A., Bailey-Serres J. and Weretilnyk E. (2000).** Responses to abiotic stresses. In : Gruissoon W., Buchannan B., Jones R. (eds) *Biochemistry and molecular biology of plant. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.* 1158-1249
- Breton, G., Ouellet, F., Danyluk, I. and Sarhan, F. (2000).** Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. *Biotechnology Annual Review.*, **6**: 57-100
- Bukhov N.G. and Mohanty P. (1999).** Elevated temperature stress effects on photosystems: characterization and evaluation of nature of heat induced impairments. In: Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis, *Eds. G.S. Singhal, G. Renger, S.K. Sopory, K-D. Irrang, Govindjee, New Delhi*, 617-648
- Chaitanya K.V., Sundar D. and Ramachandra Reddy A. (2001).** Mulberry leaf metabolism under high temperature stress. *Biologia Plantarum*, **44(3)**: 379-384
- Champ K.I., Febres V.J. and Moore G.A. (2007).** The role of CBF transcriptional activators in two *Citrus* species (*Poncirus* and *Citrus*) with contrasting levels of freezing tolerance. *Physiologia Plantarum*, **129**: 529-541

- Champagnat P., Barnola P. and Lavarenne S. (1986a).** Quelques modalités de la croissance rythmique endogène. *Naturalia monspeliensia n° hors série*, 279-302.
- Champagnat P., Payan E , Champagnat M., Barnola P., Lavarenne S. and Bertholon C. (1986b).** La croissance rythmique de jeunes chênes pédonculés cultivés en conditions contrôlées et uniformes. *Naturalia monspeliensia, n° hors série*, 303-337
- Carpenter, J. F., Crowe, J. H. and Arakawa, T. (1990).** Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in the frozen and dried states. *J. Dairy Sci.*, **73**: 3627-3636
- Cheng W.H., Endo A., Zhou L., Penney J. and Chen H.C. (2002).** A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *The Plant Cell*, **14**: 2723-2743
- Chini A., Grant J.J., Seki M., Shinozaki K. and Loake G.J. (2004).** Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, ADR1, requires salicylic acid, EDS1 and ABI1. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, **38**: 810-822
- Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B.H., Hong X., Agarwal M. and Zhu J.K. (2003).** ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **17**: 1043-1054
- Chinnusamy V., Schumaker K. and Zhu J.K. (2004).** Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.*, **55 (395)**: 225-236
- Chinnusamy V., Zhu J. and Zhu J.K. (2006).** Gene regulation during cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, **126(1)**: 52-61
- Chinnusamy V., Zhu J. And Zhu J.K. (2007).** Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.*, **12**: 444-451
- Côme D. (1992).** Les végétaux et le froid. Edit. *Hermann, éditeurs des sciences et des arts (Paris)*, 599p.
- Cook D., Fowler S., Fiehn O. and Thomashow M.F. (2004).** A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**: 15243-15248
- Cornic G., Badeck F-W., Ghashghaie J. and Manuel N. (1999).** Effect of temperature on net CO₂ uptake, stomatal conductance for CO₂ and quantum yield of photosystem II photochemistry of dehydrated pea leaves. In Sanchez-Dias M, Irigoyen JJ, Aguirreolea J, Pithan K (eds) crop development for cool and wet regions of Europe. *European community*, **92(828)**: 6947-6954
- Costa e Silva F., Shvaleva A., Broetto F., Ortuno M.F., Rodrigues M.L., Almeida M.H., Chaves M.M. and Pereira J.S. (2009).** Acclimation to short-term low temperatures in two *Eucalyptus globulus* clones with contrasting drought resistance. *Tree Physiol.*, **29**: 77-86
- Crabbé J. (1993).** La croissance rythmique des arbres, base de leur organisation temporelle. In : Groupe d'Etude de l'Arbre, « *Le rythme de croissance, base de l'organisation temporelle de l'arbre* ». Angers, 1-11

Crabbé, J. (1996). A new conceptual approach to bud dormancy in woody plants. In *Plant Dormancy: Physiology, biochemistry and molecular biology*, Ed. G.A. Lang. CAB international, Corvallis, Oregon, USA, 83-113

Christmann A., Moes D., Himmelbach A., Yang Y., Tang Y. and Grill E. (2006). Integration of abscisic acid signaling in to plant responses. *Plant Biology*, **8**: 314-325

Crowe, L.M., and Crowe, J.H. (1992). Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv Space Res.* **12(4)**: 239-47

Damesin C., Galera C., Rambal S. and Joffre R. (1996). Effects of elevated carbon dioxide on leaf gas exchange and growth of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings. *Ann. Sci. For.*, **53**: 461-467

Danyluk J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Benhamou N. and Sarhan F. (1998). Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *The Plant Cell*, **10**: 623-638

Darbyshire B. (1974). The function of the carbohydrate units of tree fungal enzymes in their resistance to dehydration. *Plant. Physiol.*, **54**: 717-721

Dat J., Vandenberghe S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D. and Van F. (2000). Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Scienc*, **57**: 779-795

Daugaard, M., Rohde, M., and Jaattela, M. (2007). The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS letters*, **581**: 3702-3710

David J.C. and Grongnet J.F. (2001). Les protéines de stress. *INRA Prod. Anim.*, **14(1)**: 29-40

Davis D L. and Gilbert W B. (1970). Winter hardiness and changes in soluble protein fractions of bermudagrass. *Crop Sci.*, **10**: 7-9

Decourteix M. (2005). Caractérisations physiologique et moléculaire de transporteurs de saccharose et d'hexoses de xylème de noyer (*Juglans regia* L. cv Franquette) : rôles dans les échanges latéraux de sucres pendant la période non-feuillée. *Doct. Univ. Blaise Pascal, France*, 208p.

Dejardin, A., Sokolov, L.N., and Kleczkowski, L.A. (1999). Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stress-responsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem. J.*, **344**: 503-509.

Delauney A.J. and Verma D.P.S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal*, **4**: 215-223

De le Rosa R., Rallo L. and Rapoport H. F. (2000). Olive floral bud growth and starch content during winter rest and spring budbreak. *Hortscience*, **35**: 1223-1227

De Ronde J.A., Cress W.A., Krüger G.H.J., Strasser, R.J. and Van Staden J. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis P5CR* gene, during heat and drought stress. *J. Plant. Physiol.*, **161**: 1211-1224

- Desikan R., Mackerness S.A.H., Hancock J.T. and Neill S.J. (2001).** Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.*, **127**: 159-172
- Dickson R.E. (1986).** Carbon and distribution in young populus trees. In: crown and canopy in relation to productivity. Edited by Fujimori and D. Whitehead, Ibaraki, Japan: 409-426
- Dionne J. (2001).** Protection hivernale et tolérance au froid du Pâturen Annuel *Pea ann. Plant J.*, **4**: 215-223
- Dörffling K. M., Abromeit U., Bradersen H. and Melz G. (1998).** Involvement of abscisic acid and proline in cold acclimation of winter wheat. In *plant cold hardiness. Li and Chen Ed. Pergamon Press, New York, 283-292*
- Eclerc J.C. (1999).** Ecophysiologie végétale. *Publication de l'université Saint Erime, 280p.*
- El Kayal W. (2004).** Réponse aux stress abiotiques chez *Eucalyptus gunnii* : analyse globale du transcriptome sur filtres haute-densité et caractérisation du gène Sxd1 (synthèse de la vitamine E). Doctorat d'Université. *Thèse de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, France, 260p.*
- EL kbiach M.L., A. Lamarti A., Abdali A. and Badoc A. (2002).** Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber* L.). Influence des cytokinines sur l'organogenèse et la callogenèse de noeuds de plantules. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, **141**: 73-88
- Elle D. and Sauter J.J. (2000).** Seasonal changes of activity of a starch granule bound endoamylase and of a starch phosphorylase in poplar wood (*Populus x canadensis* Moench "Robusta") and their possible regulation by temperature and phytohormones. *J. Plant Physiol.* **156**:731-740
- El Mourid M. (1988).** Performance of wheat and barley cultivars under different soil moisture regimes in semi arid region. *Ph.D. Iowa State University Ames USA, 229p.*
- Eltzner E.F. and Osswald W. (1994).** Mechanisms of oxygen activation during plant stress. *Proc. R. Soc. Edinb. B.* **102**: 131-154
- Farmer R.E. (1975).** Growth and assimilation rate of juvenile northern red oak: effect of light and temperature. *Forester Science*, **21**: 373-381
- Feitosa LC., J.Cambraia, MA.OlivoCano and HA. Ruiz. (2001).** Plant growth and solute accumulation and distribution in two sorghum genotypes under NaCl stress. *Braz.J.Plant. Physiol.*, **13**: 270-284
- Feller U., Crafts-Brandner S.J. and Salvucci M.E. (1998).** Moderately high temperatures inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco). Activase-mediated activation of Rubisco. *Plant Physiol.*, **116**: 539-546
- Flexas J. and Medrano H. (2002).** Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*, **89**: 183-189
- Fowler S.G. Cook D. and Thomashow M.F. (2005).** Low temperature induction of Arabidopsis *CBF1*, *2*, and *3* is gated by the circadian clock. *Plant Physiol.*, **137**: 361-368

- Foyer C.H., Lelandais M. and Kunert K.J. (1994).** Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.*, 696-706
- Foyer C.H., Vanacker H., Gomez L.D. and Harbinson J. (2002).** Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiology and Biochemistry*, **40**: 659-668
- Galiba G. (1994).** In vitro adaptation for drought and cold hardiness in wheat. *Plant Breeding Reviews*, **12**: 115-162
- Gamboa M.C., Rasmussen-Poblete S., Valenzuela P.D. and Krauskopf E. (2007).** Isolation and characterization of a cDNA encoding a CBF transcription factor from *E. globulus*. *Plant Physiol Biochem*, **45**: 1-5
- Gebre G.M., Kuhns M.R. and Brandle J.R. (1994).** Organic solute accumulation and dehydration tolerance in 3 water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiol.*, **14**: 575-587
- Gebre G.M. and Tschaplinski T.J. (2002).** Solute accumulation of chestnut oak and dogwood leaves in response to throughfall manipulation of an upland oak forest. *Tree Physiol.*, **22**: 251-260
- Ghoul H., Montpied P., Epron D., Ksontini M., Hanchi B. and Dreyer E. (2003).** Thermal optima of photosynthetic function and thermostability of photochemistry in cork oak seedlings. *Tree physiology*, **23**: 1031-1039.
- Gibson S., Avondel V., Iba K. and Sommerville C. (1994).** Cloning of a temperature regulated gene encoding a chloroplast omega 3-desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 206: 1615-1621
- Gilmour S.J., Zarka D.G., Stockinger E.J., Salazar M.P., Houghton J.M. and Thomashow M.F. (1998).** Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *The Plant Journal*, **16**: 433-442
- Gilmour S.J., Sebolt A.M., Salazar M.P., Everard J.D. and Thomashow M.F. (2000).** Overexpression of the *Arabidopsis* *CBF3* transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology*, **124**:1854-1865
- Gilmour S.J., Fowler S.G. and Thomashow M.F. (2004).** *Arabidopsis* transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol. Biol.*, **54**: 767-781
- Gleeson D., Lelu-Walter M. A. and Parkinson M. (2004).** Influence of exogenous L-proline on embryogenic cultures of larch (*Larix leptoeuropaea* Dengler), sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) (Carr) and oak (*Quercus robur* L.) subjected to cold and salt stress. *Annals of Forest Science*, **61**: 125-128
- Gleeson D., Lelu-Walter M.A. and Parkinson M. (2005).** Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost. *Molecular Breeding*, **15**: 21-29
- Gómez L., Allona I., Ramos A., Núñez P., Ibáñez C., Casado R. and Aragoncillo C. (2005).**

- Molecular responses to thermal stress in woody plants. *Invest Agrar: Sist. Recur. For.*, **14(3)**: 307-317
- Gong Z., Lee H., Xiong L., Jagendorf A., Stevenson B. and Zhu J.K. (2002).** RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc Natl Ac Sci USA*, **99**: 11507-11512
- Gonugunta V.K., Srivastava N., Puli M.R. and Raghavendra A.S. (2008).** Nitric oxide production occurs after cytosolic alkalinization during stomatal closure induced by abscisic acid. *Plant Cell and Environment*, **31**: 1717-1724
- Gonugunta V.K., Srivastava N. and Raghavendra A.S. (2009).** Cytosolic alkalinization is a common and early messenger preceding the production of ROS and NO during stomatal closure by variable signals, including abscisic acid, methyl jasmonate and chitosan. *Plant Signaling and Behavior*, **4**: 561-564
- Greenway H. and Munns R. (1980).** Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Ann. Rev. Plat. Physio.*, **31**: 149-190
- Guibert M. and Le Pichon C. (2001).** Influence de la température sur la germination, la levée et sur les taux de semis à tiges multiples chez le chêne sessile. *Revue Forestière Française LIII*, 44-54
- Guissé B., Srivastava A. and Strasser R.J. (1995).** The polyphasic rise of the chlorophyll a fluorescence (OKJIP) in heat-stressed leaves. *Archs. Sci. Genève*, **48**: 147-160
- Gusta L.V., Wilen R.W. and Fu P. (1996).** Low temperature stress tolerance: The role of abscisic acid, sugars and heat stable proteins. *Hort Science*, **31**: 39-46
- Haake V., Cook D., Riechmann J.L., Pineda O., Thomashow M.F. and Zhang J.Z. (2002).** Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **130**: 639-648
- Haldimann P. (1999).** How do changes in temperature during growth affect leaf pigment composition and photosynthesis in *Zea mays* genotypes differing in sensitivity to low temperature? *Journal of Experimental Botany*, **50**: 543-550
- Haldimann P. and Feller U. (2004).** Inhibition of photosynthesis by high temperature in oak (*Quercus suber* L.) leaves grown under naturel condition correlates with a reversible heat dependent reduction of the activation state of ribulose-1, 5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant, cell and environment*, **27**: 1169-1183
- Halle F. and Martin R. (1968).** Etude de la croissance rythmique de l'Hévéa (*Hevea brasiliensis* Müll. arg. Euphorbiacées Crotonoïdées). *Adansonia sér*, **28**: 475-503
- Hammond-Kosack K.E. and Jones J.D.C. (1996).** Resistance gene-dependent plant defence response. *Plant Cell*, **8**:1773-1791
- Hammond-Kosack K. and Parker J. (2003).** Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**: 177-193

- Hannah M.A., Wiese D., Freund S., Fiehn O., Heyer A.G. and Hinch D.K. (2006).** Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **142**: 98-112
- Hanson P. J., Dickson R.F., Isebrands J.G., Grow T.R. and Dixon R.K. (1986).** A morphological index of *Quercus* seedlings ontogeny for use in studies of physiological and growth. *Tree Physiol*. **2**: 273-281
- Hanson P.J., Isebrands J.G., Dickson R.F. and Dixon R.K. (1988).** Ontogeny patterns of CO₂ exchange of *Quercus rubra* L. Leaves during three flushes of shoot growth. Insertion gradients of leaf photosynthesis. *For. Sci.*, **34(1)**: 69-76
- Hare P.D., Cress W.A. and Van Staden J. (1998).** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.*, **21**: 535-553
- Hara M., Terashima S. and Kuboi T. (2001).** Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *J. Plant Physiol*, **158**: 1333-1339
- Hare P.D. and Cress W.A. (1997).** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.*, **21**: 79-102
- Hare P.D., Cress W.A. and Van Staden J. (1999).** Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J. Exp. Bot.*, **50**: 413-434
- Harfouche A., Bekkar H., Belhou O. and Graine M. (2003).** Quelques résultats à l'état juvénile sur la variabilité géographique du chêne liège (*Quercus suber* L.) et stratégie d'amélioration génétique. *Ann. Rec. For. Algérie*, 37-50
- Harmon A.C., Gribskov M., Gubrium E., Harper J.F. (2001).** The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, **151**: 175-183
- Hasegawa R.A., Bressan J.K., Zhu H. and Bohnert J., (2000).** Plant cellular and molecular responses to high salinity, *Annu Rev Plant Physiol, Plant Mol Biol*, **51**: 463-499
- Havaux, M. (1993).** La fluorescence de la chlorophylle in vivo: Quelques concepts appliqués à l'étude de la résistance de photosynthèse aux contraintes de l'environnement. Dans : Tolérance à la Sécheresse des Céréales en Zone Méditerranéenne. Diversité Génétique et Amélioration Variétale, Montpellier (France), 15-17 décembre 1992. *Les Colloques de l'INRA*, **64**: 19-29
- Heller R., Esnault R. AND Lance C. (1998).** Physiologie Végétale, I Nutrition., 6^e Edition de l'Abrégé., Imprimerie Dunod, Paris, 323p.
- Himmelbach A., Yang Y. and Grill E. (2003).** Relay and control of abscissic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**: 470-479
- Hong-Bo S., Li-Ye C., Ming-An S. (2008).** Calcium as a versatile plant signal transducer under soil water stress. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, **30**: 634-641
- Hopkins W. G. (2003).** Physiologie végétale. 2^{ème} édition, 460-464
- Houde M., Daniel C., Lachapelle M. Allard F., Laliberté S. and Sarhan F. (1995).** Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. *Plant. J.*, **8**: 583-593

Hubbard K.E., Nishimura N., Hitomi K., Getzoff E.D. and Schroeder J.I. (2010). Early signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes and Development*, **24**: 1695-1708

Hundertmark M. and Hinch D.K. (2008). LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, **9**: 118-125

Hurry V., Strand A., Furbank R. and Stitt M. (2000). The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant J.*, **24(3)**: 383-396

Hrabak E. (2000). Calcium-dependent protein kinase and their relatives. *Advances in Plant Pathology*, **32**: 185-223

Ighil Hariz Z. (1990). Etude du comportement physiologique, biochimique et structurale du *Retama retam* vis à vis du NaCl. *Thèse de Magister, Université d'Oran Algérie*, 120 p.

Jaglo-Ottosen K.R., Gilmour S.I., Zarka D.G., Schabenberger O. and Thomashow M.F. (1998). *Arabidopsis* CBF 1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, **280 (5360)**: 104-6

Jiang C.D., Jiang G.M., Wang X., Li L.H., Biswas D.K and Li Y.G. (2006). Enhanced photosystem 2 thermostability during leaf growth of elm (*Ulmus pumila*) seedlings. *Photosynthetica*, **44**: 411-418

Joosen R., Cordewener J., Supena E., Vorst O., Lammers M., Maliepaard C., Zeilmaker T., Miki B., America T., Custers J. and Boutilier K. (2007). Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, **144**:155-172

Kampinga H.H., Hageman J., Vos M.J., Kubota H., Tangua, R.M., Brufor, E.A., Cheetham M.E., Chen B. and Hightower L.E. (2009). Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell stress & chaperones*, **14**: 105-111

Kavi Kishor P.B., Hong Z., Miao G.H., Hu C.A.A. and Verma D.P.S. (1995). Overexpression of proline -5- carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants". *Physiol.*, **108**: 1387-1394

Keller G. (2006). Analyse du transcriptome de l'*Eucalyptus* pendant l'acclimatation au froid. Recherche de gènes candidats de la tolérance au gel. *Doct. Uni. Paul Sabatier, Toulouse, France*, 208p.

Keller G., Marchal T., San Clemente H., Navarro M., Ladouce N., Wincker P., Couloux A., Teulieres C. and Marque C. (2009). Development and functional annotation of an 11,303-EST collection from *Eucalyptus* for studies of cold tolerance. *Tree Genetics & Genomes*, **5**: 317-327.

Kim T.H., Böhmer M., Hu H., Nishimura N. and Schroeder J.I. (2010). Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂ and Ca²⁺ signaling. *Annual Review of Plant Biology*, **61**: 561-591

- Kingston-Smith A.H., Galtier N., Pollock C.J. and 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 Phytologist*, **139**: 283-292
- Knight H. (2000).** Calcium signalling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol*, **195**: 269-325
- Knight H. and Knight M.R. (2001).** Abiotic stress signalling pathways: specificity and crosstalk. *Trends Plant Sci.*, **6**: 262-67
- Knu C.G. and Chen H.M. (1986).** Effect of high temperature on proline content in tomato floral buds and leaves. *Sci. Hortic*, **111(5)**: 746-750
- Kocsy G., Galiba G. and Brunold C. (2001).** Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum*, **113**: 158-164
- Kovacs D., Kalmar E., Torok Z. and Tompa P. (2008).** Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol*, **147**: 381-390
- Konstantinova T., Parvanova D., Atanassov A. and Djilianov D. (2002).** Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectants. *Plant Sci*, **163**: 157-164
- Kreps J.A., Wu Y.J., Chang H.S., Zhu T., Wang X. and Harper J.F. (2002).** Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol.*, **130**: 2129-2141
- Kunst A., Draeger B. and Ziegenhorn J. (1984).** Carbohydrates, U.V. methods with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *HU Bergmeyer, ed, Methods in Enzymatic Analysis: Metabolites, Ed 3, Vol VI. Verlag Chemie, Basel*, 162-172
- Kushiro T., Okamoto M., Nabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiha T., Kamiya Y. and Nambara E. (2004).** The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO journal*, **23**: 1647-1656
- Lamb C.J. and Dixon R.A. (1997).** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**: 251-275
- Lamey A. (1993).** Le chêne-liège - sa culture et son exploitation, Paris, Berger-Levrault éditeur, 289 p.
- Langridge P., Paltridge N. and Fincher G. (2006).** Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, **4(4)**: 343-354
- Lanneau D., Brunet M., Frison E., Solary E., Fontenay M. and Garrido C. (2008).** Heat shock proteins: *Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. J. Cell. Mol. Med.*, **12**: 743-761
- Lavarenne S., Champagnat P. and Barnola P. (1971).** Croissance rythmiques de quelques végétaux ligneux de régions tempérées cultivés en chambres climatisées à température élevée et constante et sous diverses photopériodes. *Bull. Soc. Bot. Fr*, **118**: 131-162

- Lavarenne S., Champagnat P. and Barnola P. (1975).** Influence d'une même gamme de températures sur l'entrée et la sortie de dormance des bourgeons de frêne (*Fraxinus excelsior* L.). *Physiologie Végétale*, **13**: 215-224
- Leal I., Misra S., Attree S.M. and Fowke L.C. (2003).** Effect of abscissic acid, osmoticum and desiccation on 11S storage protein gene expression in somatic embryos of white spruce. *Plant Sci.*, **106**: 121-128
- Leborgne N., Teulières C., Cauvin B., Travert S. and Boudet A.M. (1995a).** Carbohydrate content of *Eucalyptus gunnii* leaves along an annual cycle in the field and during frosthardenning in controlled conditions. *Trees Struct Func*, **10**: 86-93
- Leborgne N., Teulières C., Travert S., Rols M.P., Teissie J. and Boudet A.M. (1995b).** Introduction of specific carbohydrates into *Eucalyptus gunnii* cells increases their freezing tolerance. *Europ J Biochem*, **229**: 710-717
- Lee J.H. and Schöffl F. (1996).** An Hsp70 antisense gene affects the expression of Hsp70/Hsc70, the regulation of HSF and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, **252**: 11-19
- Lee H., Xiong L., Gong Z., Ishitani M., Stevenson B. and Zhu J.K. (2001).** The Arabidopsis HOS1 gene negatively regulates cold signaling transduction and encodes a RING finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes Dev.*, **15**: 912-924
- Lee K.H., Piao H.L., Kim H.Y., Choi S.M. and Jiang F. (2006).** Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscissic acid. *Cell*, **126**: 109-120
- Léger A. (2010).** Analyse fonctionnelle d'AtMYB30, un régulateur transcriptionnel impliqué dans la mort cellulaire hypersensible chez *Arabidopsis thaliana*. Doc.Univ., *Université III - Paul Sabatier, Toulouse* 302 p.
- Leonards E.D., Tsujita M.J., and Grodzinski B. (1996).** The effect of source or sink temperature on photosynthesis and ¹⁴C partitioning in and export from a source leaf of *Alstroemeria*. *Physiol. Plant.*, **97**: 563-575
- Leung J. and Giraudat J. (1998).** Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, **49**: 199-222
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (1998).** Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**: 1391-1406
- Liu X., Yue Y., Li B., Nie Y. and Li W. (2007).** A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscissic acid. *Science (New York, NY)*, **315**: 1712-1726
- Lobell D.B. and Asner G.P. (2003).** Climate and Management Contributions to Recent Trends in U.S. Agricultural Yields. *Science*, **299**: 999-1032

- Lopes S., Maroto J. V., Bautista A. S., Pascual B. and Alagarda J. (2002).** Differences in carbohydrate content of waiting-bed strawberry plants during development in the nursery. *Scientia Horticulturae*, **94**: 53-62
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol., Chem.* 193: 265-275
- Magnan F., Ranty B., Charpentreau M., Sotta B. and Galaud J.P. (2008).** Mutations in AtCML9, a calmodulinlike protein from in “*Arabidopsis thaliana*”, alter plant responses to abiotic stress and abscisic acid. *The Plant Journal*, 999-1007
- Maillard P., Jacques M., Miginiac E. and Jacques R. (1987).** Croissance de jeunes *Terminalia superba* en conditions contrôlées. *Ann. Sci. For.*, **44(1)**: 67-84.
- Maraschin S., Caspers M., Potokina E., Wulfert F., Graner A., Spaink H. and Wang M. (2006).** cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. *Physiologia Plantarum*, **127(4)**: 535-550
- Margot P. (2006).** Du chêne-liège au bouchon, "Partie 1 : Histoire et géographie", *Cepdivin.org*, <http://www.cepdivin.org/articles/phmargot015/01.html>
- Marguery P. (1992).** Contribution à l'étude et à l'amélioration de la croissance du fruit chez le pommier (*Malus domestica* Dork. cv Golden delicious). *Thèse de doctorat, Université d'Amiens*, 177 p.
- Marquat C., Vandamme M., Gendraud M. and Pétel G. (1999).** Dormancy in vegetative buds of peach: relation between carbohydrate absorption potentials and carbohydrate concentration in the bud during dormancy and its release. *Scientia Horticulturae*, **79**: 151-162
- Maruyama K., Sakuma Y., Kasuga M., Ito Y., Seki M., Goda H., Shimada Y., Yoshida S., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2004).** Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.*, **38**: 982-993
- Masakazu Hara Y.S., Yasutaka T. and Kuboi T. (2009).** DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. *Plant Cell Env.*, 233-240
- Mauguet J C. (1978).** Influence d'une ablation totale du feuillage sur l'entrée en dormance de Noyer (*Juglans regia* L.). *C.R. Acad. Sci.*, **286**: 745-748
- Maurel K., Leite G.B., Bonhomme M., Guilliot A., Rageau R., Petel G., Sakr S. (2004).** Trophic control of bud break in peach (*Prunus persica*) trees: a possible role of hexoses. *Tree Physiol.*, **24**: 579-588
- Mazher A.M. Azza, El Quesni F.E.M. and Farahat M.M. (2007).** Responses of ornamental plants and woody trees to salinity. *Wood J. Agri. Sci*, **3(3)**: 386-395
- McKenzie. J.S. R. Paquin R. and Duke S.H. (1988).** Cold and heat tolerance. In : Hanson,A.A., Barnes, D.K., and Hill, R.R. , Jr eds Alfafa and alfafa irmpovement. Agronomy monograph., **29**: 259.302

- McKown R., Kuroki G. and Warren G. (1996).** Cold responses of Arabidopsis mutants impaired in freezing tolerance. *Journal of Experimental Botany*, **47**:1919-1925
- Menoud M.A. (1992).** Evolution de l'état physiologique de plants de *Rosa Hybrida* L., au cours du stockage au froid. Influence d'une taille estivale. *Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand*, 161p.
- Merchant A. and Adams M.A. (2005).** Stable osmotica in *Eucalyptus spathulata* - responses to salt and water deficit stress. *Functional Plant Biology*, **32**: 797-805
- Merchant A., Adams M.A., Richter A. and Popp M. (2006).** A metabolite approach provides functional links among eucalypt taxonomy, physiology and evolution". *Phytochemistry*, **67**: 402-408
- Merchant A., Richter A., Popp M. and Adams M.A. (2006a).** Targeted metabolic proling provides a functional link among eucalypt taxonomy, physiology and evolution. *Phytochemistry*, **67**: 402- 408
- Merchant A. and Ladiges P.Y. (2007).** Quercitols links the physiology, taxonomy and evolution of 279 eucalypt species. *Global Ecology and Biogeography*, **16**: 810-819
- Merouani H., Branco C., Almeida M.H. and Pereira J.S. (2001).** Effects of acorn storage duration and parental tree on emergence and physiological status of Cork oak(*Quercus suber* L.) seedlings. *Ann. For. Sci.*, **58**: 543-554.
- Meskiene I. and Hirt, H. (2000).** MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell. *Plant Mol. Biol.*, **42**: 791-806
- Miller A.K., Galiba G., and Dubcovsky J. (2005).** A cluster of II CBF transcription factors is located at the frost tolerance locus FR-Am2 in *Triticum monococcum*. *Mol Gen Genomics*, **275**: 193-203
- Millet B. (1987).** Les rythmes dans le monde végétal. In : le développement des végétaux, aspects théoriques et synthétiques. *Collectioo Biologie théorique 2 par G. Chauvet et H. Le Guyader, Ed. Masson (2)*: 231-243
- Mittler R.(2002).** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7(9)**: 405-410
- Moing A, Gaudillere JP. (1992).** Carbon and nitrogen partitioning in peach/plum grafts. *Tree Physiology*, **10**: 81-92
- Mori I.C., Murata Y., Yang Y., Munemasa S. and Wang Y.F. (2006).** CDPKs CPK6 and CPK3 function in ABA regulation of guard cell S-type anion- and Ca⁽²⁺⁾-permeable channels and stomatal closure *PLoS. Biology*, **4**: 327-334
- Muñoz-Amatriáin M., Svensson J., Castillo A., Cistué L., Close T. and Valles M. (2006).** Transcriptome analysis of barley anthers: effect of mannitol treatment on microspore embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, **127**: 551-560
- Murata N. and Los D.A. (1997).** Membrane fluidity and temperature perception. *Plant Physiol.* **115**: 875-879.

- Najeh A. (2010).** Croissance et productivité des forêts de chêne liège en Tunisie, vulnérabilité aux changements climatiques. *Thèse, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie*, 165p.
- Nambara E. and Marion-Poll A. (2005).** Abscisic acid biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, **56**: 165-185
- Nanjo T., Kobayashi M., Yoshiba Y., Sanada Y. and Wada K. (1999).** Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal :For Cell and Molecular Biology*, **18** : 185-93
- Nanjo T., Fujita M., Seki M., Kato T., Tabata S. and Shinozaki K (2003).** Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol*, **44**: 541-548
- Neill S.J., Desikan R., Clarke A. and Hancock J.T. (2002).** Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, **128**: 13-16
- Nelson E.A. and Dickson R.E. (1981).** Accumulation of food reserves in cottonwood stems during dormancy induction. *Can. J. Forest Res.*, **11**: 45-154
- Netting A. (2002).** pH, abscisic acid and the integration of metabolism in plants under stressed and non-stressed conditions. II. Modifications in modes of metabolism induced by variation in the tension on the water column and by stress. *Journal of Experimental Botany*, **53(367)**:151-173
- Nguyen A. and Lamant A. (1988).** Pinitol and myo-inositol accumulation in water stressed seedlings of maritime pine. *Phytochemistry*, **27**: 3423-3427
- Nsibi R., Souayha N. Khouia L.M. and Bouzid S. (2006).** La régénération naturelle par semis de la suberaie de Tabarka - Aïn Draham face aux facteurs écologiques et anthropiques. *Geo-Eco-Trop*, **30(1)**: 35-48
- Orthen B. and Popp M. (2000).** Cyclitols as cryoprotectants for spinach and chickpea thylakoids. *Environmental and Experimental Botany*, **44**: 125-132
- Örvar B.L., Sangwan V., Omann F. and Dhindsa R.S. (2000).** Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant J*, **23**: 785-794
- Oukarroum A. (2007).** Vitalité des plantes d'orge (*Hordeum vulgare* L.) en conditions de stress hydrique et thermique analysée par la fluorescence chlorophyllienne. *Doct.Uni. Genève* 196p.
- Owens J.N. and Molder M. (1979).** Bud development in *Larix occidentalis* .I. Growth and development of vegetative long shoot vegetative short shoot buds. *Can. J. Bot.*, **57(7)**: 687-700
- Ozturk N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C., Galbraith D., Gozukirmizi N., Tuberosa R. and Bohnert H. (2002).** Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology*, **48**: 551-573
- Pália T., Garab G., Horváth L.I. and Kóta Z. (2003).** Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cell. Mol. Life Sci.*, **60**: 1591-1606

- Papageorgiou G.C. and Murata N. (1995).** The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynth. Res.*, **44**: 243-252
- Parisot E. (1985).** Etude de la croissance rythmique chez de jeunes manguiers (*Mangifera indica* L.). *Thèse Doc. Univ. Clermont II*, 156p.
- Park S.Y., Fung P. and Nishimura N. (2009).** Abscisic acid inhibits type 2c protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, **324**: 1068-1071
- Parmentier C. (1993).** Etude physiologique et biochimique de la croissance rythmique endogène du chêne pédonculé. Recherche de son déterminisme. *Thèse doct. Uni. Nancy I*, 88 p.
- Paquin R. and Pellitier G. (1981).** Acclimatation naturelle de la luzerne (*Medicago media* pres.) au froid. I. Variation de la teneur en proline libre de feuilles et des collets. *Physiol. Vég.*, **19**: 103-117
- Paquin R. (1986).** Effet de l'humidité du sol sur la teneur en proline libre et des sucres totaux de la luzerne endurcie au froid et à la sécheresse. *Can.J.Plant Science*, **66**: 95-101
- Pasini L., Bruschini S., Bertoli A., Mazza R., Fracheboud Y. and Marocco A. (2005).** Photosynthetic performance of cold-sensitive mutants of maize at low temperature. *Physiologia Plantarum*, **124**: 362-370.
- Passarinho J.A.P, Lamosa P., Baeta J.P., Santos H. and Ricardo C.P.P. (2006).** Annual changes in the concentration of minerals and organic compounds of *Quercus suber* leaves. *Physiologia Plantarum*, **127**: 100-110
- Paul M.J. and Cockburn W. (1989).** Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Journal of Experimental Botany*, **40**: 1093-1098
- Payan E. (1982).** Contribution à l'étude de la croissance rythmique chez de jeunes Chênes pédonculés (*Quercus pedunculata* Ehrh.). *Thèse de Doctorat. Université Blaise Pascal*, 102 p.
- Pearce R. S. (1999).** Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation*, **29**: 47-76.
- Pei Z., Murata Y., Benning G., Thomine S., Klusener B., Allen G., Grill E. and Schroeder J. (2000).** Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, **406**: 731-734
- Plieth C. (2001).** Plant calcium signalling and monitoring: pros and cons and recent experimental approaches. *Protoplasma*, **218**: 1-23
- Polle A. (2001).** Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.*, **126**: 445-462
- Popp M., Lied W., Bierbaum U., Gross M., Grosse-Schulte T., Hams S., Oldenettel J., Schuler S. and Wiese J. (1997).** Cyclitols – stable osmotica in trees. In *Trees - Contributions to Modern Tree Physiology* (eds H. Rennenberg, W. Eschrich and H. Ziegler), 257-270

- Prewein C., Vagner M. and Wilhelm E. (2004).** Changes in water status and proline and abscissic acid concentrations in developing somatic embryos of pedunculata oak (*Quercus robur*) during maturation and germination. *Tree physiology*, **24**: 1251-1257
- Puértolas J., Marta Pardos M., Jiménez M.D., Aranda I. and Pardos J.A. (2008).** Interactive responses of *Quercus suber* L. seedlings to light and mild water stress: effects on morphology and gas exchange traits. *Ann. For. Sci.*, **65**: 611-620.
- Puli M.R. and Raghavendra A.S. (2011).** Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*, 1-8
- Qin F., Sakuma Y., Tran L.S.P., Maruyama K. and Kidokoro S. (2008).** Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. *The Plant Cell*, **20**: 1693-707
- Quien Y.L., Wilhelm S.J. and Marcum K.B. (2001).** Comparative responses of two kentucky bluegrass Cultivars to Salinity Stress. *Crop Science*, **41**: 1895-1900
- Rached-Kanouni, M. and Alatou, D. (2005).** Evolution des sucres solubles dans des feuilles des semis de chêne-liège (*Quercus suber* L.) ”. 1er colloque Euro-Méditerranéen en Biologie Végétale & Environnement, 30-31
- Rached-Kanouni M., Alatou D. and Sakr S. (2012).** Responses of Cork oak seedlings to short-term exposures to low temperatures. *American Journal of Scientific Research*, **59**: 28-41
- Rached-Kanouni M., Alatou D. and Sakr S. (2012).** Effets des hautes températures sur le chêne liège. *European Journal of Scientific Research*, **74(3)**: 370-380
- Raghavendra A.S., Gonugunta V.K., Christmann A. and Grill E. (2010).** ABA perception and signaling. *Trends in Plant Science*, **15**: 395-401
- Raynal-Lacroix C., Bardet, A. and Freixinos, E. (1999).** Fraisier - La fertilisation azotée. *Infos-Ctifl*, **149**: 56-67
- Rego F.C. (2006).** Les causes du dépérissement des chênes lièges et chênes verts Séminaire « Vitalité des peuplements de chênes lièges et de chênes verts ». *Nouvelles des forêts méditerranéennes*, **4**: 1-12
- Reyes J.L., Rodrigo M.J., Colmenero-Flores J.M., Gil J.V., Garay-Arroyo A., Campos F., Salamini F., Bartels D., Covarrubias A.A. (2005).** Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Env*, **28**: 709-718
- Robert F., Gendraud M. and Petel, G. (1999a).** Using intracellular pH to evaluate growth inhibition of strawberry plants. *Plant Physiol. Biochem*, **37 (2)**: 155-160
- Roeder V. (2006).** Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune *Laminaria digitata*. Thèse. *Doc. Univ. Pierre et Marie Curie (Paris VI)* 264p.
- Saijo Y., Hata S., Kyojuka J., Shimamoto, K. and Izui K. (2000).** Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.*, **23**: 319-327

- Saito S., Hirai N., Matsumoto C., Ohigashi H., Ohta D., Sakata K. and Mizutami M. (2004).** Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology*, **29**: 175-186
- Sakai A. and Yoshida S. (1968).** The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. *Cryobiology*, **5**:160-174
- Sakai A. and Larcher W. (1997).** Frost survival of plants-Responses and Adaptation to Freezing Stress". *Ecol. Studies* 62, *Spring-Verlag (eds)*, 112-133
- Sakr S., Alves G., Morillon R., Maurel K., Decourteix M., Guillot A., Fleurat-Lessard P., Julien J.L. and Chrispeels M. (2003).** Plasma membrane aquaporins are involved in winter embolism recovery in walnut tree. *Plant Physiology*, **133**: 630-641
- Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H. and Shinozaki K. (2002).** DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **290**: 998-1009
- Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F. and Seki M. (2006a).** Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *The Plant Cell*, **18**: 1292-309
- Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2006b).** Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell*, **18**: 1292-1309
- Sanders D., Brownlee C. and Harper J.F. (1999).** Communicating with calcium. *Plant Cell*, **11**: 691-706
- Sauter J.J. (1967).** Der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Reservestärke in parenchymatischen Geweben von Baumsprossachsen. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, **56**: 340-352
- Sauter J.J. (1988).** Temperature induced changes in starch and sugars in the stem of *Populus x canadensis* "robusta". *J. Plant Physiol.*, **132**: 608-612
- Sauter J.J. (1988a).** Seasonal changes in efflux of sugars from parenchyma cells into the apoplast in poplar stems (*Populus x canadensis* « robusta »). *Trees*, **2**: 242-249
- Sauter J.J., (1988b).** Temperature induced changes in starch and sugars in stems of *Populus x Canadensis* "robusta". *J Plant Physiol* **132**: 608-612
- Sauter J.J. and Van Cleve B. (1991).** Biochemical and ultrastructural results during starch-sugar conversion in ray parenchyma cells of *Populus* during cold adaptation. *J. Plant Physiol.*, **139**: 19-26
- Sauter J.J., Elle D. and Witt W. (1998).** A starch granule bound endoamylase and its possible role during cold acclimation of parenchyma cells in poplar wood (*Populus x Canadensis* Moench "robusta"). *J. Plant Physiol.*, **153**:739-744

- Sauter J.J. and Ambrosius T. (1986).** Changes in the partitioning of carbohydrates in the wood during bud break in *Betula pendula* Roth. *J. Plant Physiol.*, **124**: 31-43
- Savoure A., Joaua S., Hua X.- J., Ardiles W., Van Montagu M. and Verbruggen N. (1995).** Isolation, characterisation and chromosomal location of a gene encoding the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters*, **372**: 13-19
- Schwab K.B., and Gaff D.F. (1986).** Sugar and ion contents in leaf tissues of several drought tolerant plants under water stress. *J. Plant Physiol.*, **125**: 257-265
- Seigue A. (1985).** La forêt circumméditerranéenne et ses problèmes. *Maisonneuve et Larose, France*, 67-81
- Seki M., Ishida J., Narusaka M., Fujita M., Nanjo T., Umezawa T., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y., Shinozaki K. (2002).** Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics*, **2**: 282-291
- Sivaramakrishnan S., Pattel V., Flower G. and Paleg L.G. (1988).** Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mid season drought stress. *Plant Physiol.* **74**: 418-426
- Smirnoff N. (1993).** The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. *New Phytol.*, **125**: 27-58
- Sleigh P. A. Collin H. A. and Hardwick K. (1984).** Distribution of assimilate during the flush cycle of growth in *Theobroma cacao* L. *Plant Growth Regulation*, **2**: 381-391
- Souren J.E., Wiegant F.A. and Van wijk R. (1999).** The role of hsp70 in protection and repair of luciferase activity in vivo; experimental data and mathematical modelling. *Cell Mol. Life Sci.*, **55**: 799-811
- Stitt M. and Hurry V. (2002).** A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*". *Current Opinion in Plant Biology*, **5**: 199-206
- Stockinger E.J., Gilmour S.J. and Thomashow M.F. (1997).** *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cisacting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **94**: 1035-1040
- Strand A., Hurry V., Henkes S., Huner N., Gustafson P., Gardeström P. and Stitt M. (1999).** Acclimation of *Arabidopsis* leaves developing at low temperatures. Increasing cytoplasmic volume accompanies increased activities of enzymes in calvin cycle and in the sucrose-biosynthesis pathway. *Plant Physiol.*, **119**: 1387-1397
- Strand A., Foyer C.H., Gustafson P. and Hurry, V. (2003).** Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environnement*, **26**: 523-535

Suhita D., Raghavendra A.S., Kwak J.M. and Vavasseur A. (2004). Cytoplasmic alkalization precedes reactive oxygen species production during methyl jasmonate- and abscisic acid-induced stomatal closure. *Plant Physiology*, **134**: 1536-1545

Sung D.Y., Vierling E. and Guy C.L. (2001). Comprehensive expression profile analysis of the Arabidopsis Hsp 70 gene family. *Plant Physiol.*, **126**: 789-800

Sung D.Y., Kaplan F., Lee K.J. and Guy C.L. (2003). Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science*, **8**: 179-187

Talame V., Ozturk N., Bohnert H. and Tuberosa R. (2007). Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany*, **58(2)**: 229-240

Teige, M., Scheikl E., Euglem T., Dodzi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L. and Hirt H. (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell*, **15**: 141-152

Teulière C., Feuillet C. and Boudet A.M. (1989). Differential characteristics of cell suspension cultures initiated from *Eucalyptus gunnii* clones differing by their frost tolerance. *Plant Cell Reports*, 8-15

Teulière C. (1990). Obtention et exploitation de systèmes simplifiés (cellules, protoplastes) chez le genre *Eucalyptus* en vue de l'étude de l'amélioration de la résistance au froid. *Mémoire d'HDR de l'Université Paul Sabatier, Toulouse*, 230p.

Teulière C., Bossinger G., Moran G. and Marque C. (2007). Stress studies in *Eucalyptus*. *Plant Stress 1*: 197-215

Teulière C. and Marque C. (2009). Development and functional annotation of an 11,303-EST collection from *Eucalyptus* for studies of cold tolerance. *Tree Genetics & Genomes*, **5**: 317-327

Thomas F.M., Meyer G. and Popp M. (2004). Effects of defoliation on the frost hardiness and the concentrations of soluble sugars and cyclitols in the bark tissue of pedunculate oak (*Quercus robur* L.). *Ann. For. Sci.*, **61**: 455-463

Thomashow M.F. (1999). Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 571-599

Thomashow M.F. (2001). So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol.*, **125**: 89-93

Tompa P., Banki P., Bokor M., Kamasa P., Kovacs D., Lasanda G. and Tompa K. (2006). Protein-water and protein-buffer interactions in the aqueous solution of an intrinsically unstructured plant dehydrin: NMR intensity and DSC aspects. *Biophys. J.*, **91**: 2243-224

Touchard C. (2006). Recherche de QTLs et choix de cibles stratégiques pour l'amélioration de la tolérance aux basses températures chez le maïs. *Univ. Tech. Compiègne. INRA*, 264p.

Travert S., Valerio L., Fouraste I., Boudet A.M. and Teulière C. (1997). Enrichment in specific soluble sugars of two *Eucalyptus* cell-suspension cultures by various treatments enhances their frost tolerance via a noncolligative mechanism. *Plant Physiol*, **114**: 1433-1442

- Troll W. and Lindsley J. (1955).** A photometric method for the determination of proline. *J. Biol.Chem.*, **215**: 655-660
- Uemura M. and Steponkus P.L. (1997).** Effect of cold acclimation on the lipid composition of the inner and outer membrane of the chloroplast envelope from rye leaves. *Plant Physiol* **114**: 1493-1500
- Uemura M., Warren G. and Steponkus P.L. (2003).** Freezing sensitivity in the *sfr4* mutant of *Arabidopsis* is due to low sugar content and is manifested by loss of osmotic responsiveness. *Plant Physiol.*, **131**:1800-1807
- Uemura M., Tominaga Y., Nakagawara C., Shigematsu S., Minami A. and Kawamura Y. (2006).** Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum* **126**: 81-89
- Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2000).** Two component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.*, **5(2)**: 67-74
- Vahisalu T., Kollist H., Wang Y.F., Nishimura N. and Chan W.Y. (2008).** SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, **452**: 487-91
- Vanacker H., Carver T.L.W. and Foyer C.H. (2000).** Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hypersensitive response in the barleypowdery mildew interaction. *Plant Physiol.*, **123**: 1289-1300
- Vanlerberghe G.C., Vanlerbeghe A. and McIntoch E. (1997).** Molecular Genetic Evidence of the Ability of Alternative Oxidative to Support Respiratory Carbon Metabolism. *Plant Physiol.* **113**: 657-661
- Verpont F. (2003).** Incidence de la fertilisation azotée en pépinière. *Infos-Ctifl*, **188**: 41- 45
- Verslues P., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J. and Zhu J. (2006).** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal*, **45**: 523-539
- Vezina L. and Paquin R. (1982).** Effet des basses temperatures sur la distribution de la proline libre dans les plantes de luzerne (*Medicago media* Pers.). *Physiol. Vég.*, **20(1)**: 101-109
- Vierling E. (1997).** Chloroplast-localized Clp proteins. In: Guidebook to molecular chaperones and Protein-Folding Catalysts. M.J. Gething, *ed. Sambrook and Tooze Publications at Oxford University Press.*, 255- 258
- Wang W.X., Vinocur B., Shaseyov O. and Altman A. (2001).** Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort.*, **560**: 285-292
- Wang W. X., Vinocur B. and Altman A. (2003).** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**: 1-14
- Wasilewska A., Vlad F., Sirichandra C., Redko Y., Jammes F., Valon C., Frey N.F.D. and Leung J. (2008).** An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Molecular Plant* **1**: 198-217

- Wei H., Dhanaraj A.L., Rowland L.J., Fu Y., Krebs S.L. and Arora R. (2005).** Comparative analysis of expressed sequence tags from cold-acclimated and non-acclimated leaves of *Rhododendron catawbiense* Michx. *Planta*, **221**: 406-416
- West A.H. and Stock A.M. (2001).** Histidine kinase and response regulator proteins in two component signalling systems. *Trends Biochem Sci.*, 369-376
- White D.A. Turner N. and Galbraith C. (2000).** Leaf water relations and stomatal behavior of four allopatric *Eucalyptus* species planted in Mediterranean south-western Australia. *Tree Physiology*, **20**: 1157-1165
- Wirth D., Christians E.S., Drion P.V., Dessy-Doize C. and Gustin P. (2003).** Les protéines de choc thermique (heat shock proteins-Hsps).II. Hsp70 : biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Ann. Méd. Vét.*, **147**: 127-144
- Wisniewski M., Webb R., Balsamo R., Close T.J., Yu X-M. and Griffith M. (1999).** Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum*, **105**: 600-608
- Witt W., Buchholz A. and Sauter J.J. (1995).** Binding of endoamylase to native starch grains from poplar wood. *Journal of Experimental Botany*, **46**:1761-1769
- Wohlbach D.J., Quirino B.F. and Sussman M.R. (2008).** Analysis of the Arabidopsis histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *The Plant Cell*, **20**: 1101-1117
- Wohlgemuth H., Mittelstrass K., Kschieschan S., Bender J. and Weigel H.J. (2002).** Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant Cell Environment*, **25**: 717-726
- WWF (2006).** Cork screwed? Environmental and economic impacts of the cork stopper market. *WWF report*, 36p.
- Xiao H., Siddiqua M., Braybrook S. and Nassuth A. (2006).** Three grape *CBF/DREB1* genes respond to low temperature, drought and abscisic acid. *Plant Cell Env*, **29**: 1410-1421
- Xin Z.G. and Browse J. (1998).** Eskimo 1 mutants of *Arabidopsis* are constitutively freezingtolerant. *Proc. Nat/Acad. Sci. USA*, **9**: 7799-7804
- Xing Y., Jia W. and Zhang J. (2007).** AtMEK1 mediates stress-induced gene expression of CAT1 catalase by triggering H₂O₂ production in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, **58**: 2969-2981
- Xing Y., Jia W. and Zhang J. (2008).** AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H₂O₂ production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, **54**: 440-451
- Xiong L., Lee B., Ishitani M., Lee H., Zhang C. and Zhu J.K. (2001).** FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **15**: 1971-1984

Xiong L., Lee H., Ishitani M., Tanaka Y., Stevenson B. (2002a). Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **99** : 899-904

Xiong L., Lee I., Ishitani M., Zhu J. (2002c). Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in Arabidopsis. *J Biological Chemistry*, **277**: 588-596

Xu Z., Nakajima M., Suzuki Y. and Yamaguchi I. (2002). Cloning and characterization of the abscisic acid-specific glucosyltransferase gene from adzuki bean seedlings. *Plant Physiology*, **129**: 1285-1295

Yadav V., Mallappa C., Gangappa S.N., Bhatia S. and Chattopadhyay S. (2005). A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell*, **17**: 1953-1966

Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*, **57**: 781-803

Yamaki S. (1992). Distribution of sorbitol, neutral sugars, free amino acids, malic acid and some hydraulic enzymes in vacuoles of apple cotyledons". *Plant Cell Physiol*, **23**: 881- 889

Yamori W., Knoguchi K. and Terashima I. (2005). Temperature acclimation of photosynthesis in spinach leaves: analyses of photosynthetic components and temperature dependencies of photosynthetic partial reactions. *Photosynth. Res.*, **28**: 536-547

Zarka D.G., Vogel J.T., Cook D. and Thomashow M.F. (2003). Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (inducer of CBF expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiol*, **133**: 910-918

Zeraia L. (1981). Essai d'interprétation comparative des données écologiques, phénologiques, et productions subéro-ligneuse dans les forêts de chêne liège de provenance cristallines (France méridionale) et d'Algérie. *Thèse de doctorat en Science*, 200p.

Zerrad W., Hillali S., Mataoui B., El Antri S. and Hmyene A. (2006). Étude comparative des mécanismes biochimiques de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur. *Lebanese Science Journal*, **9(2)**: 111-117

Zhang H.X., Hodson J.N., Williams J.P. and Blumwald E. (2001). Engineering salt-tolerant Brassica plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 32-36

Zhu J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **53**: 247-273

Zhu J., Shi H., Lee B.H., Damsz B., Cheng S., Stirm V., Zhu J.K., Hasegawa P.M. and Bressan R.A. (2004). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 9873-9878

Zhu J., Dong C.H. and Zhu J.K. (2007). Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Curr Opin Plant Biol*, **10**: 290-295

Résumé

Les changements climatiques que connaît la région méditerranéenne sont à l'origine des variations physiologiques des écosystèmes forestiers. Cette pathologie se manifeste par des contraintes thermiques que subissent les arbres dans leur aire naturelle, affectant leur croissance et leur productivité.

Les conséquences les plus désastreuses se manifestent par un risque de déplacement de leurs aires biogéographiques. Ce travail s'articule sur les capacités d'adaptation de chêne liège à la variabilité thermique à l'aide des marqueurs biochimiques (proline, sucres solubles, protéines et quercitol). Les semis élevés en conditions semi contrôlées subissent trois stress successifs de courte durée de 3 heures à une gamme de température comprise entre -2°C et 44°C . Les paramètres morphologiques (hauteur de la tige, nombre de feuilles et surface foliaire) et biochimiques sont quantifiés au cours de ces stress.

Les paramètres morphologiques ont montré une différence statistiquement significative entre les différents traitements et les stress.

Les sucres solubles (saccharose, glucose, fructose) et l'amidon sont étroitement liés, avec une diminution de leurs teneurs chez les semis stressés. L'accumulation de la proline est corrélée positivement avec les températures chaudes, l'accumulation des protéines atteint son maximum à 2°C et 38°C . Le quercitol est corrélé avec les températures extrêmes (-2°C et 44°C). Les racines et les jeunes feuilles (2^{ème} vague) accumulent respectivement la proline et le quercitol. Les quantités accumulées pourraient être liées au niveau de tolérance au stress thermique, contribuant au maintien de la turgescence cellulaire, créée par l'ajustement osmotique de ces marqueurs.

Mots clés : Chêne liège, températures extrêmes (éventail thermique), paramètres morphologiques, marqueurs biochimiques

Abstract

The climatic changes which the Mediterranean region knows are at the origin of the physiological variations of the forest ecosystems. This pathology appears by thermal stresses which undergo the trees in their natural area, affecting their growth and productivity.

The most disastrous consequences appear by a risk of displacement of their biogeographic areas. This study is articulated on the capacities of adaptation of cork oak to thermal variability using the biochemical markers (proline, soluble sugars, proteins and quercitol). Sowings have elevated under semi controlled conditions undergo three successive stresses of short duration of 3 hours to a range of temperature ranging between -2°C and 44°C . We have effected the measures of morphological parameters (height of stem, number of leaves and foliar surface) and biochemical.

The morphological parameters showed a statistically significant difference between the different treatments and stress. Soluble sugars (sucrose, glucose and fructose), the starch are closely linked with a reduction in their contents at stressed seedlings. The accumulation of the proline is correlated positively with the hot temperatures and accumulation of the proteins is significant at 2°C and 38°C . The quercitol is correlated with extreme temperatures (-2°C and 44°C). The roots and the young leaves (the 2nd flush) accumulated proline and quercitol. The accumulated quantities could be related to the level of tolerance to the thermal stress, contributing to the maintenance of cellular turgescence, creates by osmotic adjustment for these markers.

Key words: cork oak, extreme temperatures, morphological parameters, biochemical markers

ملخص

إن التغيرات المناخية التي تعرفها المنطقة المتوسطية مصدرها التغيرات الفيزيائية للأبنظمة الغابية. هذا التغير يظهر من خلال التناقضات الحرارية التي تؤثر على نمو الأشجار و إنتاجها في مناطقها الطبيعية.

إن النتائج السلبية تظهر من خلال خطر انتقالها من مناطقها البيوجغرافية. إن عملنا يدخل في إطار معرفة قدرات البلوط الفليني على تأقلمه مع التغيرات الحرارية بواسطة المؤشرات البيوكيميائية (برولين، سكريات دائبة، بروتين، كرسول) و النشاء. إن الشتلات النامية في ظروف شبه مراقبة تتعرض لثلاثة إجهادات متتالية لفترة قصيرة مدتها 3 ساعات من الحرارة المتغيرة بين 2°م و 44°م . قمنا بقياس العوامل المورفولوجية (طول الساق، عدد الأوراق، المساحة الورقية) و البيوكيميائية. تبين العوامل المورفولوجية فرقا إحصائيا معنويا بين مختلف المعالجات والإجهاد. إن السكريات الدائبة (سكروز، غلوكوز، فركتوز) و النشاء مرتبطة ارتباطا واسعا بنقص كميتها في الشتلات المجهددة و تراكم البروتينات يصل إلى حده الأقصى عند درجة الحرارة (2°م و 38°م) وتراكم الكرسول مرتبط بالحرارة المتطرفة (2°م و 44°م). تراكم البرولين يكون على مستوى الجدور بينما تراكم الكرسول يكون في لأوراق الفتية (الطابق 2). الكميات المتراكمة يمكن ان تكون مرتبطة بالتسامح مع الإجهاد الحراري الذي يؤدي للمحافظة على الإنتاج الخلوي الناشئ عن التعديل الأسموزي والتي تكون من مسؤولية كل من البرولين و الكرسول.

الكلمات المفتاح : البلوط الفليني، الحرارة المتطرفة، العوامل المورفولوجية، العوامل البيوكيميائية.

Annexe I : Dosage de sucres et du quercitol

Annexe I.1. Préparation des résines

Ñ Résine cationique DOWEX 50W*8 200-400 Mesh Sigma (forme H⁺)

- Calculer la quantité nécessaire pour le programme de mesures (on met 75 µL à 200 µL de suspension dans chaque cartouche, suivant la composition du matériel végétal à purifier).
- La mettre dans un grand bécher de 500 ml ou de 1000 ml
- Mettre un grand volume d'eau ultrapure (millipore 185+)
- Agiter avec une baguette (ou avec un barreau aimanté) et laisser sédimenter (1 heure environ)

Ñ Résine anionique AG1*8 100-200 Mesh (forme HCO₃⁻) chez Biorad

- Préparer 1 litre de solution de Na₂CO₃ concentration 1M, soit 106g (ou 53 g dans 500 ml).
- Calculer la quantité nécessaire pour le programme de mesures (on met 75µL à 200 µL de suspension dans chaque cartouche, suivant la composition du matériel végétal à purifier).
- La mettre dans un grand bécher de 500 ml ou de 1000 ml.
- Ajouter 500 ml de la solution de carbonate et agiter à l'agitateur magnétique pendant quelques heures, voire une nuit.
- Eliminer le liquide puis remettre de l'eau ultrapure - agiter une fois-laisser reposer- éliminer l'eau et refaire les opérations précédents 3 fois.
- On rince la préparation à l'eau pure jusqu'à ce que le pH ait baissé à 6.5 -7. Le contrôle fait à la sortie avec une bandelette. Le débit doit être assez faible pour avoir un bon rinçage.
- Boucher les 2 extrémités avec du Parafilm et conserver au frigo.

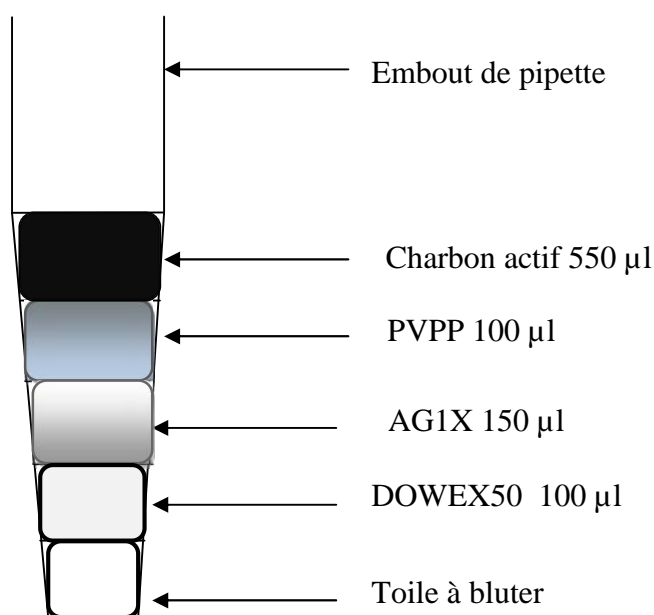
Remarques

- Il faut compter une journée de préparation, en incluant si possible une nuit.
- La résine sera versée dans les cartouches sous forme de suspension, c'est donc en volume qu'il faut raisonner. La résine doit représenter la moitié du volume final de la suspension (on parlera de suspension au ½ : c'est une estimation visuelle). Dans le cas le plus classique de travail au laboratoire, la résine sera stockée dans sa seringue de filtration (= combitip de 50 ml) : c'est donc, cette seringue qui permet de déterminer le volume maximal de résine possible à préparer.

Annexe I.2. Remplissage des cartouches

- Prendre des embouts bleus de 200-1000 µl ou des pointes étroites (Sarstedt ou Fisher)
- Couper l'extrémité de quelques millimètres (l'élargissement facilite la descente du liquide)
- Enfoncez un carré de toile à bluter (1 à 2 cm²)
- Mettre 100 µl de résine Dowex 50 à la pipette, avec un embout coupé (pour éviter son obturation intempestive)
- Rincer avec 500 µl d'eau

- Refaire ces 2 dernières opérations avec la résine AGX
- Mettre 100 µl de PVPP, préparé comme les résines et rincer
- Mettre 550 µl de charbon actif
- Si les cartouches ne sont pas tout de suite utilisées les boucher aux 2 extrémités avec du Parafilm et les conserver au frigo. Il faut absolument éviter qu'elles sèchent (une résine sèche est hétérogène et les fentes de dessiccation qui apparaissent, forment des circuits préférentiels de passage des solutés à filtrer. Les sucres solubles et le quercitol sont quantifiés par l'HPLC.



Méthode de filtration du charbon actif

Annexe I.3. Séparation de sucres solubles et du quercitol

Column : CARB 1 250/4.6
Column size : 4.6mmIDX250mm

Analysis condition

Eluent : 100Mm NaOH
Flow rate : 1.0Ml/min
Detector : Amperometric Detector (PAD,Au)
Temperature : Ambient (ca. 25°C)
Sample size : 20 µl
Sample :

Inositol : 5mg/L	Glucose : 30mg/L
Arabitol : 10mg/L	Xylose : 20mg/L
Sorbitol : 10mg/L	Fructose : 30mg/L
Fucose : 20mg/L	Lactose : 100mg/L
Arabinose : 20mg/L	Sucrose : 100mg/L

Pressure : 6.8MPa
Column number: 4020006S
Plat Connt : 5000 (Glucose)

Annexe I.4. Préparation des solutions (dosage de l'amidon)

- Solution de soude : NaOH 0.02N

Concentration 5N : dissoudre 200g dans un litre (penser à refroidir la fiole jaugée, à 20°C avant d'ajuster le volume final)

Concentration 0.02N : faire une dilution à partir d'une solution de NaOH 5N (400 µL de NaOH 5N dans une fiole jaugé de 100 ml.

- Tampon Triethanolamine : 0.75M pH = 7.6 pour 100 ml

Dissoudre dans un bêcher :

- 14g de triethanolamine (conservé au frigo)
 - 0.25g de SO₄ Mg, 7H₂O
 - Dans 80 ml d'eau ultra pure récente
 - Utiliser un agitateur magnétique
- Ajuster le pH à 7.6 avec de la soude NaOH 5N

Verser la solution dans la fiole jaugée et compléter le volume à 100 ml.

- Tampon citrate : 0.32M pH = 4.6 pour 100 ml

Dissoudre dans un bêcher :

- 3.45g d'acide citrique
- 4.55g de citrate de soude
- Dans 70 à 80ml d'eau ultra pure récente
- Utiliser un agitateur magnétique

Ajuster le pH à 4.6 avec de la soude 1N ou 5N

Verser la solution dans la fiole jaugée et compléter le volume à 100 ml.

- Amyloglucosidase

5ml de solution enzymatique : 5mg de poudre pour 1ml de tampon citrate pH = 4.2

- HK/G6PDH : Hexokinase/ Glucose 6 Phosphate Déshydrogénase

- Solution de sulfate d'Ammonium : $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 2.5M pH = 6 pour 100 ml (33.035g dans 100 ml)
- 0.3 ml de HK et 0.2 ml de G6PDH dilué dans 1ml du tampon $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

- ATP : Adénosine triphosphate

- 150mg d'ATP (25 mg/ml)
- 150mg de NaHCO_3 (25mg/ml)
- Ajouter 6 ml d'eau ultra pure

- NADP :

- 10 mg de NADP dans 1ml d'eau ultra pure

Annexe I.5. Préparation des microcuves

- On utilise un portoir avec une micro cuve pour le blanc réactif, une pour chacune des solutions témoins glucose (0.1g/l et 0.4g/l) et une pour chaque essais.

- Préparation de tampon réactionnel par microcuve :

- * 250 μl de tampon triéthanolamine (pH = 7.6)
- * 400 μl d' H_2O distillée récente
- * 50 μl de solution de NADP
- * 50 μl de solution d'ATP

- Introduire au fond de chaque microcuve :

- 50 μl d' H_2O dans la microcuve « blanc »
- 50 μl de sucres témoins (dans les microcuves témoins glucose 0.1g/l et 0.4g/l).
- 50 μl de solution de NADP

- 50 μ l de solution ATP

La formation de NAD(P)H est proportionnelle à la quantité de glucose. Cette molécule a une absorbance spécifique à 340 nm, à la limite du rayonnement UV (ainsi qu'à 365 nm, dans le visible).

Annexe I.6. Dosage de l'amidon (courbe d'étalonnage)