

N° d'ordre: 2225

THESE

présentée
pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École Doctorale : Sciences des Procédés
Spécialité : Sciences des Agroressources

par

Jane ROCHE

Composition de la graine de tournesol (*Helianthus annuus* L.)
sous l'effet conjugué des contraintes agri-environnementales
et des potentiels variétaux

Soutenue le 27 Mai 2005 devant le jury composé de:

Zéphirin MOULOUGUI	Directeur de recherche INRA	<i>Président</i>
Andrée BOUNIOLS	Directeur de recherche INRA	<i>Directeur de thèse</i>
Françoise CORBINEAU	Professeur Université Paris VI	<i>Rapporteur</i>
Félicity VEAR	Directeur de recherche INRA	<i>Rapporteur</i>
Philippe MORARD	Professeur ENSA Toulouse	<i>Membre</i>
Zakaria OUISSAFANE	Industriel (Maroc)	<i>Membre</i>

RESUME

Les graines de tournesol sont une source de matières premières recherchées par l'industrie pour l'alimentation humaine et animale et pour des applications non alimentaires. Toutefois, la composition des graines de tournesol est largement influencée par les facteurs génétiques et environnementaux. Notre démarche vise à caractériser les modes d'élaboration de constituants de la graine utiles pour les transformations industrielles par l'adaptation des conduites culturales et par le choix de génotypes.

Par l'utilisation de l'expérimentation pluriannuelle de plein champ et de quelques génotypes présentant des caractéristiques intéressantes (oléiques ou non oléiques et/ou tolérants à la sécheresse), la variabilité des teneurs en composés de la graine est étudiée selon les conditions agri-environnementales (date de semis, régime hydrique, séquences climatiques). Elle révèle le rôle déterminant de l'élévation de température ou de la contrainte hydrique survenant après floraison sur le déplacement de l'équilibre huile/protéines vers la fraction protéique. Il apparaît aussi une forte corrélation entre la teneur en acides gras insaturés à maturité (acides oléique et linoléique) et la température. Sous stress hydrique, la teneur en acide oléique chute tandis que la teneur des autres acides gras et celle des phytostérols sont renforcées.

L'analyse de la dynamique d'accumulation des constituants en réponse aux contraintes appliquées permet d'identifier deux phases dans l'accumulation de l'acide oléique. L'accumulation des phytostérols dans l'huile est maximale en début de maturation des graines et sous l'effet des forts déficits hydriques.

Pour caractériser les génotypes utilisés, il a été choisi de déterminer le niveau d'expression des gènes du métabolisme de base du tournesol sur une puce à ADN du tournesol (Géoplante BAP ENSAT). En réponse à une forte contrainte hydrique, ces gènes sont exprimés ou réprimés selon les conditions de stress hydrique.

L'approche intégrative alliant caractérisations agro-physiologique, lipochimique et génomique permet de progresser dans la connaissance des interactions génotype*environnement pour une production de qualité, et, aussi de dégager des éléments de gestion de la culture de tournesol susceptibles d'orienter les synthèses vers les constituants d'intérêt industriel.

Mots-clés: graine, tournesol, acides gras, phytostérols, génotype, stress hydrique, température, expression des gènes

ABSTRACT

Sunflower seeds are a source of raw materials required for industrial purposes in human and animal food and nonfood applications. However, sunflower seeds composition is largely influenced by genetic and environmental factors. Our study deals with the characterization of the accumulation of seed components useful for industrial transformations by the choice of cultural practices and genotypes.

Using a pluri-annual field device and genotypes with traits of interest (oleic or non oleic and/or drought tolerant), the seed composition variability is studied under agri-environmental conditions (sowing date, water regime and climate sequences). The major effect of high temperature or water constraint occurring after flowering is to orientate oil/protein balance towards the protein fraction. It appears also a closed correlation between the unsaturated fatty acid contents (acid oleic and acid linoleic) and the temperature at physiological maturity. Under water stress the oleic acid content is reduced while the content of the other fatty acids or phytosterols is enhanced.

The analysis of components accumulation in response to stress leads to the identification of two phases for oleic acid accumulation. The phytosterols accumulation in oil reaches a maximum at the beginning of seed ripening under scarce water resource.

To characterize the genotypes selected, the expression level of genes involved in primary metabolism is undertaken using a sunflower microarray (Génoplante BAP ENSAT). In response to a strong water constraint, these genes were up- or down-regulated according to water stress level.

The integrative approach combining agro-physiological, biochemical and genomic characterizations improves knowledge on genotype*environment interactions for quality production, and also, points out some ways to adapt sunflower crop to the production of specific components for industrial purposes.

Key words: sunflower, fatty acids, phytosterols, genotype, water stress, temperature, gene expression

LISTE DES PUBLICATIONS ET POSTERS

Générés par ce travail

Roche J., Essahat A., Bouniols A., El Asri M., Mouloungui Z., Mondières M., Alghoum M. (2004). Diversified composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds within cultural practices and genotypes (hybrids and populations). *Helia*, 27, 40 73-98.

Roche J., Essahat A., Bouniols A., El Asri M., Mouloungui Z., Mondières M., Alghoum M. (2004). Diversified composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds within cultural practices and genotypes (hybrids and populations). 6^{ème} Congrès Européen de Biotechnologie du Tournesol, SUNBIO (5-9 Octobre 2003). Contribution orale.

Roche J., Bouniols A., Mouloungui Z., Barranco T. (2004). Variation of fatty acids contents in seeds under scarce water resources for oleic and standard sunflowers, Proc. 16th International Sunflower Conference (28 Août - 2 Septembre 2004), Fargo, USA, Vol II: 783-792. Poster et contribution orale.

Roche J., Bouniols A., Mouloungui Z., Barranco T., Cerny M. (2005). Management of environmental crop conditions to produce useful sunflower-oil components. *European Journal of Lipid Science Technology*. Sous-presse.

Roche J., Hewezi T., Bouniols A., Gentzbittel L. (2005). Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray. *Plant Cell & Environment*. Soumis.

REMERCIEMENTS

Mes plus sincères remerciements s'adressent tout d'abord à Mme Andrée Bouniols, directeur de recherche à l'INRA Toulouse, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour son soutien, ses critiques constructives, ses conseils qui m'ont permis d'évoluer dans ma vision de la recherche et dans la façon de la mener ; et pour m'avoir permis d'intégrer de nombreuses collaborations. Merci du temps qu'elle a consacré à redonner un peu de rigueur à ma plume qui a parfois tendance à s'emballer... Grâce à elle, cette expérience de thèse aura été unique, diversifiée et enrichissante tant d'un point de vue scientifique qu'humain.

Je tiens également à remercier Mr Mouloungui, directeur de recherche à l'INRA, pour m'avoir donné libre accès à la plate-forme lipochimie de l'unité de chimie agro-industrielle dont il est l'animateur, pour avoir participé, collaboré et financé une partie de ce travail, pour m'avoir suivie et encouragée, et enfin, pour avoir accepté de présider la soutenance de ma thèse. Qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

J'adresse toute ma gratitude à Mesdames Françoise Corbineau et Félicity Vear pour la rapidité avec laquelle elles ont lu mon manuscrit et l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail, merci d'avoir accepté de juger ce travail et d'avoir participé au jury de cette thèse. Je remercie également Messieurs Philippe Morard et Zakaria Ouissafane de m'avoir fait l'honneur de participer au jury de ma thèse.

La qualité et la continuité des données présentées dans cette thèse sont le fruit d'un travail d'équipe sur le terrain de nombreux acteurs... J'ai pour cela pleinement profité de la présence et de l'efficacité d'Abderrahim Essahat, chercheur à l'INRA Meknès (Maroc) et de Patrice Bascou, Thomas Barranco, Cécile Aguilar et Céline Birota, stagiaires à l'INRA ; sans qui la mise en place et le suivi des expérimentations n'auraient pas été réalisables et grâce à qui j'ai mesuré l'importance du travail en équipe. Merci à vous.

Je tiens à remercier Mr Laurent Gentzbittel de l'ENSAT pour avoir contribué à l'analyse génomique et de s'être rendu disponible à des moments clés de l'évolution du travail. Je tiens

également à exprimer ma profonde reconnaissance à Tarek Hewezi pour sa contribution, son enthousiasme, sa disponibilité et sa patience dans le travail réalisé au laboratoire Biotechnologie et Amélioration de Plantes et sur la Génopole-Séquençage Midi-Pyrénées.

Je tiens à remercier sincèrement Muriel Cerny pour son soutien technique, ses conseils pertinents et pour les nombreuses discussions que nous avons eues qui ont contribué à m'ouvrir vers le monde de la recherche appliquée, pour son accueil et sa disponibilité dont j'ai parfois peut-être abusé...

Un grand merci à Michel Mondières, Denis Vialan et Eric Bazerthe qui m'ont initié aux techniques agricoles et pour leur aide constante sur le terrain.

Je remercie également Nathalie Seguin et Patrick Petitbon pour m'avoir guidée et aidée dans l'analyse protéique des échantillons.

Merci également à tous ceux qui ont participé de loin ou de près à ce travail, le personnel technique, les secrétaire et bibliothécaire, les chercheurs aux multiples discussions ; qu'ils soient ici remerciés.

Je voudrais également remercier mes compatriotes de thèse, mes amis et complices qui ont contribué à donner un sens à mon travail pendant ces 3 années de thèse. Merci à Marie, Laure, Pauline, Estelle, les filles les plus belles du labo et bien sûr Manuel. Merci à Marion, je n'oublierais jamais ta présence précieuse et constante depuis le DEA.

Une pensée particulière aux autres instigateurs et animateurs de l'association sINPThèse : François, Patoche, Christelle, David, Ludo, Laurence, ... ; qu'ils soient remerciés ici pour leur contribution de tous les instants à la lutte pour le droit des doctorants et docteurs de demain.

Mes plus sincères et profondes pensées s'adressent à ma famille. Merci ma juju, mon gui, et mes parents, pour simplement avoir été là en toutes circonstances, pour m'avoir toujours comprise et soutenue dans mes choix et pour m'avoir donné la force de réaliser ce travail. Qu'ils trouvent ici l'intensité de mon amour et de ma reconnaissance.

Enfin, merci Boris, toi mon autre, qui as su m'écouter, me comprendre, me supporter, me corriger, me motiver, me soutenir et me conseiller dans les moments les plus tristes comme les plus heureux. La force d'être deux fait toujours naître de grandes choses...

SOMMAIRE

Introduction	7
Chapitre I - Etat des connaissances	10
Avant-propos	10
1. Composition et formation des graines de tournesol.....	11
1.1. Formation de l'akène.....	11
1.2. Composition de la graine	13
1.2.1. Constituants de la coque.....	13
1.2.2. Principaux constituants de l'amande.....	14
1.2.2.1. Protéines de réserve.....	14
1.2.2.2. Lipides de réserve	15
1.2.3. Formation et accumulation des protéines et des lipides.....	16
1.2.4. Constituants lipidiques	16
1.2.4.1. Acides gras	17
1.2.4.2. Tocophérols.....	19
1.2.4.3. Phytostérols	20
2. Eléments du métabolisme lipidique	26
2.1. Néosynthèse des acides gras	27
2.1.1. Source de C	27
2.1.2. Phase d'activation	29
2.1.3. Phase de formation/élongation	29
2.1.4. Phase de désaturation	31
2.1.4.1. Désaturation des acides gras saturés	31
2.1.4.2. Désaturation de l'acide oléique.....	32
2.1.5. Phase de transport ou d'export.....	33
2.2. Biosynthèse des glycérolipides	33
2.2.1. Voie procaryotique.....	34
2.2.2. Voie eucaryotique	34
2.3. Elaboration des réserves lipidiques.....	36
2.3.1. Biosynthèse des triglycérides.....	36
2.3.2. Synthèse des oléosomes	36
2.3.3. Protéines de transfert lipidique (LTP).....	37
3. Qualité et Production.....	38
3.1. Contexte agricole de la production du tournesol.....	38
3.2. Productivité et facteurs limitants.....	40
3.2.1. Productivité et disponibilité hydrique	40
3.2.2. Productivité et alimentation azotée	42
3.3. Produire dans un contexte d'exigence de qualité.....	43

4. Molécules utilisables issues de la culture du tournesol: intérêt, enjeux et types de valorisations	45
4.1. Intérêts et enjeux économiques et sociaux autour des valorisations	45
4.2. Nouveau visage des valorisations alimentaires	46
4.3. Débouchés de la valorisation non alimentaire: jachère industrielle et culture de diversification.....	46
4.4. Valorisations de la fraction lipidique	48
4.4.1. Débouchés alimentaires	48
4.4.1.1. Huile et acides gras	48
4.4.1.2. Composés mineurs	50
4.4.1.3. Procédés de transformation	51
4.4.2. Débouchés non alimentaires	52
4.5. Valorisation des coproduits de la culture de tournesol	53
4.5.1. Tourteau et protéines.....	54
4.5.2. Biomasse végétative.....	54
4.5.3. Graine entière de bouche.....	55
5. Facteurs de variabilité de la qualité.....	56
5.1. Déterminisme et amélioration génétique	56
5.1.1. Sélection génétique	56
5.1.1.1. Evolution et exploitation du potentiel génétique	57
5.1.1.2. Croisements génétiques: la sélection dirigée	57
5.1.2. Mutations génétiques	59
5.1.2.1. Mutants riches en acide oléique	60
5.1.2.2. Mutants riches en acide stéarique	61
5.1.2.3. Mutants riches en acide palmitique.....	61
5.1.2.4. Mutants riches en tocophérols.....	62
5.2. Facteurs agri-environnementaux	63
5.2.1. Température	63
5.2.1.1. Huile et protéines	63
5.2.1.2. Acides gras	64
5.2.1.3. Composés mineurs	67
5.2.2. Disponibilité hydrique.....	68
5.2.2.1. Remplissage de la graine et translocations.....	68
5.2.2.2. Huile et protéines	69
5.2.2.3. Acides gras	70
5.2.3. Rayonnement incident.....	70
5.2.4. Alimentation azotée	73
5.2.5. Sol	74

Chapitre II - Matériels biologiques, méthodes analytiques et caractérisation des conditions culturales.....	75
1. Choix des géotypes	75
2. Conduites culturales et dispositifs expérimentaux	76
2.1. Expérimentation en milieu contrôlé	77
2.1.1. Conditions de culture et mise en place des essais	77
2.1.2. Régime hydrique	78
2.2. Expérimentations en milieu naturel	80
2.2.1. Dispositif « rotations-qualité »	80
2.2.2. Conditions de culture	80
2.2.3. Traitement date de semis	81
2.2.4. Traitement hydrique en phase post-florale	82
2.2.5. Caractérisation des séquences climatiques	82
2.2.5.1. Climat	83
2.2.5.2. Bilan hydrique	83
2.2.5.3. Gamme de températures moyennes	85
2.2.5.4. Somme des températures	86
2.2.5.5. Rayonnement global incident	87
2.2.6. Caractérisation du statut hydrique	88
2.2.6.1. Humidité volumique du sol	88
2.2.6.2. Potentiel hydrique foliaire	89
2.2.6.3. Teneur en eau relative des feuilles	92
2.2.6.4. Estimation du niveau de stress hydrique	93
2.2.7. Contrôle du développement de la culture	94
2.2.7.1. Exemple de l'évolution de la surface foliaire en fonction de la disponibilité hydrique	95
2.2.7.2. Exemple de la durée du cycle de développement en fonction de la date de semis	97
3. Prélèvements des échantillons biologiques	98
4. Détermination des teneurs en constituants de la graine	99
4.1. Détermination de la teneur en huile	100
4.1.1. Méthode de référence (Soxhlet)	100
4.1.2. Accelerated Solvent Extractor (ASE 200® Dionex)	100
4.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	101
4.2. Détermination de la teneur en acides gras	101
4.2.1. Extraction et estérification des acides gras	102
4.2.2. Dosage des esters méthyliques d'acides gras par CPG	102
4.3. Détermination de la teneur en phytostérols	103
4.3.1. Extraction des phytostérols	103

4.3.2.	Dosage des phytostérols par CPG	104
4.4.	Détermination de la teneur en protéines.....	105
5.	Expression des résultats en quantités	105
6.	Méthodes d'analyses statistiques	105
Chapitre III - Conduites culturales et critères agronomiques.....		107
Avant-propos		107
1.	Variabilité de la composition de la graine en réponse aux conduites de culture	108
1.1.	Caractérisation de l'effet génotype sur la qualité biochimique de la graine et sur les indicateurs de production	110
1.2.	Impact des conduites culturales sur la composition de la graine	114
1.2.1.	Huile et protéines	114
1.2.1.1.	Impact de la date de semis	114
1.2.1.2.	Impact de la disponibilité hydrique.....	115
1.2.2.	Acides gras	116
1.2.2.1.	Impact de la date de semis	117
1.2.2.2.	Impact de la disponibilité hydrique.....	118
1.2.3.	Phytostérols	119
1.2.3.1.	Facteur génotype	120
1.2.3.2.	Impact de la date de semis	121
1.2.3.3.	Impact de la disponibilité hydrique.....	124
2.	Modification de la relation production/qualité en réponse aux conduites de culture	125
2.1.	Relation composantes du rendement/composés de la graine	125
2.2.	Rendement et quantité d'huile et de protéines	127
2.2.1.	Effet date de semis	130
2.2.2.	Effet régime hydrique	130
2.3.	Rendement et quantité d'acides gras.....	131
2.3.1.	Effet date de semis	132
2.3.2.	Effet régime hydrique	134
3.	Modifications des équilibres biochimiques entre composés de la graine en réponse aux conduites de culture.....	136
3.1.	Relation fraction lipidique/fraction protéique.....	136
3.2.	Relation entre acides gras.....	139
3.3.	Relation huile/phytostérols.....	141
3.4.	Relations entre phytostérols	142
4.	Synthèse et discussion sur le rôle des facteurs agri-environnementaux sur la composition de la graine	145
4.1.	Huile et protéines	145
4.1.1.	Influence des températures en phase post-florale	145

4.1.2.	Influence de la disponibilité hydrique en phase post-florale.....	147
4.2.	Répartition huile/protéines	148
4.3.	Acides gras	149
4.3.1.	Influence des températures en phase post-florale	149
4.3.2.	Influence de la disponibilité hydrique en phase post-florale.....	153
4.4.	Variabilité de la teneur en phytostérols.....	155
5.	Conclusion.....	156

Chapitre IV - Dynamique d'accumulation des constituants dans la graine sous contraintes agri-environnementales157

Avant-propos157

1.	Accumulation de la matière sèche.....	158
1.1.	Effet de la température	158
1.2.	Effet de la disponibilité hydrique	159
2.	Accumulation de l'huile et des protéines	160
2.1.	Huile.....	160
2.1.1.	Effet de la température	160
2.1.2.	Effet de la disponibilité hydrique	161
2.1.3.	Chronologie de synthèse de l'huile	162
2.2.	Protéines	165
2.2.1.	Effet de la température	165
2.2.2.	Effet de la disponibilité hydrique	165
3.	Evolution de la composition en acides gras	166
3.1.	Proportion d'acides gras.....	166
3.1.1.	Identification des phases	166
3.1.2.	Modifications de la teneur en acides gras en réponse à la température	168
3.1.2.1.	Cas d'un génotype standard	169
3.1.2.2.	Cas d'un génotype oléique	172
3.1.3.	Modifications de la teneur en acides gras en réponse à la contrainte hydrique ..	173
3.1.3.1.	Cas du génotype standard.....	173
3.1.3.2.	Cas du génotype oléique	175
3.2.	Quantités d'acides gras insaturés sous l'effet des facteurs agri-environnementaux	175
4.	Accumulation des phytostérols	177
4.1.	Cinétique d'accumulation dans la graine entière	177
4.2.	Répartition des phytostérols dans la graine.....	180
5.	Synthèse et Discussion sur les modifications d'accumulation en réponse aux contraintes agri-environnementales	181
6.	Conclusion.....	187

Chapitre V - Caractérisation génomique: Interaction contrainte hydrique *génotype pour l'expression des gènes des métabolismes liés aux critères qualitatifs retenus	188
1. Avant-propos	188
2. Démarche méthodologique	188
3. Tolérance au stress hydrique et déterminisme de la qualité.....	191
Chapitre VI - Conclusion générale et perspectives	199
Références bibliographiques	210
Annexes	230
Liste des abréviations.....	291
Liste des figures	292
Liste des tableaux	296

Introduction

Confrontée à la mondialisation des marchés, l'agriculture et les secteurs industriels qui lui sont associés doivent renforcer leur compétitivité et assumer les nouvelles exigences en terme de qualité des produits, en terme de modes de production et aussi de modes de transformation. D'une part, les consommateurs recherchent des produits sains, synonymes de sécurité alimentaire et de traçabilité et respectant l'environnement. D'autre part, les industriels de la transformation de la matière agricole et les organismes stockeurs exigent des produits de composition stable et à forte valeur ajoutée. Les producteurs demandent des produits rentables et permettant de valoriser l'ensemble de la filière et qui leur assurent un revenu. Ainsi, il ne suffit plus d'améliorer la productivité, il apparaît nécessaire d'ouvrir la voie à de nouveaux débouchés de la production agricole en répondant aux exigences de la qualité et des cahiers des charges. Les progrès génétiques et des pratiques culturales respectueuses de l'environnement permettent de progresser dans cette voie. Ainsi, ces préoccupations environnementales et économiques poussent le monde agricole vers un mode de production moins polluant et moins dispendieux en intrants, plus efficace dans l'obtention de la qualité désirée; et les organismes de Recherche et de Développement accompagnent cette démarche.

Dans le secteur des oléagineux, malgré une demande croissante en huiles végétales, la filière du tournesol produisant uniquement de l'huile s'est fragilisée, notamment par la suppression en 2002 du soutien des prix de la PAC ainsi que par la concurrence d'autres cultures oléagineuses, comme le colza. Toutefois, une meilleure valorisation des produits et co-produits de la récolte et une diversification des utilisations permettrait à la culture de rester compétitive vis-à-vis des autres espèces oléagineuses.

Un atout de l'huile de tournesol est la grande diversité de composition en acides gras de l'huile de tournesol et en co-produits de bonne valeur ajoutée (composés mineurs). Ceci conduit à des utilisations variées aussi bien en nutrition humaine que dans l'utilisation non alimentaire. Pour le secteur alimentaire, le développement de variétés de tournesol différemment enrichies en acides gras présente un réel intérêt pour l'alimentation humaine, avec de nombreux effets bénéfiques sur la santé. Dans le secteur non alimentaire, l'huile de tournesol peut être utilisée dans le domaine des lubrifiants, biosolvants pour la teneur en acide oléique, dans le domaine des peintures ou encore des produits cosmétiques ou pharmaceutiques pour les phytostérols ou certains acides gras saturés. Par ailleurs, le tourteau de tournesol est une source de matière riche en protéines utilisée pour l'alimentation animale.

Dans la réalisation de ces objectifs de production, les itinéraires techniques sont relativement connus pour réaliser des rendements satisfaisants, mais encore mal maîtrisés pour élaborer une qualité donnée dans la graine. En effet, la composition des graines varie selon les conditions environnementales (température, eau...) et les conduites culturales (régime hydrique, apport azoté, date de semis...) et aussi selon les génotypes.

L'objectif global de cette étude est d'apporter des éléments de compréhension sur l'élaboration de la composition de la graine de tournesol dans un contexte de production sous bas intrants, et notamment de ressource en eau limitée. La connaissance des caractéristiques biochimiques, agrophysiologiques et génomiques liées à la qualité de la graine doit permettre de progresser dans l'identification des meilleures combinaisons génotypes*environnement*pratiques culturales pour la production d'une qualité recherchée. Elle doit aussi apporter des éléments sur les seuils de concentration en constituants et sur les équilibres entre molécules susceptibles d'être atteints pour satisfaire la demande industrielle.

Le chapitre I de ce mémoire récapitule les acquis de la recherche sur la composition de la graine et le métabolisme lipidique. Le contexte de la production de qualité et les possibilités de valorisation des constituants de la récolte de tournesol sont également détaillés. Enfin, les connaissances actuelles sur les facteurs génétiques et agri-environnementaux responsables de la variabilité de la composition de la graine sont exposées.

Le chapitre II précise les choix relatifs aux matériels végétaux, aux méthodes d'expérimentations agronomiques et à celles d'analyses chimiques utilisées pour la détermination des critères de qualité, ainsi que les méthodes statistiques.

Le troisième chapitre présente les données pluriannuelles collectées sur la variabilité des teneurs en composés de la graine selon les conditions agri-environnementales (date de semis, régime hydrique, séquences climatiques) à la récolte chez différents génotypes distingués sur des critères qualitatifs (oléiques, non oléiques) ou de tolérance à la sécheresse. Il relate aussi les équilibres entre production grains/qualité et entre les constituants. Cette partie a bénéficié du dispositif expérimental grandes cultures du site de Toulouse-Auzeville, à l'UMR INRA/ENSAT ARCHE. Le dosage des composés biochimiques a été effectué sur la plate-forme lipochimie l'unité CEPIA (Caractérisation et Elaboration des Produits Issus de l'Agriculture) de l'UMR 1010 INRA/ENSIACET (Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques et Technologiques) dans le cadre d'une collaboration.

Le quatrième chapitre traite de l'effet des facteurs température et disponibilité hydrique sur la dynamique d'accumulation des constituants dans la graine en cours de remplissage (protéines, huile,

acides gras et phytostérols). Il précise le schéma d'élaboration de la qualité sous contraintes agri-environnementales.

Le chapitre V porte sur la caractérisation du matériel biologique utilisé par une approche génomique (puce à ADN ou microarray), en vue d'identifier les gènes différentiellement exprimés en conditions de contrainte hydrique et associés à la fois à l'établissement de la composition biochimique de la graine et à la tolérance à la sécheresse. Cette approche intégrative alliant les caractérisations moléculaire et agro-physiologique doit améliorer la compréhension des interactions génotype*environnement et fournir des pistes de sélection pour renforcer les performances qualitatives du tournesol. Ce travail a été réalisé en collaboration avec les chercheurs du Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes de l'ENSAT sur la plate-forme Génotypage-Séquençage de la Génopôle Midi-Pyrénées et a fait l'objet d'une publication (annexe 14).

Le chapitre VI retrace les avancées de ce travail et les perspectives de poursuite et de progrès à réaliser.

Chapitre I - Etat des connaissances

Avant-propos

Parmi les plantes oléagineuses cultivées, sources d'huile végétale, le tournesol occupe en France le second rang derrière le colza. Ces espèces fournissent des huiles principalement utilisées pour la consommation humaine mais peuvent également être destinées à certaines industries non alimentaires. La teneur et la composition en acides gras et autres composés de la graine déterminent le type d'application. D'autres composés, tels les protéines, sont également source de valorisations industrielles multiples.

Les équilibres biochimiques des constituants de la graine de tournesol représentent un critère essentiel à prendre en compte pour définir la qualité technologique des semences et diversifier leurs utilisations. Les seuils et équilibres en composants requis varient selon l'application concernée.

L'élaboration des composés de la graine dépend de facteurs intrinsèques, tel que le génotype; et extrinsèques, tels que les facteurs culturaux et environnementaux. Il apparaît essentiel de connaître les modes d'élaboration de ces molécules qui régissent la mise en place des équilibres susceptibles d'être réalisés pour satisfaire la demande industrielle. Les pratiques de culture et le choix des génotypes permettent de maîtriser ces facteurs et constituent une voie pouvant répondre à ces attentes.

Ce premier chapitre présentera tout d'abord la composition des akènes de tournesol. Puis nous préciserons quelques éléments du métabolisme de la fraction lipidique sur laquelle porte l'essentiel de ce travail. En second lieu, l'accent sera mis sur la place et les orientations du tournesol vis-à-vis de la production de graines de qualité dans l'agriculture d'aujourd'hui ainsi que sur les différentes voies de valorisation de la récolte en lien avec la composition du tournesol. Enfin, quelques éléments du déterminisme génétique et les facteurs agri-environnementaux responsables de la variabilité qualitative des récoltes seront exposés.

1. Composition et formation des graines de tournesol

La graine de tournesol se compose de plusieurs constituants. Parmi ces différentes molécules mises en réserves, nombre d'entre elles sont susceptibles de fluctuer selon les conditions génétiques et environnementales. Cependant, nous avons décidé de n'étudier que celles dont les débouchés sont particulièrement intéressants. Leur composition et leur formation seront détaillées lors de cette partie.

1.1. Formation de l'akène

La graine de tournesol est en réalité un akène, fruit sec indéhiscent situé dans l'inflorescence appelée capitule. Celui-ci comprend plusieurs milliers de fleurs réparties en cercles ou parastiques, chaque fleur donnant un akène. L'anthèse (correspondant à la phase de formation des fleurs mâles) débute à la périphérie du capitule et progresse de l'extérieur vers l'intérieur à raison de 4 rangs par jour. Ce phénomène dure environ 10 jours. La graine atteint la maturité physiologique aux environs du 30^{ième} jour après l'anthèse du premier parastique. Les akènes situés sur les parastiques externes ont un taux de remplissage plus élevé que ceux situés au centre (Connor et Hall, 1997 ; Villalobos *et al.*, 1994).

L'akène est constitué de deux types d'organes :

- un embryon recouvert d'un tégument séminal constituant l'amande,
- un péricarpe non soudé dérivé de la paroi de l'ovaire sec et indéhiscent correspondant à l'enveloppe de l'akène (ou coque).

Dans ce mémoire, le terme « graine » a été retenu pour décrire l'akène de tournesol dans la mesure où celui-ci est communément utilisé en sciences agronomiques et aussi par les producteurs au même titre que le terme « semence », et il correspond à la graine entière (Figure 1).

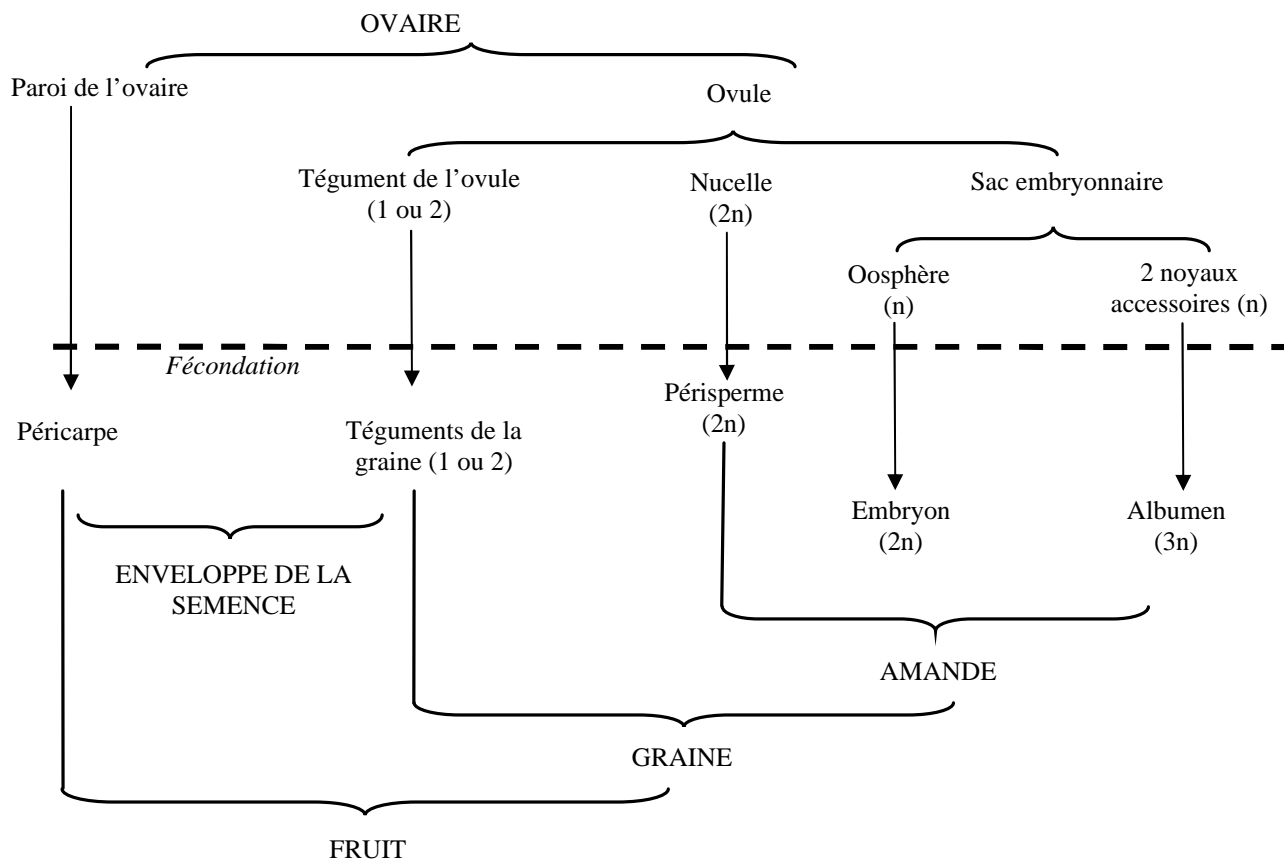


Figure 1 : Origine des diverses structures constitutives des semences (d'après Côme et Corbinau, 1998)

La graine présente dans un premier temps une phase de formation de l'embryon (division cellulaire ou embryogenèse puis expansion cellulaire ou morphogenèse). Cette phase est suivie d'une période de maturation correspondant à l'accumulation des réserves dans l'albumen. Elle s'accompagne d'une forte augmentation du volume des cellules et d'un pic de teneur en acide abscissique. Une dernière phase de déshydratation aboutit à la maturité physiologique (Côme et Corbinau, 1998).

D'un point de vue agronomique, le développement de l'akène se décompose en 2 phases correspondant à la formation de la coque et de l'amande. Elle débute par la croissance de la coque; à l'anthèse, le péricarpe pèse 2 mg (Connor et Hall, 1997). L'amande entame sa croissance rapidement, environ 8 jours après l'anthèse (Figure 2) et gagne 33% de son poids final quand la constitution de la coque s'achève (Villalobos *et al.*, 1996). En raison du décalage du développement de l'amande et de la coque dans le temps, un stress survenant pendant leur période de formation peut altérer le ratio coque/amande de chaque akène (Connor et Hall, 1997).

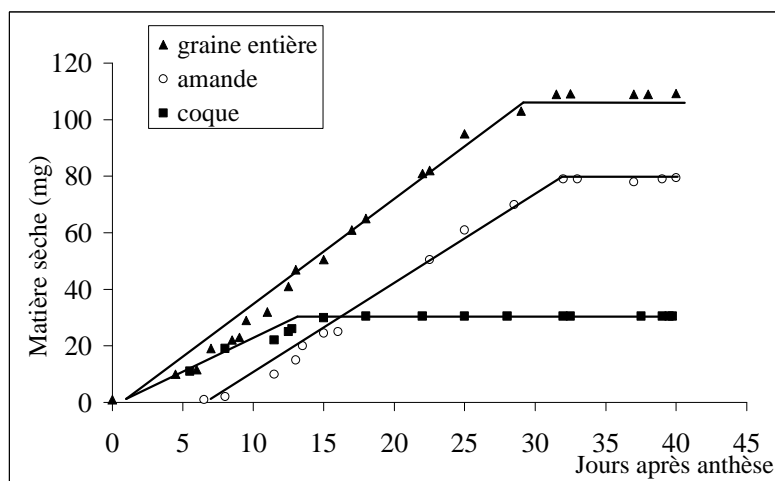


Figure 2 : Profil de croissance de la graine entière, de la coque et de l'amande au cours du cycle de croissance du tournesol (d'après Connor et Hall, 1997)

1.2. Composition de la graine

1.2.1. Constituants de la coque

La coque est formée de fibres de cellulose et de lignine (50 à 73% de la matière sèche (MS) et d'hémicellulose (20%), et représente entre 20 (hybrides modernes) et 40% (graines de bouche) de la biomasse graine totale (Connor et Hall, 1997). De larges différences de composition en constituants de la coque sont rapportées dans la littérature et portent essentiellement sur la teneur en lipides (0.9 à 7.1%/MS), en protéines (2.8 à 7.1 %/MS), en lignines+cellulose (50 à 68%/MS), hémicellulose (20 à 21%) (Bau *et al.*, 1983; Berot et Briffaud, 1983), et peuvent être attribuées soit à la présence en plus ou moins grande quantité du tégument riche en huile, localisée entre la coque et l'amande; soit au mode de stockage de la graine car la coque a tendance à absorber de l'huile (Laisney, 1984). Les protéines de la coque sont présentes en faible quantité, ce qui réduit le pouvoir nutritionnel du tourteau utilisé en alimentation animale (Tableau 1).

Tableau 1 : Composition des coques de tournesol en acides aminés

Acides aminés	%/MS	Acides aminés	%/MS
Acide aspartique	13.4	Tryptophane	4.4
Acide glutamique	10.1	Valine	1.6
Sérine	7.3	Méthionine	3.1
Glycine	7.3	Proline	7.3
Thréonine	5.8	Lysine	5.1
Asparagine	5.8	Arginine	3.6
Hydroxyproline	9.1	Leucine	2.2
Alanine	8.0	Phénylalanine	3.3
Histidine	2.5		

D'après Cancalon, 1971

1.2.2. Principaux constituants de l'amande

L'amande est le lieu de stockage des réserves de la graine nécessaires au développement de l'embryon. La graine de tournesol accumule essentiellement deux types de substances de réserve, les protéines et les lipides, représentant respectivement environ 20 et 50% de matière sèche graine. Ces valeurs, comme nous le verrons par la suite, varient selon le génotype et les conditions de culture. Les 38% restant reviennent aux carbohydrates et minéraux (14%), à l'eau (9%) et à la cellulose (15%).

1.2.2.1. Protéines de réserve

Durant le développement de l'akène, les protéines accumulées constituent une source d'azote, d'acides aminés et d'énergie pour la germination du futur embryon. Elles se composent d'oligomères de plusieurs peptides ayant des propriétés de solubilité différentes (classement selon Osborne, 1924). Ainsi, il existe 4 groupes de protéines présents chez le tournesol:

- les albumines, solubles dans l'eau et les tampons dilués à pH neutre,
- les globulines, solubles dans des tampons à fort pouvoir ionisant,
- les prolamines, solubles dans des solutions alcooliques,
- les glutélines, solubles dans des milieux acide et basique (Guégen, 1992).

Ces protéines de réserve sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) et transportées vers l'appareil de Golgi dans des vésicules formées à partir de la membrane du RE (« vacuole-corps protéique ») correspondant au site d'accumulation des protéines de réserve.

Les protéines de réserve dans la graine mature de tournesol représentent 55-60% de globulines, 17-23% d'albumines, 11-17% de glutélines et 1-4% de prolamines (Bauchot et Merrien, 1988).

La fraction globuline, plus généralement appelée hélianthinine chez le tournesol, appartient à la famille des protéines de type 12S et constitue la fraction majoritaire. Les fractions albumine (protéines 2S) et globuline sont appelées « protéines solubles ». Elles représentent environ 70% des protéines de la graine de tournesol. Cette répartition des fractions protéiques est spécifique au tournesol car chez le blé par exemple, ces protéines solubles ne représentent que 20% de l'ensemble des protéines tandis que chez le colza, c'est la fraction albumine qui est majoritaire. Le soja s'avère être la plante qui se rapproche le plus du tournesol avec 60 à 90% de globulines et une fraction albumine variant entre 10 à 20%.

Outre les protéines de réserve, les graines de tournesol contiennent d'autres protéines dont le rôle est lié aux mécanismes de défense. Elles sont peu connues à l'exception des oléosines. Ces dernières constituent une famille de protéines de faible poids moléculaire (15 à 26 KDa, Slack *et al.*, 1980) et localisées à la surface des globules lipidiques des graines et peuvent représenter 10 à 20% des protéines totales (Guégen, 1998). Elles sont présentes sous différents isoformes (Tzen *et al.*, 1990) et leur activité pourrait être régulée par des hormones, telles que l'acide abscissique (Hatzopoulos *et al.*, 1990). Leur rôle s'avère plus essentiel dans le catabolisme des réserves lipidiques que l'anabolisme car celles-ci constituent le site de fixation des lipases lors de la germination de la graine (Vance et Huang, 1988).

1.2.2.2. Lipides de réserve

Les lipides de réserve, composés s'accumulant majoritairement dans l'akène de tournesol, constituent une réserve d'énergie et une source de carbone nécessaire à l'embryon pour son développement.

Les lipides sont synthétisés dans la graine à partir du saccharose provenant du transfert d'assimilats des feuilles vers les graines. Le saccharose est converti en trois acides gras précurseurs, l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0) et l'acide oléique (C18:1), par les enzymes de la voie des pentoses phosphates, de la glycolyse et de la biosynthèse des triglycérides localisés dans le cytosol et les proplastides. A partir des proplastides, ces précurseurs sont transférés dans le réticulum endoplasmique, où ils subissent des modifications avant d'être enfermés dans des vésicules formées à partir de la membrane du réticulum endoplasmique et appelées oléosomes (ou corps gras).

1.2.3. Formation et accumulation des protéines et des lipides

La fraction protéique est le premier composant à s'accumuler dans les akènes de tournesol en formation. Dès le 10^{ème} jour après la floraison, la synthèse des protéines débute et se stabilise à partir du 22^{ème} jour (This *et al.*, 1988). La synthèse des lipides est initiée seulement quelques jours après le début d'accumulation de matière sèche des graines (Merrien, 1992) et se poursuit activement pendant 4 à 5 semaines après la floraison (Goffner *et al.*, 1988) pour atteindre une teneur maximale en fin de cycle, juste avant la maturité physiologique (Harris *et al.*, 1978). La répartition des deux composantes varie selon la position des graines sur le capitule: le poids moyen et la teneur en huile diminuent de la périphérie vers le centre tandis que la quantité de protéines augmente (Lencrerot *et al.*, 1977).

Les protéines des graines sont synthétisées à partir de la remobilisation de l'azote foliaire (Steer *et al.*, 1984) et des tiges (Blanchet, 1989). Cette remobilisation (sous forme de protéines solubles) serait d'autant plus forte et précoce que l'intensité lumineuse décroît (Merrien *et al.*, 1983). En situation de contrainte hydrique sévère, la synthèse de l'huile se fait à partir de saccharose néoformé dans les feuilles (Chenesseau *et al.*, 1984), et des composés glucidiques des tiges et des feuilles. Le transport des assimilats se fait préférentiellement sous la forme de saccharose (Yoneyama *et al.*, 1980). Ces assimilats glucidiques sont métabolisés en acides organiques à tous les niveaux de la plante, ou en acides aminés spécifiques du lieu de leur accumulation.

Selon Blanchet *et al.* (1990), plus les feuilles sont actives longtemps, plus la lipidogénèse est favorisée. Ceci vient du fait que la biosynthèse de l'huile requière trois fois plus d'énergie que la synthèse des glucides.

Le remplissage des graines, et notamment l'accumulation des lipides est largement conditionné par l'assimilation intervenant en phase post-florale (Blanchet *et al.*, 1982). A partir de la floraison, les composés glucidiques quittent les feuilles, et accessoirement la tige, et s'accumulent dans le capitule et les graines. Les lipides s'accumulent dans les graines principalement sous l'effet d'une activité photosynthétique tardive et à un moindre degré par l'utilisation des composés glucidiques des feuilles (Blanchet, 1987).

1.2.4. Constituants lipidiques

L'huile de tournesol est majoritairement constituée de triglycérides ou triacylglycérols (95 à 99% d'huile), contenant les acides gras. Les 1 à 5% restants renferment des composés dits « mineurs » en

raison de leur faible teneur; tels que des hydrocarbures, des alcools aliphatiques et triterpéniques, des tocophérols et des stérols (Prevost, 1987).

1.2.4.1. Acides gras

Les triacylglycérols sont constitués d'un glycérol estérifié par trois chaînes d'acides gras (Figure 3).

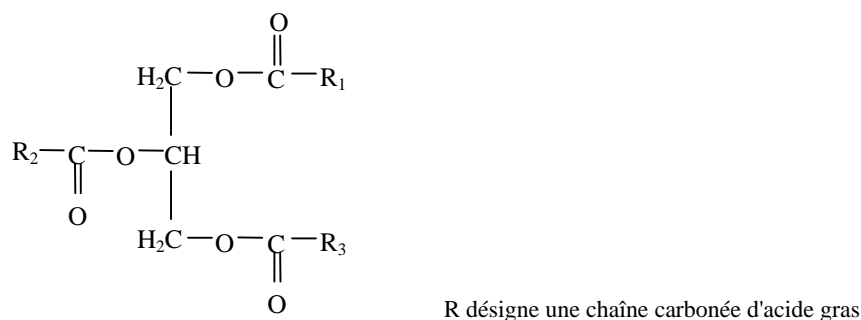


Figure 3 : Structure simplifiée d'un triglycéride

Les chaînes acyl d'acides gras liées au groupement glycérol sont saturées, mono ou poly insaturées. Dans les cellules eucaryotes, ces chaînes ne sont pas ramifiées et contiennent un nombre pair de carbones compris entre 6 et 24. Les acides gras majoritaires de la plupart des espèces oléagineuses cultivées (à l'exception du coprah) possèdent 16 à 18 carbones (annexe 1).

La chaîne aliphatique peut contenir une ou plusieurs insaturations (doubles liaisons) qui sont majoritairement en configuration *cis* et généralement en position 6, 9, 12 ou 15 (par rapport au carbone 1 portant la fonction carboxylique), et dans le cas des chaînes di- et poly-insaturées, il y a répétition successive du motif CH=CH-CH₂. La nomenclature actuelle permet de connaître le nombre de carbone et d'insaturations (par exemple l'acide oléique est noté C18:1 car il possède 18 carbones et une insaturation). La composition relative en acides gras des huiles de différentes espèces oléoprotéagineuses est présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Composition en acides gras des principales huiles et graisses végétales

Acides gras	Caproïdique	Caprylique	Caprique	Laurique	Myristique	Palmitique	palmitoléique	Stéarique	Oléique	Linoléique	Linoléique	Arachidique	Gadoléique	Béhénique	Erucique	Lignocérique
	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	C22:1	C24:0
Tournesol	/	/	/	/	<0,5	6	trace	5	18	69	<0,5	<0,5	<0,5	<1	/	/
Colza	/	/	/	/	/	5	<0,5	2	59	21	9	<0,5		<0,5	<1	trace
Olive	/	/	/	/	/	11	1	3	77	7	<1	trace	trace	/	/	/
Arachide	/	/	/	/	/	11	/	4	49	29	<0,5	2	1	3	<0,1	1
Soja	/	/	/	/	/	10	trace	4	23	53	8	<0,5	<0,5	<0,5	/	/
Maïs	/	/	/	/	/	11	trace	2	28	56	1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	
lin	/	/	/	/	trace	6	/	3	17	14	60	/	/	/	/	/
Palme	/	/	/	trace	1	44	trace	6	38	10	<0,5	<0,5	trace	/	/	/
Palmiste	<0,1	4	3	47	16	8	/	3	16	3	/	/	/	/	/	/
Coprah	1	7	6	46	18	9	/	3	8	2	/	/	/	/	/	/

D'après Harwood, 1988

La composition en acides gras des triglycérides de l'huile de tournesol varie d'un cultivar à l'autre. Globalement, l'huile de tournesol se compose d'environ 90% d'acides gras insaturés (acides oléique et linoléique) et 10 % d'acides gras saturés (acides palmitique et stéarique). Jusqu'en 1960, la production d'huile à base de tournesol provenait de cultivars classiques (ou standard) ayant une composition à dominante d'acides gras polyinsaturés (acide linoléique). L'apparition des premiers mutants riches en acide oléique et l'évolution des sélections ont permis de développer d'autres variétés qui ont fait du tournesol un sérieux concurrent des huiles hautement monoinsaturées (Delplanque, 2000). Historiquement, c'est en Russie qu'ont été réalisées les premières sélections de lignées à haute teneur en acide oléique par mutagenèse chimique (Soldatov, 1976). Actuellement, trois types de cultivars peuvent être rencontrés selon leur teneur en acide oléique: de 20 à 50%, les cultivars standard (classiques), de 50 à 70% les cultivars mi-oléiques et plus de 70%, les cultivars oléiques (Sadras et Villalobos, 1996). Le Tableau 3 présente la composition moyenne en acides gras d'huiles de tournesol standard, mi-oléique et oléique.

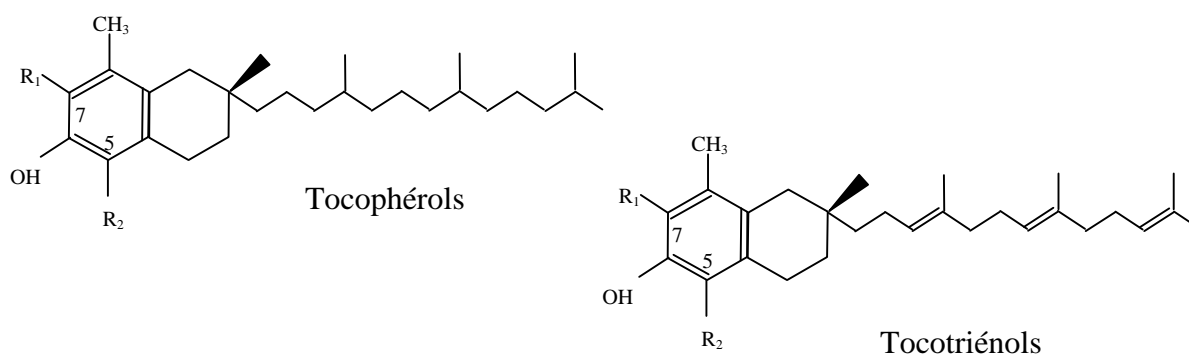
Tableau 3 : Composition en acides gras de tournesol classique, oléique et mi-oléique

Acides gras (%)	Tournesol classique ou standard	Tournesol mi-oléique	Tournesol oléique
C16:0 (%)	5-8	4-5	3-5
C18:0 (%)	3-7	3-4	3-5
C18:1 (%)	14-39	50-75	75-85
C18:2 (%)	48-74	20-30	7-17

D'après Morin, 2003

1.2.4.2. Tocophérols

Les tocophérols désignent un ensemble de molécules composées d'un noyau 6-OH-chromane, et d'une chaîne latérale à 16 atomes de carbone, de structure isoprénique (Léger, 2000). La chaîne carbonée existe sous deux formes: une forme comprenant trois insaturations: ce sont les tocotriénols; et la forme totalement saturée qui caractérise les tocophérols (Figure 4).

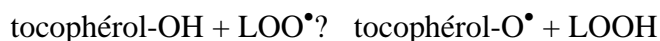
**Figure 4 : Structure moléculaire des tocophérols et tocotriénols**

Le noyau 6-OH chromane existe sous 4 formes différenciées par la présence ou non de groupements méthyle en position 5 ou 7 du noyau (Tableau 4).

Tableau 4 : Les quatre formes des tocophérols selon la position des groupements méthyle sur le noyau 6-OH-chromane

Forme	R ₁ (position 5)	R ₂ (position 7)
α	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H
γ	H	CH ₃
δ	H	H

Les tocophérols présentent des propriétés anti-oxydantes responsables de la stabilité oxydative de l'huile (Demir et Cetin, 1999). *In vivo*, L'αtocophérol, appelé vitamine E, a pour fonction d% protéger les structures sensibles à l'oxydation comme les lipides (essentiellement sous forme condensée dans les membranes et les lipoprotéines), les bases nucléotidiques de l'ADN et les protéines. L'activité anti-oxydante des tocophérols protège également les acides gras en éliminant les radicaux libres et les espèces oxygène réactives. D'ailleurs, chez le tournesol, il a été montré une corrélation positive entre le C18:2 et l'α tocophérol (Kamal-Eldin et Andersson, 1997). Dans ce mécanisme de protection, la vitamine E est oxydée sous une forme régénérable radicalaire : le chromane-6-oxyle α tocophérol[•] (Léger, 2000). Ainsi, une telle molécule a la capacité de capter et de stabiliser (par résonance) l'électron célibataire des radicaux libres, suivant la réaction suivante:



LOO[•]: radical libre lipidique

La composition en tocophérols varie selon les espèces et au sein d'une même espèce selon les génotypes. Parmi les oléagineux, le tournesol se situe entre le soja et le colza avec une teneur totale en tocophérols de 534 à 1848 μg.g⁻¹ d'huile selon les génotypes (Dolde *et al.*, 1999). Le Tableau 5 présente la composition en tocophérols et tocotriénols des principales huiles végétales. L'huile de tournesol renferme en majorité de l'α tocophérol bien que de récentes études proposent des génotypes dont la teneur en δ ou γ tocophérol est supérieure à celle de l'α tocophérol (Velasco et Fernandez-Martinez, 2003).

Tableau 5 : Teneurs en tocophérols (TP) et tocotriénols (TT) (μg.g⁻¹ d'huile) dans les principales huiles végétales

Huiles	α-TP	βTP	γTP	δTP	αTT	βTT	γTT	δTT
Tournesol	670	27	11	1	/	/	/	/
colza	202	65	490	9	/	/	/	/
Palme	89	/	18	/	128	323	72	630
Soja	100	8	1021	421	/	/	/	/
Maïs	282	54	1034	54	49	8	161	6

D'après Netscher, 1999

1.2.4.3. Phytostérols

Les stérols de plantes, appelés aussi phytostérols, sont des alcools stéroïdes, membres de la famille des triterpènes. Ils sont constitués d'un assemblage tétracyclique de cycles cyclopentaphenanthrène comprenant un groupement hydroxyle en position 3 du cycle A et une longue chaîne de 17 atomes

de carbone (Figure 5). Leur structure est dérivée de celle du cholestérol et ne diffère que par un groupement méthyle ou éthyle sur le carbone 24.

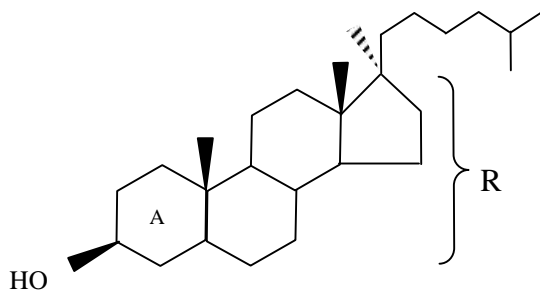


Figure 5 : Structure chimique du cholestérol (5a-cholestan-3b-ol) d'après Piironen et al., 2000

Les phytostérols sont synthétisés à partir du squalène via la voie du mévalonate du métabolisme des isoprénoïdes, lui-même issu de 2 molécules d'acétylCoA provenant de la glycolyse. (Figure 6).

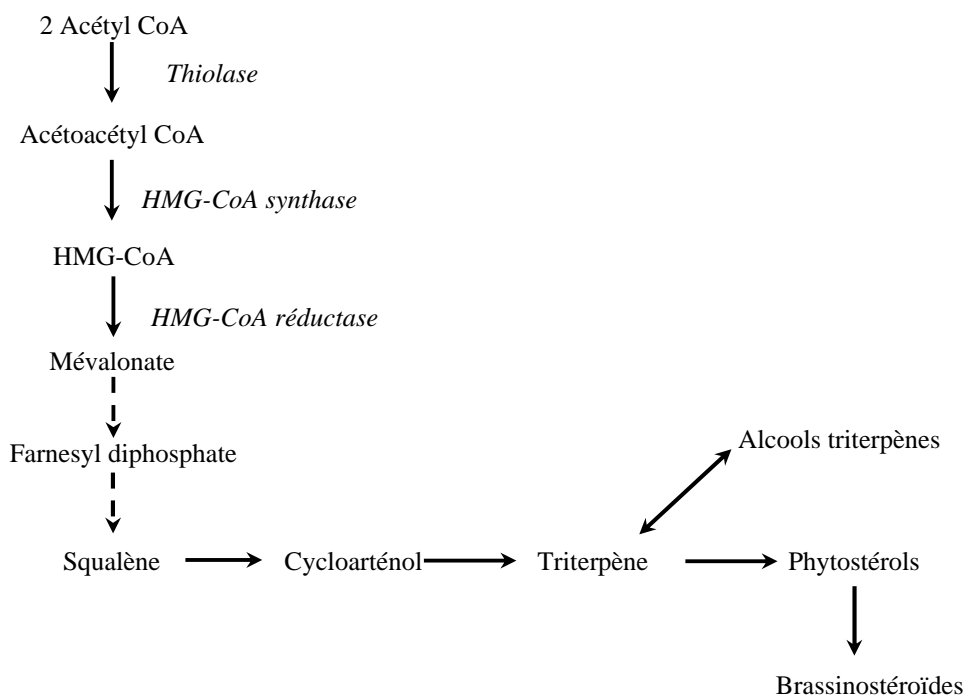


Figure 6 : Schéma simplifié de la biosynthèse des phytostérols et triterpènes

La biosynthèse des phytostérols proprement dite débute par la réduction du HMG CoA (3-hydroxy-3méthyl glutaryl CoenzymeA à 6 atomes de carbone) en mévalonate (5 atomes de carbone) catalysées par l'enzyme HMGCoA réductase. 6 unités mévalonate sont ensuite assemblées en 2 molécules de farnesyl diphosphate pour ensuite être condensées en une molécule de squalène (30

atomes de carbone ou triterpènes). Puis le squalène est transformé en cycloarténol (30 carbones) qui constitue le précurseur de synthèse des alcools triterpènes, des phytostérols et des brassinostéroïdes. Les phytostérols peuvent être regroupés en 3 catégories selon leur degré de méthylation et leur position dans la voie de biosynthèse (Figure 7).

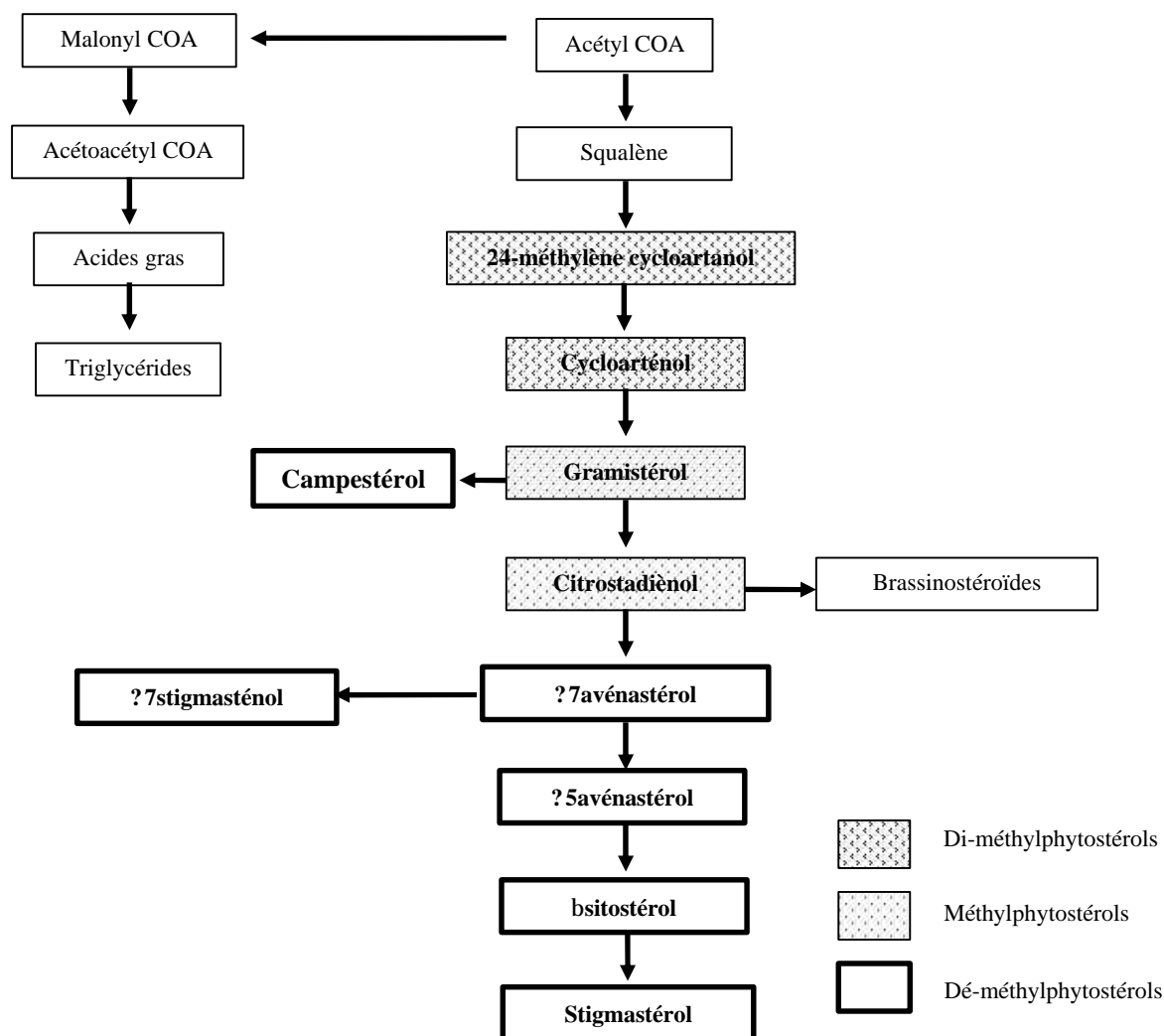


Figure 7 : Chaîne de biosynthèse des différents phytostérols, d'après Piironen *et al.*, 2000

La première classe concerne les stérols comprenant 2 groupements méthyl: les 4,4-diméthylstérols. La seconde catégorie regroupe les stérols à 1 groupement méthyl: les 4 α -méthyl stérols. Ces deux types de composés sont les premiers intermédiaires de la voie de synthèse des triterpènes et présentent les teneurs les plus faibles dans la graine de tournesol mature. Les 4-déméthylstérols représentent la dernière catégorie et constitue les produits finaux de la forme phytostérolique accumulée. Ces derniers concernent les Δ^5 -stérols, les Δ^7 -stérols et les $\Delta^{5,7}$ -stérols selon la position et le nombre de doubles liaisons sur le cercle B. La nomenclature chimique réservée aux stérols est

complexe et inconfortable à utiliser; c'est pourquoi d'autres terminologies leur ont été attribuées de manière à simplifier leurs appellations. Ainsi, par exemple, le 24-méthylène lophénol a été rebaptisé gramistérol.

La plupart des phytostérols, comme le campestérol et le β sitostérol, ont une liaison Δ^5 ainsi qu'un ou deux carbones additionnels substitués à la chaîne latérale au niveau du carbone 24. Les structures moléculaires des principaux phytostérols du tournesol sont schématisées dans l'annexe 2. Ces substitutions de groupements méthyle ou éthyle sont introduites par des réactions de *trans*-méthylation et peuvent avoir une chiralité α ou β . La plupart des 24-éthyl stérols sont des épimères en α alors que les 24-méthyl stérols sont un mélange d'épimères en α et en β . L'alkylation du carbone 24 est une réaction spécifique des plantes (Goodwin, 1980). Une autre caractéristique spécifique aux stérols de plantes repose sur la présence fréquente de double liaison située entre le carbone 22 et le carbone 23 sur la chaîne latérale (liaison *trans*- Δ^{22}).

Les stérols sont présents sous différentes formes chez les plantes. La forme libre est la plus fréquemment rencontrée. Ils peuvent néanmoins se présenter sous une forme estérifiée avec un acide gras ou un acide phénolique via le groupement hydroxyle (3-OH) présent sur le cycle A, être liés à un sucre (liaison β en position 1') et former des stéryl-glucosides, ou à un sucre déjà estérifié par un acide gras en position 6': c'est la forme stéryl-glucosides acétylée (Figure 8).

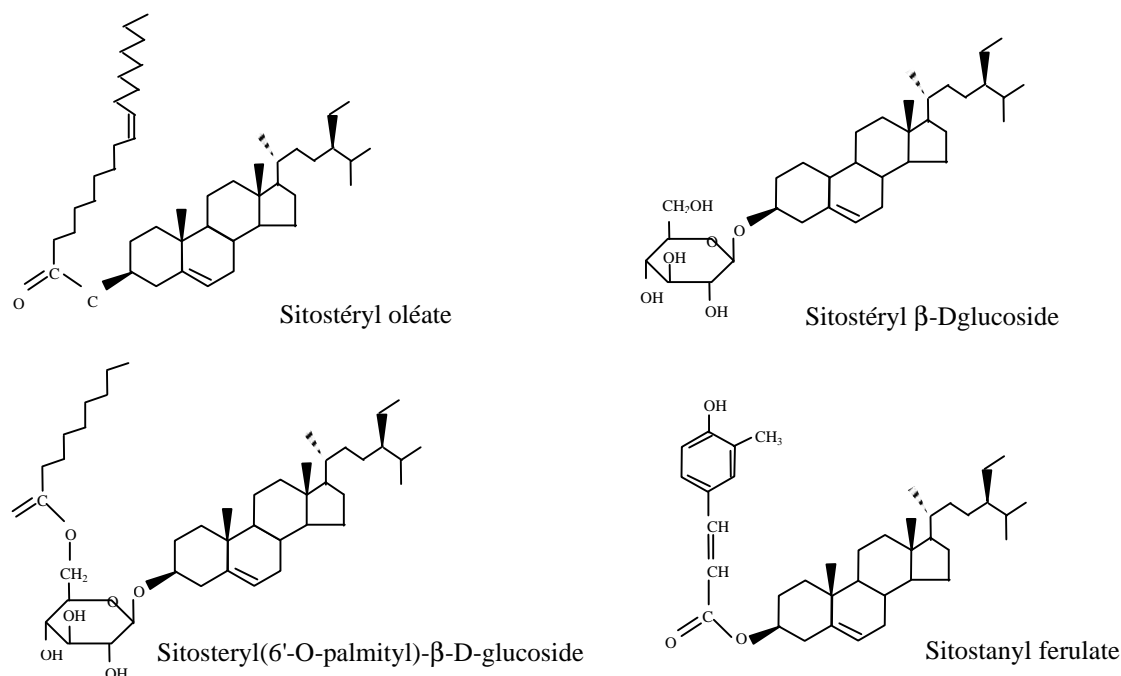


Figure 8 : Exemples de structures conjuguées de stérols, d'après Piironen *et al.*, 2000

Les phytostérols entrent dans la composition des membranes cellulaires *in planta* (plasmalemme, membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique). Ils jouent un rôle important dans leur structure et leurs fonctions notamment en modifiant leurs propriétés de fluidité. En effet, le groupement hydroxyle des stérols libres est capable d'interagir spécifiquement avec les phospholipides constitutifs de la bicouche membranaire et de réguler sa perméabilité (Piironeen *et al.*, 2000). Il en est de même pour les stérylglycosides et les stérylglycosides acétylés qui sont présents dans les membranes grâce à leur groupement osidique polaire (Benvenis, 1985). Il a été montré qu'un ratio stérols/phospholipides élevé conduit à rigidifier les membranes (Itzhaki *et al.*, 1990). Cependant, les effets des phytostérols sur la régulation de la stabilité des membranes cellulaires varient selon la composition stérolique. Le sitostérol et le campestérol apparaissent comme les plus efficaces. Certains auteurs suggèrent que la variation de leur concentration relative, pourrait être liée à l'adaptation des plantes aux variations de températures (Palta *et al.*, 1993). Aussi, les stérols végétaux seraient également impliqués dans de plus larges phénomènes d'antioxydation après extraction de l'huile (Abidi, 2001).

De par leur position au sein de la membrane, ils participent au contrôle des processus métaboliques qui sont associés aux membranes, notamment l'activité des enzymes, le transport ionique et métabolique ainsi que la transduction de signaux. Grandmougin-Ferjani *et al.* (1997) ont montré que les stérols végétaux stimulent l'activité ATPase membranaire des racines de maïs. Ces résultats suggèrent la présence de sites de liaison spécifiques aux stérols. Néanmoins, ces mécanismes dépendent de la composition en stérols membranaires. Dans cette fonction, une teneur plus élevée en stigmastérol stimule la pompe protonique tandis que d'autres phytostérols agissent comme des inhibiteurs.

Jusque dans les années 90, l'importance biologique des stérols était souvent prioritairement associée à leur rôle au sein des membranes. La création de mutants déficients en segments de gènes contrôlant la biosynthèse des stérols a permis d'approcher plus finement leurs rôles dans le développement. Ainsi, la caractérisation de ces mutants a révélé le rôle déterminant des stérols dans la division et la différenciation cellulaire, et plus particulièrement dans la signalisation et/ou la régulation du développement embryonnaire et post-embryonnaire (Schaller, 2003).

Les stérols interviennent également dans la synthèse des brassinostéroïdes, composés encore mal connus chez les végétaux, qui seraient impliqués dans la régulation de la croissance comme la majorité des hormones végétales (Asami et Yoshida, 1999; Chappell, 2002). Les stérols joueraient donc un rôle au niveau de l'élongation et la différenciation cellulaire. La teneur en stérols est

maximum dès la germination des graines et diminue graduellement au cours de la croissance de la plante (Guo *et al.*, 1995).

La majorité des huiles végétales contiennent 1 à 5g de stérols/kg d'huile, soit 100 à 500mg/100g d'huile (Piironeen *et al.*, 2000). La classe de stérols majoritairement représentée dans les huiles végétales correspond à celle des démethylstérols. Leur proportion atteint 85% pour la plupart des huiles végétales. Chez le tournesol, il existe 4 chaînes stéroliques différentes. Le β sitostérol est le composé le plus abondant dans l'huile de tournesol et bien que sa proportion varie selon les espèces, il représente plus de 50% des démethylstérols devant le campestérol et le stigmastérol. L'huile de tournesol ne renferme que très peu de squalène et de cholestérol, ce qui lui confère un avantage d'un point de vue nutritionnel, par rapport notamment aux huiles monoinsaturées, telles que l'huile d'olive (Miettinen et Vanhanen, 1994).

Le Tableau 6 présente les gammes de variation de concentration en stérols dans l'huile de différentes cultures. Le colza renferme le maximum de phytostérols totaux (5.13-9.79 g/kg). En seconde position, l'huile de tournesol possède des concentrations variant de 374 à 725 mg/100g d'huile et la plus forte teneur en β sitostérol.

Tableau 6 : Composition en stérols majeurs des principales huiles végétales (g/kg)

Huiles	Phytostérols totaux	β sitostérol	Campestérol	Stigmastérol	Δ 5avénastérol
Colza	5.13-9.79	2.84-3.58	1.56-2.48	0.02-0.04	0.13-0.19
Tournesol	3.74-7.25	4.65	0.69	0.75	0.28
Soja	2.29-4.59	1.22-2.31	0.62-0.76	0.45-0.76	/
Olive	1.44-1.50	1.18-1.21	0.05	0.01	0.17-0.18
Palme	0.71-1.17	0.72	0.23	0.04	0.02

D'après Piironen *et al.*, 2000

2. Eléments du métabolisme lipidique

Outre leur rôle de stockage de l'énergie cellulaire par l'intermédiaire des triglycérides, les lipides sont impliqués dans de nombreux processus de la vie cellulaire. Au niveau de la plante entière, les lipides prennent part à l'édification des structures de protection de surface des organes aériens (cires). Au niveau cellulaire, les lipides polaires (phospholipides) participent largement à la constitution des membranes biologiques (plasmalemme, membranes chloroplastique et mitochondriale...). Ils assurent ainsi la séparation de compartiments cellulaires ainsi que la capacité à s'adapter à certaines variations environnementales, telles que les changements de température qui entraînent des modifications de la composition en acides gras poly-insaturés des ces lipides membranaires. Les lipides peuvent étendre les fonctionnalités des protéines par le biais d'acylation (greffage d'un radical acyl sur une protéine) ou être impliqués dans la signalisation intra et extra cellulaire, ainsi que dans certains mécanismes de défense cellulaire.

Les lipides sont définis sur la base de leurs propriétés de solubilité dans les solvants organiques, plutôt que sur celles de leurs structures chimiques. Ainsi, le terme « lipide » regroupe de nombreuses molécules issues de divers métabolismes (acides gras, composés isoprénoïdes...). Nous nous intéresserons ici uniquement aux molécules issues du métabolisme des acides gras. En tant que constituants de réserve majeurs des graines de tournesol, il existe une phase spécifique d'accumulation des lipides au cours du développement de la graine déterminante pour la composition finale de celle-ci. Les connaissances actuelles sur la formation et la transformation des lipides seront décrites au cours de cette partie de façon à préciser les éléments métaboliques nécessaires à la compréhension de l'élaboration de la composition de la graine de tournesol.



(Champ de tournesol au stade végétatif, J. Roche)

2.1. Néosynthèse des acides gras

Chaque cellule est autonome en ce qui concerne la synthèse des lipides (Sommerville et Browse, 1991). Cette synthèse se déroule en plusieurs phases correspondant à la formation de différents constituants de la fraction lipidique de la graine. L'établissement des proportions en chacun des constituants résulte de l'équilibre de différents phénomènes de synthèse et de conversion. Cette chaîne métabolique débute par la biosynthèse des acides gras constitutifs des triglycérides de l'huile qui se réalise dans les plastes (Figure 9).

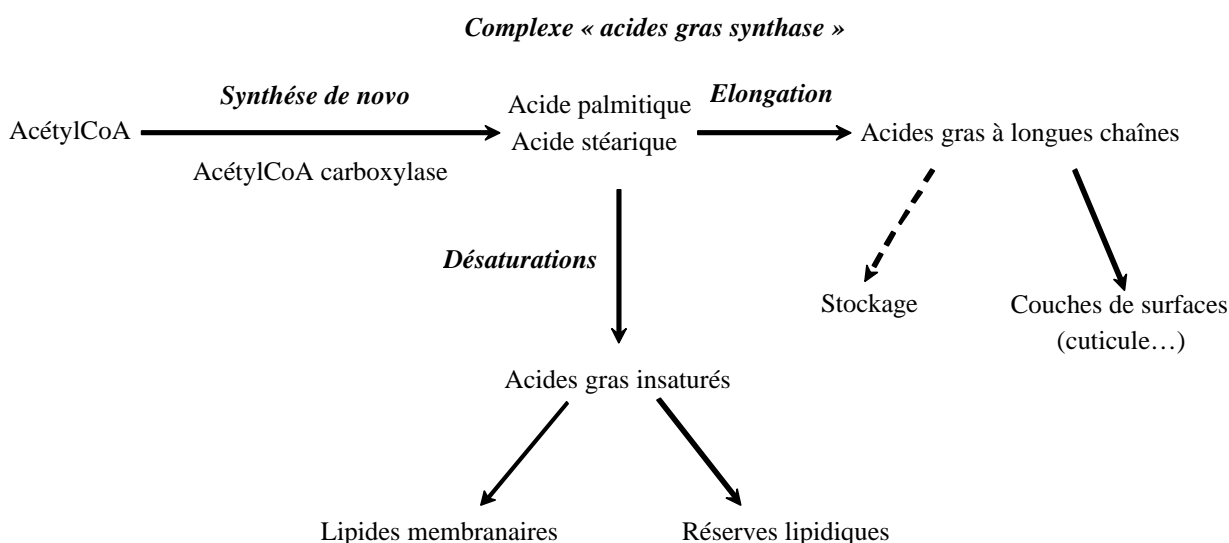


Figure 9 : Réactions simplifiées de la synthèse des lipides végétaux (d'après Harwood, 1998)

La biosynthèse des acides gras se déroule en plusieurs phases: une phase d'activation, une phase de formation/élongation, une phase de désaturation, une phase de transport. Ces différentes phases font intervenir des enzymes spécifiques que nous détaillerons au cours de cette première partie, et qui se déroulent dans des compartiments déterminés.

2.1.1. Source de C

La formation des acides gras est initiée dans les chloroplastes des tissus végétatifs ou dans les plastes des tissus non chlorophylliens tels les graines (Ohlrogge *et al.*, 1979). Le saccharose transporté par le phloème (sève élaborée) constitue le pool de carbone utilisé pour la synthèse des acides gras. Converti en molécule de glucose, celui-ci entre dans la glycolyse pour donner une molécule d'acétylCoA, chaîne acyl à l'origine des acides gras.

Il existe deux sources de production de l'acétylCoA. La première provient des cellules non chlorophylliennes des plastes de graines qui renferment l'ensemble des enzymes nécessaires aux réactions appartenant à la glycolyse, telle que la pyruvate deshydrogénase (Reid *et al.*, 1977) et à la voie des pentoses phosphate (Stitt et Ap Rees, 1979). Ces deux mécanismes permettent de fournir le pouvoir réducteur (NADH, H⁺ et NADPH, H⁺) et de l'énergie (ATP), ainsi que le glucose nécessaires à la synthèse des acides gras (Browse, 1997) (annexe 3).

Luthra *et al.* (1991) ont montré que l'accumulation d'amidon peut également servir de réserve transitoire à la biosynthèse lipidique dans la mesure où cette forme fournit, par action de la β -amylase, le glucose nécessaire à la formation des acides gras. Néanmoins, ce pool énergétique utilisé pour la synthèse des lipides serait rediriger vers celle des acides aminés en fin de cycle de développement.

La seconde source de carbone possible est l'acétate libre qui est produit au niveau des mitochondries par l'activité de la pyruvate deshydrogénase et redirigé vers les plastes jusqu'à l'acétate deshydrogénase. Cette seconde source pourrait exister au niveau des feuilles et serait davantage impliquée dans les réactions d'élongation des acides gras.

L'acétylCoA est également impliquée dans beaucoup d'autres synthèses telles que celle des acides aminés et, par conséquent des protéines (Figure 10), ou encore des phytostérols. La position centrale de cette molécule dans les chaînes de biosynthèse des différents constituants de la graine pourrait expliquer en partie les variations de teneurs finales dans la graine.



(Capitules en serre, J. Roche)

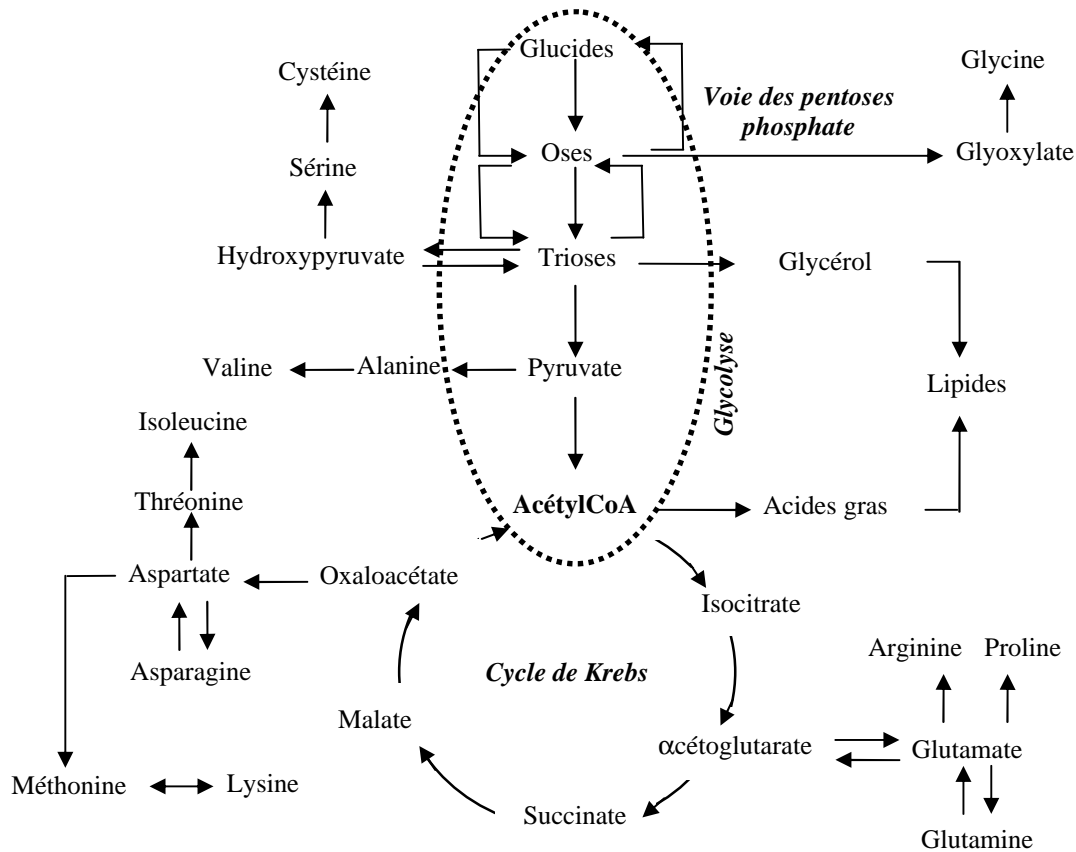


Figure 10 : Rôle central de l'acétylCoA dans les métabolismes des espèces oléoprotéagineuses (source: Bonjean, 1993)

2.1.2. Phase d'activation

La synthèse des acides gras est initiée par une enzyme clé du métabolisme des acides gras: l'acétylCoA carboxylase. Dans le chloroplaste, cette enzyme permet de former le précurseur de la synthèse *de novo* des acides gras, malonylCoA à partir de l'acétylCoA en présence de CO₂ et d'ATP (Harwood, 1988). Bien que son mécanisme d'action soit encore relativement mal connu, certains auteurs ont montré que cette enzyme est activable par la lumière et qu'elle serait impliquée dans la régulation de la formation des acides gras (Roesler *et al.*, 1997).

2.1.3. Phase de formation/élongation

La formation proprement dite des acides gras se réalise par une phase d'élongation qui se déroule en cycles, par l'intermédiaire d'un complexe enzymatique multipolypeptidique communément regroupé sous le terme « acides gras synthase » (FAS). Ce complexe est de type procaryotique car il est apparu extrêmement comparable aux complexes enzymatiques de synthèse des acides gras des

bactéries. Le complexe FAS des végétaux est classé de type II par opposition au type I présent exclusivement chez les autres eucaryotes et les levures (McCarthy et Hardie, 1984).

Chez les plantes, la synthèse des acides gras s'effectue en 4 étapes. Ces différentes opérations permettent l'élongation de la chaîne acyle d'acides gras par adjonctions successives de deux carbones (Figure 11).

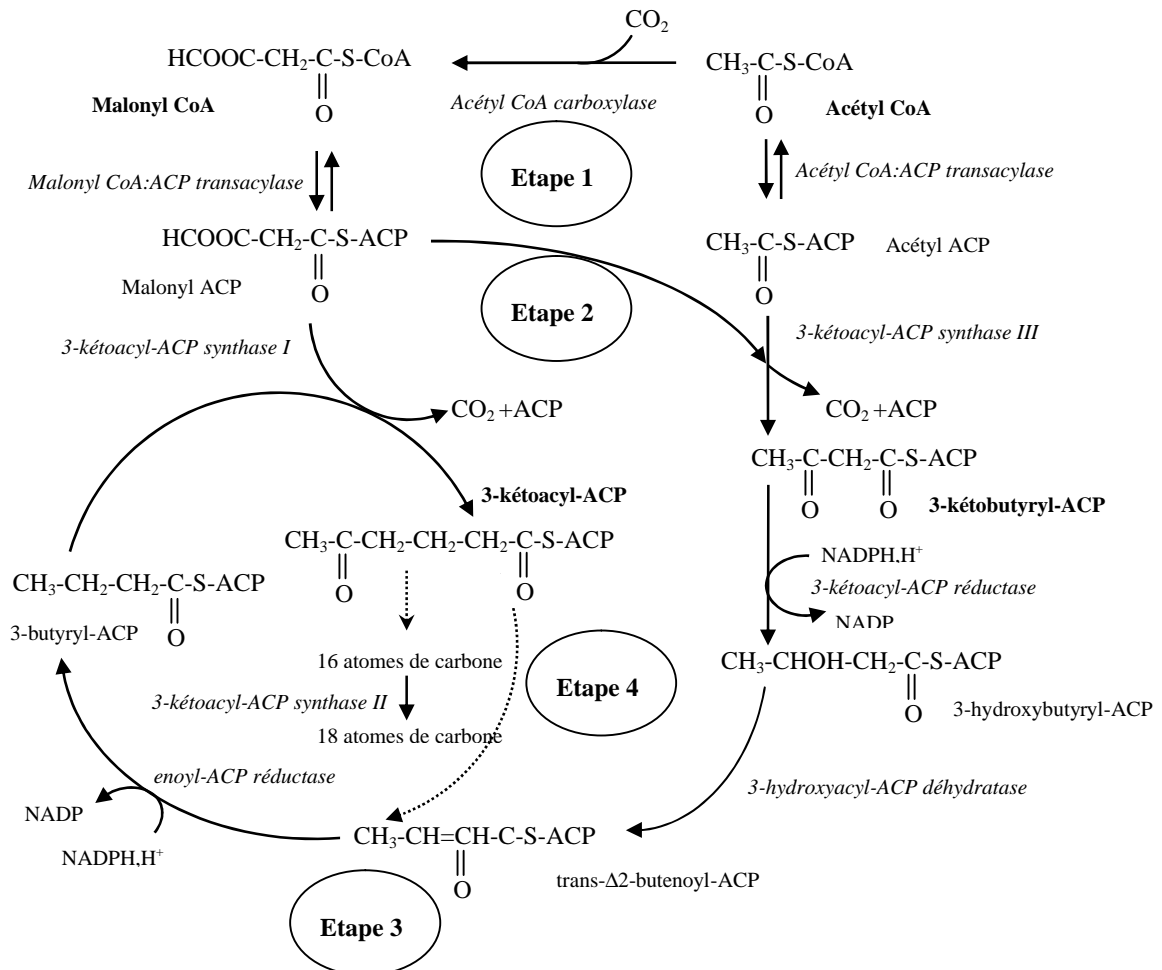


Figure 11 : Mécanisme de synthèse des acides gras (source: Browse, 1997)

Suite à l'activation de l'acétylCoA et la formation du malonylCoA, la première étape correspond au transfert des molécules de malonyl puis d'acétyl sur une protéine de poids moléculaire d'environ 10 KDa: « l'acyl-carrier-protein » (ACP). Le groupement prosthétique de l'ACP permet d'accrocher la chaîne acyle en élongation et de la transporter d'une enzyme à l'autre tout au long de la synthèse. La seconde étape permet d'initier le premier cycle de synthèse de la chaîne acyle portée par une ACP par condensation d'un groupement acétyl provenant du malonyl-ACP sur un acétyl-ACP. Dans la troisième étape, le groupe 3-kétoacyl-ACP ainsi formé subit différentes modifications (réduction, déshydratation et une dernière réduction) par l'action des enzymes du complexe FAS.

Cette étape se termine par la fixation d'un groupement acétyl provenant du malonyl-ACP permettant de former une chaîne de 6 carbones (3-kétoacyl-ACP). La dernière étape permet d'ajouter 2 carbones de manière cyclique jusqu'à l'obtention d'une chaîne de 16 et 18 carbones (étape 4).

2.1.4. Phase de désaturation

Cette phase permet l'introduction d'une double liaison dans la chaîne acyle d'acides gras en formation. Selon l'utilisation finale des acides gras dans la cellule végétale (acides gras constitutifs des membranes cellulaires et de celles des organites), différentes enzymes de désaturation interviennent. Leur localisation détermine le type de substrat utilisé (Murphy et Piffanelli, 1988). Ainsi, les désaturases solubles situées dans le stroma modifient exclusivement les acides gras liés à une ACP, alors que celles qui sont liées à la membrane agissent sur les acides gras libres ou liés à d'autres complexes de la biosynthèse des lipides (phosphatidylcholine, phosphatidylglycérol, monogalactosyl diacylglycérol) que nous préciserons par la suite. Dans cette partie, seules les désaturases permettant la formation des acides gras constitutifs des réserves lipidiques de la graine seront détaillées.

2.1.4.1. Désaturation des acides gras saturés

Avant que les acides gras synthétisés et portés par une ACP ne quittent le stroma pour d'autres modifications (élongation, désaturation, condensation avec le glycérol), l'acide stéarique (C18:0-ACP) peut subir une désaturation qui le transforme en acide oléique (C18:1-ACP).

Cette réaction est catalysée par la stéaroyl-ACP $\Delta 9$ désaturase (Mc Keon et Stumpf, 1982) et permet l'introduction d'une double liaison entre le carbone 9 et 10. Cette enzyme a été purifiée chez plusieurs espèces dont le tournesol (Griffiths *et al.*, 1998). Elle utilise la ferredoxine comme donneur d'électrons (Stumpf, 1984) et nécessite la présence d'oxygène moléculaire, de pouvoir réducteur via les photosystèmes I et II (NADPH, H⁺) et de l'activité ferredoxine oxydoréductase. Cette enzyme possède deux substrats préférentiels: le stéaroyl-ACP et le palmitoyl-ACP. Avec une vitesse maximum d'activité enzymatique (V_{max}), le stéaroyl-ACP constitue le premier substrat qu'elle utilise. C'est pourquoi on rencontre davantage d'acide palmitique dans les triglycérides végétaux par rapport à l'acide stéarique (Mc Keon et Stumpf, 1982). Cette enzyme s'avère essentielle pour la production des acides gras insaturés des lipides membranaires ainsi que ceux liés aux triglycérides dans les réserves lipidiques.

D'un point de vue moléculaire, plusieurs études (Cahoon *et al.*, 1994), dont une sur le tournesol. Kabbaj *et al.* (1996) ont montré qu'il existe plusieurs gènes, donc plusieurs isoformes de cette enzyme. Ces isoformes pourraient coexister dans un même tissu et serait activée indépendamment selon la période du cycle (Cahoon *et al.*, 1994). Ces gènes présentent une régulation de type environnementale et temporelle et leur expression dépend du tissu, du stade de développement de l'embryon (Slocombe *et al.*, 1992). Ainsi, l'acide abscissique induit en réponse à un stress hydrique a été identifié comme activateur de la $\Delta 9$ désaturase (Slocombe *et al.*, 1994). Kabbaj *et al.* (1996) ont montré que le gène de cette enzyme est exprimée préférentiellement par une hausse de température (26/22°C par rapport à 20/18°C jour/nuit).

2.1.4.2. Désaturation de l'acide oléique

La principale enzyme de désaturation présente dans les graines est l'oléoylphosphatidylcholine $\Delta 12$ désaturase. Cette enzyme est localisée au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Cette position implique un déplacement de l'acide oléique jusqu'alors localisé au niveau des plates, vers le cytosol. Ce transfert se fait via une enzyme thioestérase qui est responsable de l'hydrolyse de l'ACP de l'acide oléique auquel il est lié.

L'enzyme $\Delta 12$ désaturase catalyse la formation d'une double liaison sur l'acide oléique entre le carbone 12 et 13. Elle joue un rôle important puisqu'elle permet la synthèse des acides gras poly-insaturés largement majoritaires dans les huiles d'oléoprotéagineux.

Le substrat principal de l'enzyme est l'acide oléique lié à un lipide phosphatidylcholine cytosolique (Murphy *et al.*, 1985). D'un point de vue catalytique, chez le tournesol, l'enzyme nécessite la présence d'un donneur d'électrons (cytochrome b_5), d'oxygène moléculaire, de pouvoir réducteur (NAD(P)H, H^+) et de l'activité NADH:cytochrome b_5 réductase (Gray et Kekwick, 1996).

Chez le soja, Heppard *et al.* (1996) ont montré qu'il existe deux systèmes enzymatiques de désaturation impliquées dans la biosynthèse des acides gras insaturés. L'un est constitutif de la plante entière tandis que l'autre a une expression spécifique à la graine. Dans le cas du tournesol oléique, la modification de la teneur en C18:1 n'intervient pas dans la partie végétative de la plante, ce qui prouve que l'expression du gène muté responsable du caractère oléique est également spécifique à la graine (Garcés et Mancha, 1989). D'ailleurs, Lacombe *et al.* (2004) précisent que, seul le mécanisme de désaturation akène spécifique est déficient chez les tournesols mutants oléiques, puisque ces derniers présentent une teneur en C18:1 *intra* graine supérieure à 80% alors que la composition en acides gras membranaires n'est pas modifiée. Une séquence d'ADNc de $\Delta 12$

désaturase homologue à 68,8% avec celle d'*Arabidopsis* chez le tournesol a été clonée et présente en effet une expression graine spécifique (Hongtrakul *et al.*, 1998).

2.1.5. Phase de transport ou d'export

La majorité des acides gras saturés liés à une ACP sont dirigés vers le compartiment cytosolique. Ce transfert s'effectue par l'intermédiaire d'enzymes permettant le passage de la membrane des thylacoïdes: les acyl-ACP thioestérases. Ces enzymes sont principalement localisées dans la membrane interne des plastes (Voelker, 1996).

Une faible proportion d'acide palmitique (C16:0) est libérée par une acyl-ACP thioestérase de la famille FatB (Jones *et al.*, 1995), la majorité étant transformée en C18:0-ACP et désaturée en C18:1-ACP. L'acide stéarique lié à l'ACP (C18:0-ACP) est très peu exporté hors du chloroplaste, les acides palmitique et oléique constituent les substrats principaux des réactions ayant lieu dans les autres compartiments. Ces deux acides gras sont pris en charge par une acylCoA synthase pour former l'acylCoA-C18:1 et le C16:0-CoA et entrer dans la voie de synthèse des glycérolipides (Styme et Stobart 1987) permettant la formation de l'ensemble des composés lipidiques.

D'après Triki *et al.* (1997), la graine de tournesol élabore dans un premier temps les lipides constitutifs des membranes (lipides polaires), à la 3^{ème} semaine après floraison. Ce n'est qu'entre la 3^{ème} et la 5^{ème} semaine que la graine acquiert ses propriétés de tissu séminal de réserve correspondant à la synthèse des triglycérides. L'élaboration s'explique par le simple fait que la synthèse des lipides s'effectue dans différents compartiments que les acides gras atteignent progressivement au cours de la maturation de la graine.

2.2. Biosynthèse des glycérolipides

Deux voies de biosynthèse des glycérolipides coexistent dans la cellule végétale (Roughan et Slack, 1982). La première voie se déroule dans les chloroplastes et conduit à la synthèse des phospholipides constitutifs de la membrane des plastes, nécessaires au fonctionnement cellulaire (majoritairement les monogalactosyldiacylglycérols), c'est la voie « procaryotique ». La seconde voie conduit systématiquement à l'exportation des estersCoA dans le cytoplasme. Elle concerne la biosynthèse des phospholipides des membranes des autres organites ainsi que des formes de réserve de la graine (correspondant à la transformation des acides gras néo-formés en glycérides) et se déroule dans le cytosol au niveau du réticulum endoplasmique: c'est la voie « eucaryotique ».

2.2.1. Voie procaryotique

Les acides gras synthétisés dans le chloroplaste sont rapidement utilisés pour former l'acide lysophosphatidique (LPA) (annexe 4). Cette réaction catalysée par l'Acyl-ACP:glycérol-3P acyl transférase permet de condenser l'acide oléique (C18:1) venant du pool de C18:1-ACP sur la molécule de 3-phospho-glycérol correspondant à la structure de base des triglycérides. L'acide oléique est ainsi transféré sur le carbone 1 du glycérol (position *sn-1*). Une seconde enzyme (l'acyl-ACP-1:acide lysophosphatidique acyltransférase) permet de fixer l'acide palmitique (C16:0) sur le monoacylglycérol-3-phosphate néoformé en position 2 du glycérol (position *sn-2*) pour former l'acide phosphatidique (PA). Cet acide est le point central de la synthèse des différents glycérolipides fonctionnels (phospholipides membranaires plastidiaux). Il donne naissance, d'une part, au diacylglycérol (DAG) par déphosphorylation qui conduit, par condensation d'un sucre en position 3, à la formation des monogalactosyldiacylglycérols (MGDG); et d'autre part, à la formation du digalactosyldiacylglycérol (DGDG), des sulfolipides (SL) et du phosphatidylglycérol (PG).

Les acides gras ainsi liés sont le siège d'autres modifications au sein du stroma telles que les désaturations ou élongations (présence des désaturases $\Delta 12$ et $\Delta 15$, et d'élongases à l'origine des acides gras en C20) permettant l'obtention de chaînes d'acides gras poly-insaturées nécessaires au fonctionnement des plastes.

2.2.2. Voie eucaryotique

Les acides gras exportés vers le cytosol et fixés au Coenzyme A constituent les éléments de base de la synthèse des lipides des autres compartiments. C'est au passage de la membrane externe des plastes que les acides gras sont repris par l'acyl-CoA synthétase pour être estérifiés en acyl-CoA avant d'être libérés dans le cytosol (Ichihara *et al.*, 1997). Cette sortie constitue le pool d'acides gras qui servira à former les lipides des membranes nucléaire, mitochondriale, du réticulum endoplasmique, et les corps gras dans les graines.

Contrairement à la voie procaryotique, les glycérolipides synthétisés dans le cytosol possèdent un acide oléique en position 2 sur la chaîne carbonée du glycérol. Cette position de l'acide oléique permet de différencier l'origine chloroplastique ou cytosolique des glycérolipides synthétisés (Sommerville et Browse, 1991).

Ainsi, ce pool d'acylCoA constitué conduit dans un premier temps à la formation du DAG cytosolique (Figure 12). Le DAG servira de base à la synthèse de phosphatidylcholine (PC),

molécule clé dans le métabolisme lipidique. Celle-ci a un rôle primordial car elle sert de support de base pour la désaturation des acides gras qui lui sont liés (Triki *et al.*, 1997), en particulier l'acide oléique, qui donne naissance aux acides gras poly-insaturés nécessaires au fonctionnement cellulaire. La PC peut aussi échanger les acides gras qu'elle porte en position 2 avec ceux du pool d'acyl-CoA présent dans le cytosol et donner lieu à l'apparition des acides gras libres poly-insaturés de ce compartiment.

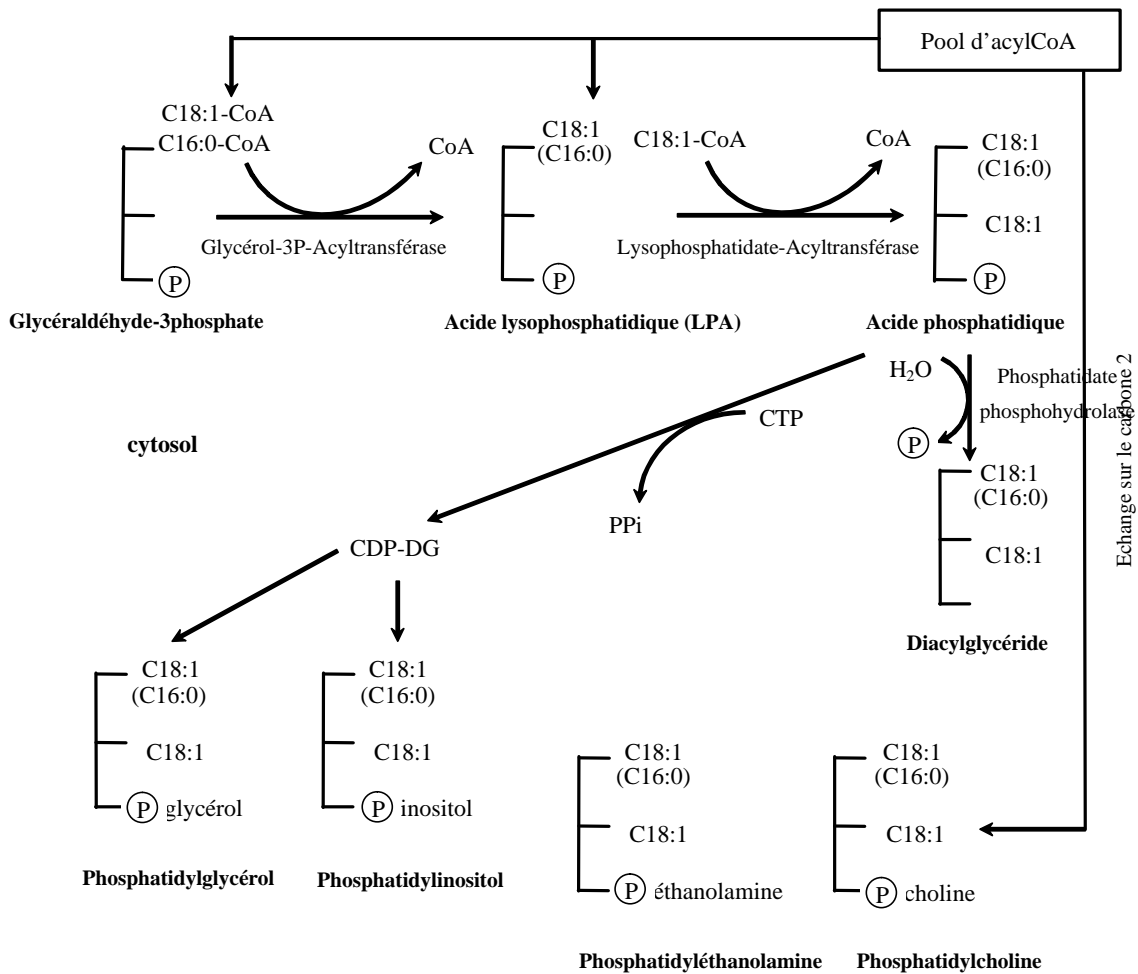


Figure 12 : Formation des lipides membranaires des autres organites et des glycérolipides de réserves (Somerville *et al.*, 1991)

Les enzymes désaturases sont présentes au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique ou dans le cytosol.

Il a été suggéré qu'une partie des lipides synthétisés dans le cytosol retourne vers le chloroplaste pour la synthèse des lipides membranaires de plastides: on l'appelle la voie coopérative de la synthèse des lipides plastidiaux (Trémolières, 1998). Néanmoins cette voie est encore mal connue (Arondel et Kader, 1990) et les processus mis en jeu sont encore à l'étude.

2.3. Elaboration des réserves lipidiques

2.3.1. Biosynthèse des triglycérides

Les triglycérides représentent la forme des lipides de réserve d'énergie métabolique nécessaire au développement de la jeune plantule. Leur biosynthèse est initiée dans les akènes à environ 10 jours après la floraison (JAF) (Gray et Kekwick, 1996) et s'effectue au sein du cytosol sur le réticulum endoplasmique par l'introduction d'un acide gras provenant du pool d'acyl-CoA sur un DAG. Cette réaction s'opère via une enzyme: la diacylglycéro-acyltransférase (Cao et Huang, 1986). Ces nouvelles structures composées d'un glycérol et de 3 acides gras définissent les triglycérides ou triacylglycérol (TAG) qui sont stockés au niveau de la graine sous la forme de corps lipidiques, appelés aussi oléosomes, sphérosomes ou encore corps gras (Stymne et Stobart, 1987).

2.3.2. Synthèse des oléosomes

Les oléosomes sont des vésicules constituées d'une monocouche de phospholipides membranaires contenant des protéines membranaires appelées des oléosines (Figure 13). Ces vésicules renferment les triglycérides en les isolant du milieu aqueux du cytosol. Ce sont les seuls organites contenant les réserves lipidiques de la graine (Gurr, 1980).

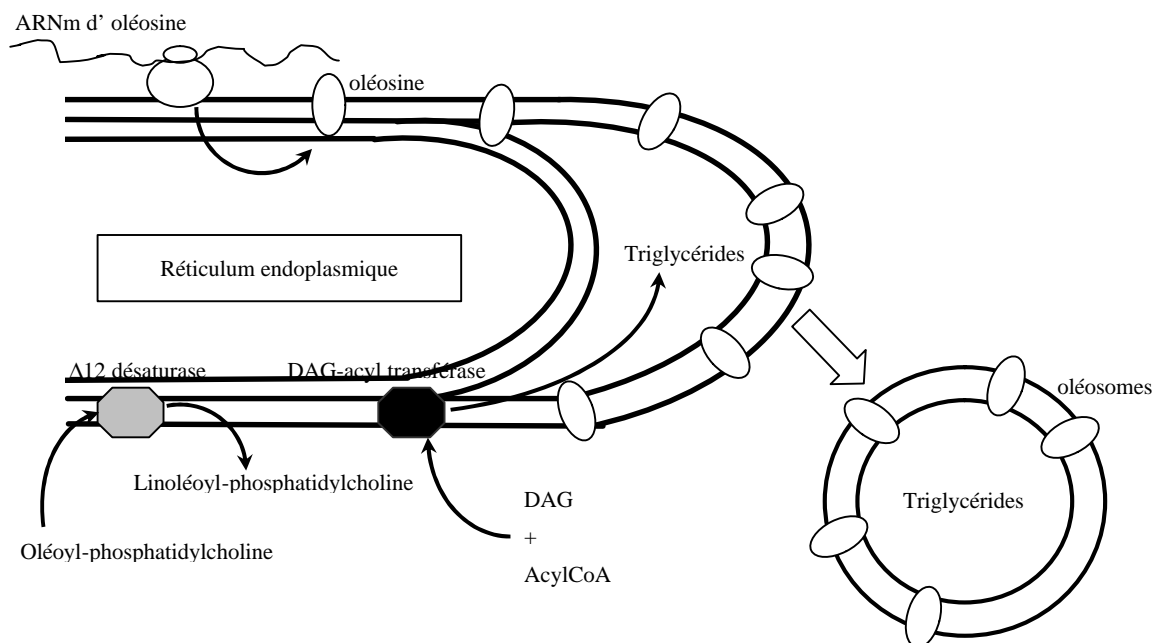


Figure 13 : Schéma de la formation des oléosomes pour le stockage des triglycérides (Source: Huang, 1992)

La formation de ces vésicules a été observée en microscopie électronique. Elles proviennent de l'excavation de la membrane du réticulum endoplasmique. Ces observations ont été confirmées par d'autres études montrant des similitudes de composition des membranes des oléosomes avec celle du réticulum endoplasmique (Fernandez et Staehelin, 1987). Les constituants des oléosomes (triglycérides (92 à 98%), oléosines (1 à 4%) et phospholipides (1 à 4%)) (Slack *et al.*, 1980) sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (Ohlrogge *et al.*, 1991). De plus, l'unique enzyme responsable de la synthèse des TAG est localisée au niveau de ce même compartiment (Cao *et al.*, 1986). La composition des oléosomes varie au cours de la maturation de la graine.

2.3.3. Protéines de transfert lipidique (LTP)

Les protéines de transfert lipidique jouent un rôle important dans le transfert des réserves lipidiques formées au sein de la cellule. En effet, certains auteurs ont émis l'hypothèse que les séquences polypeptidiques participeraient au transfert des lipides entre membranes (Franck *et al.*, 1984).



(Pollinisation, J. Roche)

3. Qualité et Production

3.1. Contexte agricole de la production du tournesol

Bien que la production mondiale de graines de tournesol ait augmentée de 24% ces 10 dernières années (4 millions d'hectares supplémentaires) et représente environ 20% de la production mondiale d'oléagineux (Figure 14), sa place dans le classement des cultures oléagineuses a chuté (de 2^{ème} culture oléagineuse en 1978, à 5^{ème} en 2002). Ainsi, depuis 1993, le tournesol dans le monde est en déclin en terme de production de graines et d'huile, concurrencé notamment par l'huile de palme, de colza et de soja.

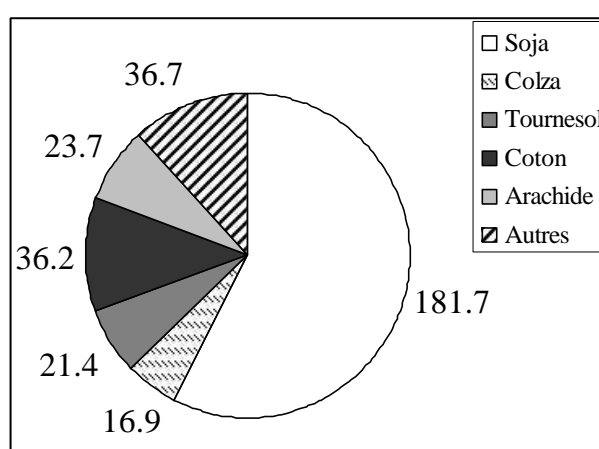


Figure 14 : Répartition de la production mondiale d'oléagineux (millions de tonnes), (Source : AMSOL, 2002)

Cependant, le tournesol occupe une place importante sur le marché des oléagineux dans les assolements en France et particulièrement dans le Sud-Ouest avec des rendements autour de 20-25q/ha (Tableau 7). L'agriculture française produit plus d'un tiers de la production européenne de tournesol, notamment grâce à son utilisation croissante en tant que culture industrielle. Elle occupe principalement les régions Poitou, Midi-Pyrénées et Centre avec un total de 466 750 ha et une production de près de 1 million de tonnes (980 765) (Agreste, 2004). En 2004, la production française de graines de tournesol s'est élevée à 1.47 millions de tonnes.

Tableau 7 : Estimation des productions françaises d'oléagineux (source :Agreste, 2004)

Oléagineux	Récolte 2002			Récolte 2003			Récolte 2004		
	Superficie (1000ha)	Rdt (q/ha)	Production (1000t)	Superficie (1000ha)	Rdt (q/ha)	Production (1000t)	Superficie (1000ha)	Rdt (q/ha)	Production (1000t)
Colza	1036	32.0	3320	1082	31.1	3361	1117	35.4	3961
tournesol	615	24.0	1493	694	21.7	1505	616	23.6	1456
soja	75	28.1	209	81	18.4	149	60	25.4	152

Malgré cette conjoncture favorable, les conditions de production de tournesol ont évolué. Au niveau européen, l'évolution du mode de rémunération globale des productions de tournesol dans le cadre des réformes de la PAC (instauration de Quantités Maximales Garanties au milieu des années 80, paiement des graines au cours mondial à partir de 1992 et mise en place de l'indemnité compensatrice à l'hectare) a favorisé d'une part, le déplacement des productions de tournesol vers des zones à faibles potentiels de production et, d'autre part, l'apparition de systèmes de production globalement moins intensifs (Pouzet et Delplancke, 2000). Par ailleurs, l'observation des pratiques des producteurs encore aléatoires fait ressortir la nécessité de développer de nouveaux outils de pilotage ou d'aide à la décision, susceptibles de garantir les gains de rendement liés aux apports d'eau et justifie la poursuite d'expérimentation dans ce domaine.

Le tournesol présente de nombreuses qualités agronomiques. Peu exigeant en eau, en produits phytosanitaires et en azote, la culture est rustique et peu coûteuse à produire, notamment sur les zones de fortes contraintes liées à la ressource en eau. Le tournesol optimise la rentabilité des céréales en restructurant le sol, en interrompant le cycle des maladies et en limitant le développement des adventices du blé. Il contribue ainsi à l'équilibre des rotations. En favorisant la biodiversité, le tournesol participe à l'attrait des paysages. Pour toutes ces raisons, il constitue une pièce maîtresse de l'agriculture durable.

Ainsi, telles que le prévoient les dispositions adoptées dans le cadre du réexamen de la PAC en 2002, le tournesol doit s'inscrire dans un contexte de développement durable pour maintenir la production. Les exigences sociétales, politiques, économiques et écologiques nécessitent d'une part, de développer la culture de tournesol en conditions de limitation d'intrants par le biais d'itinéraires techniques qui soient rentables pour les producteurs et organismes utilisateurs, et respectueux de l'environnement; et d'autre part, d'élargir les champs d'utilisations possibles de la culture de façon à assurer des débouchés diversifiés à la production. Dans ce contexte, l'application des nouveaux « piliers » de la PAC dès 2003 prévoit une revalorisation des superficies en jachère industrielle dédiées au développement de cultures oléagineuses pour des applications industrielles diversifiées.

Avec la poursuite de la réduction du soutien des prix à la production depuis 2000 jusqu'en 2006, la filière mono-produit de production d'huile est largement fragilisée. La diversification des utilisations de la récolte est une voie d'accès à de nouveaux marchés et laisse espérer une rémunération dans l'avenir. Cette démarche engage la mise en place de contrats ou des cahiers des charges basée sur la qualité afin d'apporter:

- une valeur ajoutée à la culture de tournesol par la qualité des constituants de la graine,

- une diversification de la récolte en constituants majeurs et mineurs pouvant alimenter de multiples filières d'utilisation qui permettra le maintien et le développement du tournesol en France et dans le monde entier.

3.2. Productivité et facteurs limitants

3.2.1. Productivité et disponibilité hydrique

Les rapports entre la gestion de l'eau et les niveaux de production optimaux du tournesol ont été largement étudiés. En conditions hydriques non limitantes, il peut consommer jusqu'à 500mm d'eau par cycle mais rentabilise mal l'excès d'alimentation hydrique: la transpiration est importante, le potentiel hydrique de base élevé et la résistance au transfert de l'eau est faible par rapport à d'autres espèces (Morizet et Merrien, 1990).

Toutefois, il possède une forte capacité d'adaptation aux contraintes hydriques. En effet, en conditions hydriques limitantes, le rendement n'est affecté qu'à partir d'une contrainte correspondante à 74% de la satisfaction des besoins globaux en eau de la culture, seuil au-dessus duquel le rendement reste maximum (Figure 15) (Merrien et Grandin, 1990).

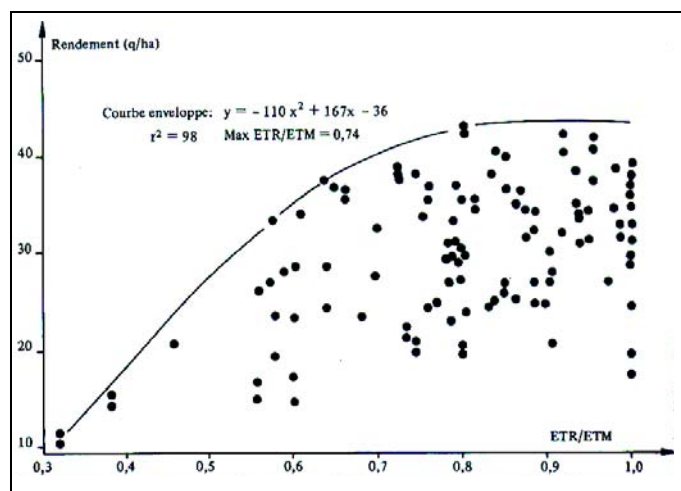


Figure 15 : Relation entre rendement et taux de satisfaction des besoins hydriques (Merrien et Grandin, 1990)

Le tournesol possède la faculté de mettre en place des stratégies d'adaptation de photosynthèse et de photorespiration (Maury, 1997). Ces stratégies dépendent du stade d'application et de l'intensité des stress hydriques occasionnés (Flénet *et al.*, 1997). Cette adaptation se traduit par la capacité à

extraire l'eau à des horizons profonds du sol (Hattendorf *et al.*, 1988) et à modifier son activité photosynthétique et le transfert des assimilats.

La période encadrant la floraison est particulièrement sensible à la sécheresse. Un déficit hydrique équivalent à 50% de l'ETM (appliqué à différents stades de la culture du tournesol) entraîne une chute du rendement grains et tout particulièrement pendant les 40 jours qui encadrent la pleine floraison (Robelin, 1967). Pour la teneur en huile, la période la plus sensible intervient au cours des 20 jours qui suivent la fin de la floraison.

Toutefois, un stress hydrique progressif réalisé pendant la phase végétative et maintenu pendant la phase reproductrice, entraîne une adaptation du tournesol qui se traduit par l'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau pour la synthèse de biomasse sèche totale (Merrien, 1992). Au cours d'un stress, l'efficacité d'utilisation de l'eau est sous contrôle stomatique de la face inférieure des feuilles (Planchon, 1990) et permet une meilleure allocation des assimilats vers la graine (Blanchet *et al.*, 1988; Hall *et al.*, 1989; Hall *et al.*, 1990), une augmentation du poids de 1000 graines (PMG) et de l'indice de récolte (IR) (Connor *et al.*, 1985; Human *et al.*, 1990), ce qui signifie que la plante développe des relations privilégiées entre feuille et capitule. Ce stress appliqué pendant la phase végétative entraîne également une réduction de sa surface foliaire (Rawson et Turner, 1982) qui est néanmoins suffisante pour intercepter le rayonnement maximum (Blanchet *et al.*, 1990; Connor et Jones, 1985) et augmente ainsi la persistance du feuillage au cours du temps. La surface foliaire est liée au rendement en tant que capteur d'énergie. Un indice foliaire (IF) compris entre 2.5 et 3 suffit à capter le maximum d'énergie solaire. Au-delà de 3, la surface des feuilles devient trop évaporante et augmente le risque de maladie, accélère la sénescence et devient préjudiciable pour le rendement (Picq, 1989). Une bonne gestion des apports hydriques permet d'augmenter la durée de la surface foliaire (DSF) et la durée d'efficacité de l'interception (DEI) (Blanchet *et al.*, 1990; Gimenez *et al.*, 1992; Picq, 1989) car il existe une relation positive entre interception lumineuse et production. Aussi, la DSF favorise le rendement (Blanchet *et al.*, 1990; Morizet *et al.*, 1984). Le tournesol présente ainsi différentes voies d'adaptation aux conditions sèches.

Cependant, le tournesol semble perdre cette capacité d'adaptation au déficit hydrique si ce stress apparaît durant les stades reproductifs (Blanchet *et al.*, 1988; Flénet *et al.*, 1994). Contrairement aux conditions de déficit hydrique constant, un stress brutal appliqué à l'anthèse ne permet pas une adaptation suffisante (Hall *et al.*, 1985; Robelin, 1967): la sénescence des feuilles s'accélère et induit une diminution de l'indice de récolte (IR) (Blanchet *et al.*, 1990; Merrien *et al.*, 1981b). Ainsi, une contrainte hydrique appliquée sur une plante non endurcie aux contraintes hydriques pendant la

floraison et le remplissage des graines, diminue le rendement final alors qu'elle n'aura aucun effet sur une plante endurcie préalablement pendant la phase végétative (Texier *et al.*, 1989).

En résumé, le tournesol est une plante qui valorise relativement bien le manque d'eau. Notre étude se place dans ce contexte de limitation d'eau (70% de l'ETM pour une culture irriguée). C'est aujourd'hui un atout car la gestion des ressources hydriques tendra probablement à se durcir dans l'avenir.

3.2.2. Productivité et alimentation azotée

Comme pour l'alimentation hydrique, l'alimentation azotée du tournesol a donné lieu à de nombreuses études (Steer *et al.*, 1984; Palmer et Steer, 1985; Blanchet *et al.*, 1986). De manière générale, le manque d'azote a une influence sur l'élaboration du rendement à travers le nombre de graines formés et à un degré moindre leur poids moyen (Tableau 8).

Tableau 8 : Influence de l'alimentation azotée sur la production et la composition des akènes, d'après Blanchet, 1987

N fourni (g)	Poids des graines/capitule (g)	Nombre d'akènes pleins/capitule	Poids moyen d'un akène (mg)	% d'huile/matière sèche	% de protéines/matière sèche
0.5	14.5	510	28.8	54.5	10.9
1	28.0	835	33.5	54.1	11.5
2	41.3	1130	36.4	53.4	12.7
4	51.4	1330	38.2	53.7	17.7
6	62.1	1550	40.3	52.5	19.5

Toutefois, il ressort que les besoins en azote du tournesol sont relativement faibles, de l'ordre de 4.5 kg d'azote absorbé/quintal de graines produites (Blanchet, 1987). Pour un rendement de 35q/ha, la culture restitue 55 à 60% des quantités totales d'azote absorbées et les graines en exportent 40 à 45% (Merrien, 1992).

Le tournesol absorbe préférentiellement l'azote au stade « 5 paires de feuilles » (B5) et au début de la floraison (F1). Les stades jeunes sont particulièrement sensibles à l'alimentation azotée, telles que la différenciation des ébauches florales (Palmer et Steer, 1985) et l'établissement de la surface foliaire (Radin et Boyer, 1982). L'alimentation azotée influence également l'activité de l'enzyme Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygénase (Courtiade, 1983).

Bien enraciné, le tournesol mobilise l'azote minéral des couches les plus profondes du sol qui lui fournissent une grande partie de ses besoins (Blanchet, 1987). La fertilisation azotée vise à compléter les fournitures du sol et dépasse rarement 80 unités/ha afin d'éviter l'exubérance de la

partie végétative, et donc la verse et le développement des maladies. Cependant, la culture valorise mal la fertilisation et on considère que seulement 80% de l'azote apporté est absorbé par la plante (Merrien, 1992).

La teneur en azote de la plante entière par rapport à la matière sèche produite mesurée entre la levée et la floraison permet d'établir un diagnostic foliaire du niveau d'alimentation azotée de la plante. Ainsi, dans l'objectif d'optimiser les apports d'azote, un outil de diagnostic a récemment été développé par le CETIOM, Héliotest (Reau *et al.*, 2004). Ce système est basé sur des indicateurs visuels liés à l'état azoté de la culture au stade 10-12 feuilles (indice de nutrition azoté). Par ce moyen, le producteur a la possibilité d'adapter la fertilisation en fonction du rendement qu'il s'est fixé.

3.3. Produire dans un contexte d'exigence de qualité

A l'heure de l'émergence de l'agriculture biologique, les exigences sociétales et économiques en matière de production agricole se tournent vers le développement de cultures susceptibles de fournir des produits de qualité. La qualité des semences peut être définie selon plusieurs critères qui relèvent d'une part des cultures concernées (soja, blé, tournesol,...); et d'autre part des domaines d'applications (industries alimentaires, non alimentaires,...) et de la demande du marché.

Concernant le tournesol, la qualité se situe à différents niveaux: production et utilisation. D'un point de vue agronomique, une bonne qualité des semences est liée au taux d'impuretés et au taux d'humidité dont les normes de commercialisation sont fixées à 2% et 9% respectivement.

Le pouvoir germinatif représente un aspect de la qualité sanitaire de celle-ci. Qualité sanitaire peut également être synonyme de faible besoin en produits phytosanitaires pour un développement optimal et une production respectueuse de l'environnement.

Sur le plan alimentaire, les huiles végétales possèdent de nombreuses propriétés nutritives et bénéfiques pour la santé. La forte teneur en acide oléique et la forte teneur en acides gras poly-insaturés des génotypes oléiques permet de prévenir l'athérosclérose (Krajcovicova-kudlakova *et al.*, 1997). La forte teneur en acide linoléique (acide gras essentiel) des génotypes classiques intervient dans des processus de coagulation du sang et tend à abaisser la teneur en cholestérol du sang. D'autre part, la richesse en stérols et en tocophérols (vitamine E) des huiles végétales utilisées à des fins alimentaires limite le rancissement de l'huile et favorise sa conservation. En outre, la graine entière de tournesol peut également être valorisée dans l'alimentation humaine. Certains pays au sud de la France (Maroc, Espagne,...) sont de gros consommateurs de graines de tournesol de

bouche, et bénéficient de la forte teneur en acide oléique des graines. La composition de la graine de tournesol participe également à l'image positive de la culture pour des utilisations non alimentaires (Borredon et Gaset, 2000) et constitue un critère de qualité. Par exemple, en cosmétologie, une forte teneur en acide stéarique sera nécessaire alors que dans le domaine de fabrication de peintures, ce sera davantage la forte présence d'acide linoléique qui attirera l'attention.

Quelles que soient les applications, la diversité de composition de la graine de tournesol présente un intérêt qualitatif multicritère essentiel. De plus, les différents acteurs de la filière exigent le respect de critères de qualité spécifiques à leur domaine.

Ainsi, dans une démarche intégrée de qualité, il convient de considérer ces différents critères à tous les niveaux de la chaîne de production; de la réalisation du produit dans un contexte agricole favorable à l'environnement jusqu'à la transformation à faible coût favorisant des produits de qualité. Au niveau de la production agricole, la qualité représente une rentabilité nouvelle de la production dans le cas de contrats de qualité associés à des cahiers des charges. Pour les organismes stockeurs, produire dans ce contexte s'illustre par l'adaptation des infrastructures et du matériel pour homogénéiser la production des lots. Au niveau des transformateurs, la qualité est synonyme de procédés spécifiques respectueux de l'environnement et à moindre coût de transformation pour la production de composés d'intérêt à forte valeur ajoutée. De plus, l'émergence de nouveaux débouchés repose sur la combinaison de plusieurs critères qualitatifs. Outre une qualité donnée, les objectifs actuels de production du tournesol pourraient répondre à une demande multiproduits et donc multicritères. Ainsi, les objectifs actuels de production de tournesol doivent répondre à la demande multicritère des industries et aux cahiers des charges de qualité.

Dans ce cadre, les objectifs agricoles s'articulent autour de deux axes complémentaires visant à concrétiser les avantages potentiels du tournesol pour l'alimentation et les utilisations non alimentaires. Le premier axe vise à améliorer la qualité des semences en tant que ressource valorisable tout en permettant de produire des rendements satisfaisant afin de maintenir leur utilisation par les agriculteurs. Le second vise à développer la production de tournesol en apportant une plus value par la qualité de composition des graines produites dans un contexte de limitation d'intrants pour favoriser le développement d'un système durable pour l'environnement rural.

4. Molécules utilisables issues de la culture du tournesol: intérêt, enjeux et types de valorisations

4.1. Intérêts et enjeux économiques et sociaux autour des valorisations

Dans un contexte de production difficile en terme de réglementations, la culture de tournesol doit faire face à de nouvelles exigences économiques et sociales. La rendement du tournesol s'est stabilisé (environ 25 quintaux), notamment grâce à l'utilisation d'hybrides tolérants vis-à-vis des maladies et aux meilleures connaissances physiologiques de la culture. Les progrès sur l'amélioration du rendement du tournesol ont été accompagnés de la création de nouveaux débouchés nés de la volonté des différents acteurs économiques de la filière; producteurs, industries de première et deuxième transformations (tritrateurs et formulateurs), consommateurs; visant à diversifier les utilisations des produits issus de l'agriculture. Quel que soit le type de valorisation (alimentaires ou non alimentaires), le premier enjeu de ces débouchés est de mettre sur le marché des produits agricoles présentant des caractéristiques de qualité à haute valeur ajoutée tout en développant des connexions importantes entre production et transformation. Il est nécessaire que la production puisse répondre à des demandes variées dont la qualité de composition est un pilier central.

Dans un second enjeu, la diversification des débouchés liés aux multiples critères de qualité des matières premières peut repositionner le tournesol sur le marché des oléoprotéagineux, en particulier dans les assolements où sa culture est bien adaptée.

Le troisième enjeu est économique et lié à la demande industrielle et sociétale. Dans le cadre des décisions adoptées par l'Union Européenne sur la réforme de la PAC, les nouveaux produits doivent être en adéquation avec les directives environnementales et de diversification des produits. De plus, la demande sociétale se tourne vers des produits sains et de qualité. Il faut donc que l'offre en matières premières de la filière oléagineuse réponde à la demande du secteur de la transformation.

Enfin, le dernier enjeu de ces débouchés est d'ordre environnemental. Il concerne les industriels qui, poussés par la demande sociétale, développent des procédés respectueux de l'environnement. Ce concept de « chimie verte » vise à produire des matières agricoles en réduisant (voire éliminant) l'utilisation et l'émission de substances nocives pour la santé et l'environnement.

4.2. Nouveau visage des valorisations alimentaires

Le secteur alimentaire constitue la valorisation traditionnelle des produits issus de l'agriculture. S'il est vrai que ce type de valorisation a toujours existé, il n'en reste pas moins que la demande sociétale concernant les produits agricoles a évolué en fonction des exigences nutritionnelles des consommateurs. Alors qu'à la sortie de la deuxième guerre mondiale la société exigeait une agriculture capable de nourrir le monde entier en produisant des quantités suffisamment importantes, la nouvelle agriculture se tourne aujourd'hui vers des exigences basées sur des critères qualitatifs tels que la valeur nutritionnelle ayant des vertus bénéfiques pour la santé. Dans cette optique, les préconisations de ces dernières années visent à réduire la consommation de graisses saturées d'origine animale et à les remplacer par des graisses d'origine végétale. Poussée par la demande des consommateurs pour une alimentation plus saine, la filière huile a développé de nouvelles valorisations alimentaires axées sur des critères définis (type d'acides gras, tocophérols, phytostérols, etc...) permettant d'améliorer les propriétés nutritionnelles des huiles végétales. L'huile de tournesol, riche en acides gras mono et poly-insaturés, correspond parfaitement aux recommandations nutritionnelles actuelles. L'environnement alimentaire intervient dans la genèse des maladies cardio-vasculaires qui constituent la première cause de mortalité des pays développés. La diversité et la qualité de composition de l'huile de tournesol (acides gras et composés mineurs) joue un rôle dans la prévention de ces maladies. Conscients de ce lien existant entre alimentation et santé, les consommateurs exigent que les aliments ne servent pas seulement de nourriture mais contribuent également à leur santé. D'ailleurs, plus généralement, les aliments fonctionnels procurant des bienfaits physiologiques démontrés au-delà des fonctions nutritionnelles de base constituent un marché en forte croissance dans les pays développés. De plus, en matière d'alimentation, la société exige que ces produits soient obtenus dans le respect des normes de sécurité alimentaire (alimentation animale) sans ajout de substances toxiques ou néfastes pour la santé, ou pour l'environnement.

4.3. Débouchés de la valorisation non alimentaire: jachère industrielle et culture de diversification

Bien que la production d'huile de tournesol demeure orientée principalement vers l'industrie alimentaire (plus de ? des débouchés des huiles végétales), son utilisation par les industries non alimentaires s'accroît. Avec plus de 60% de matières premières potentiellement utilisables (huile et protéines), de multiples débouchés non alimentaires se sont développés depuis de nombreuses

années (en 95, près de 3% de nouveaux débouchés hors de cette filière) et beaucoup d'autres voient nouvellement le jour.

La jachère industrielle a permis d'initier ou de dynamiser de nombreux projets de valorisation non alimentaires des produits agricoles. Ces projets s'inscrivent dans une nouvelle approche de consommation qui se traduit par la mise en place de normes d'écotoxicité et de respect de l'environnement. En offrant la possibilité aux agriculteurs de cultiver à des fins non alimentaires une partie des terres mises en jachère, la réforme de la PAC de 1992 procède de la même dynamique (règlement 334/93 du 15 Février 1993 sur les « jachères industrielles »); bien que son premier objectif soit de réduire la production excédentaire, en limitant les superficies cultivables.

Puis, les nouvelles dispositions prises dans le cadre des nouveaux piliers de la PAC de l'Agenda 2000 réactualisés en 2003, ont transformé la jachère industrielle en un développement plus large de cultures industrielles. Ces directives ont pour vocation de développer de divers débouchés chimiques avec pour objectif principal de substituer les produits polluants d'origine pétrochimique par des molécules végétales offrant les mêmes avantages. D'un point de vue environnemental, le remplacement des dérivés du pétrole dans les produits du quotidien (carburants, lessives, peintures, résines, lubrifiants, encres, produits cosmétiques) par des matières végétales renouvelables et non polluantes permet de réduire la production de gaz à effets de serre et le rejet de composés organiques volatils dans l'air. Globalement, cette démarche conduit à la production de matériaux biodégradables et limitent les déchets. Une limite de leur développement se situe au niveau des coûts de production qui sont plus importants que pour les produits issus de la pétrochimie avec lesquels les matières végétales rivalisent.

D'autre part, les valorisations non alimentaires constituent un moyen efficace d'engager simultanément agriculture et industrie dans la voie du développement rural durable. L'économie est stimulée par l'établissement des différents équilibres entre les marchés alimentaires et non alimentaires ce qui améliore la balance commerciale et favorise de nouveaux ateliers de transformation de la matière végétale. Les valorisations non alimentaires permettent également d'accroître les surfaces agricoles de façon à maintenir l'activité rurale. Dans ce contexte, les variétés de tournesol oléiques ont connu un fort développement car elles s'avèrent adaptées à l'utilisation industrielle. Ainsi, le tournesol, dont la composition des graines peut varier, est susceptible d'occuper aujourd'hui une place de choix.

La valorisation des produits et co-produits du tournesol peut se situer à différents niveaux selon la fraction de la plante utilisée ; et selon le secteur d'application, l'industrie alimentaire et non alimentaire. Ainsi, dans la partie qui suit, nous nous intéresserons dans un premier temps aux valorisations alimentaires qui représentent la part la plus importante d'utilisation des molécules issues de la culture de tournesol. Nous évoquerons brièvement dans un second temps quelques valorisations non alimentaires du tournesol. Dans la mesure du possible, les applications relatives à l'utilisation spécifique de certains constituants seront précisées.

Tous les produits issus du tournesol peuvent faire l'objet de valorisations. Toutefois, l'huile extraite dans la graine par trituration (Figure 16), représente la partie de la plante la plus fréquemment et la plus abondamment valorisée grâce notamment à sa composition en acides gras et ses composés mineurs.

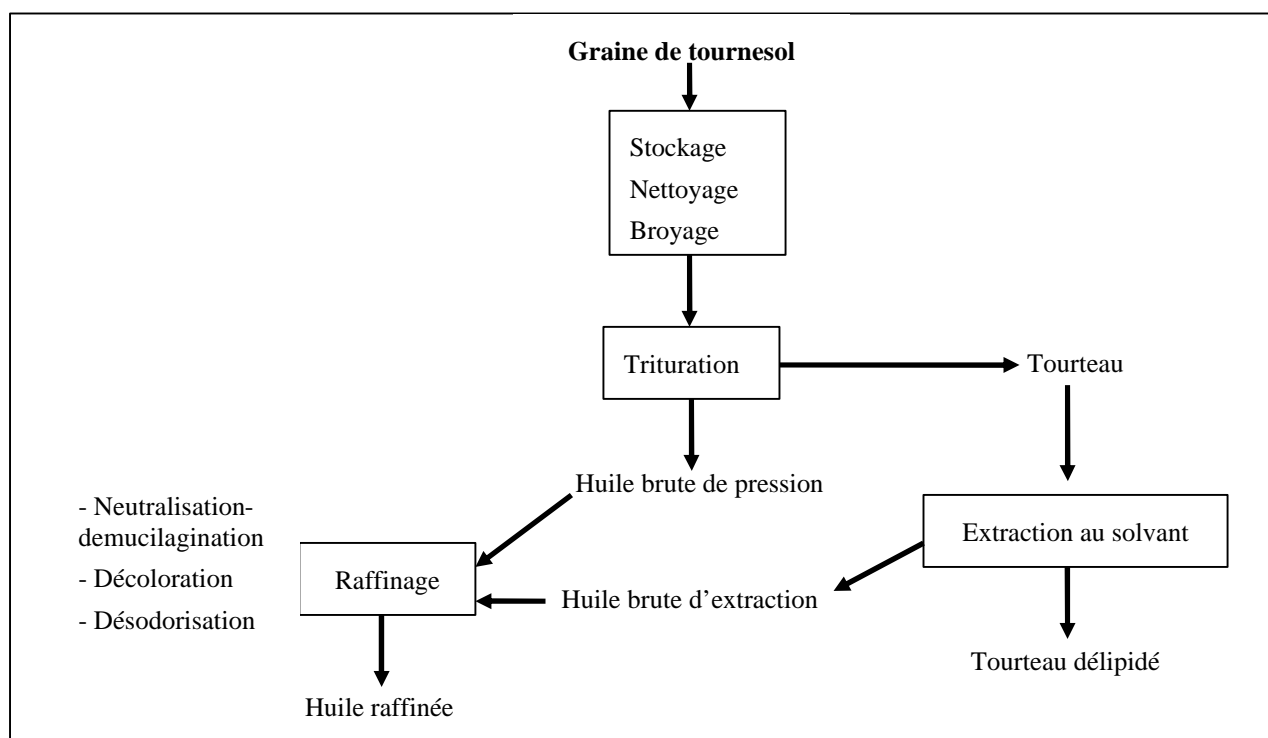


Figure 16 : Schéma simplifié de l'extraction de l'huile de tournesol

4.4. Valorisations de la fraction lipidique

4.4.1. Débouchés alimentaires

4.4.1.1. Huile et acides gras

Seule ou combinée à d'autres, l'huile de tournesol peut répondre à de nombreuses exigences du secteur agro-alimentaire. Seule, elle est utilisée par l'industrie alimentaire pour la fabrication de

saucés, assaisonnements ou pour la friture; mais c'est en mélange qu'elle présente le plus d'intérêt pour l'alimentation (Delplanque *et al.*, 2000). Apparues dans les années 90, les huiles combinées résultent de l'assemblage de plusieurs huiles comportant des propriétés nutritionnelles différentes et complémentaires. Par exemple, le couple huile de tournesol/huile de colza renferme des teneurs importantes en deux acides gras polyinsaturés essentiels que seule l'alimentation peut fournir (acide linoléique, C18:2, pour le tournesol, et l'acide linoléique, C18:3, pour le colza). A partir de ces deux acides gras essentiels, l'organisme est capable de synthétiser d'autres acides gras à longues chaînes:

- pour l'acide linoléique, les acides gras oméga 6 (acides arachidonique et di-homo-gamma-linolénique),
- pour l'acide linoléique, les acides gras oméga 3 (acides eicosapentaénoïque et docosahéxaénoïque). Ces huiles de mélange ont une composition globale adéquate pour une utilisation en friture. Pour la fabrication des margarines, l'huile de tournesol est également largement employée en raison de sa stabilité et de son apport nutritionnel en tant que source d'acides gras essentiels. La fabrication des margarines nécessite une hydrogénation pour acquérir une plasticité suffisante qui transforme les acides gras insaturés en acides gras saturés (Fernandez-Moya *et al.*, 2002). Néanmoins les acides gras saturés issus de cette hydrogénation ne sont pas métabolisés par le corps humain et sont souvent associés aux problèmes cardio-vasculaires. L'acide stéarique présent dans l'huile de tournesol est le meilleur acide gras saturé pur pour la santé car il n'augmente pas la concentration en cholestérol et est facilement transformé en acide oléique par le foie. La création de tournesols mutants à forte teneur en acide stéarique est envisagée permettant de produire de la margarine sans passer par des transformations chimiques.

La diversité des acides gras dans l'alimentation humaine et leur apport en quantités appropriées et équilibrées s'avère nécessaire pour la prévention d'un grand nombre de maladies liées à la sous alimentation des pays en voie de développement et au déséquilibre nutritionnel des sociétés industrialisées pour lesquelles les maladies cardiovasculaires demeurent la première cause de mortalité (Delplanque, 2000). Certains facteurs de risque reconnus, tels que le LDL-cholestérol sérique élevé (« mauvais cholestérol »), le HDL-cholestérol sérique bas (« bon cholestérol ») et un taux de triglycérides élevé à jeun, sont naturellement influencés par la qualité des acides gras alimentaires; et plus particulièrement par la surconsommation d'acides gras saturés. Ayant conscience de la qualité et de la quantité d'acides gras présents dans leur alimentation, les consommateurs ont désormais tendance à réduire la consommation des acides gras saturés afin

prévenir le risque de maladies cardiovasculaires. Ainsi, le développement de variétés différemment enrichies en acide linoléique et oléique présente un réel intérêt pour l'alimentation humaine.

Avec l'apparition des premiers mutants riches en acides oléiques et l'évolution des sélections, le tournesol est devenu un concurrent sérieux des huiles hautement mono-insaturées dont la production est moins importante (huile d'olive). L'huile de tournesol oléique est utilisée directement dans la gamme des huiles de table. Plusieurs études (Berry et Rivlin, 1997; Jing *et al.*, 1997; Kinter *et al.*, 1996; Krajcovicova-kudlakova *et al.*, 1997; Po Huang *et al.*, 1996) ont révélé les effets positifs sur la santé humaine d'une alimentation riche en acides gras insaturés (acide oléique en particulier), notamment leur rôle dans la prévention de l'apparition de l'athérosclérose à l'origine des accidents vasculaires.

Globalement, un apport équilibré des différents acides gras insaturés est nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Cette voie a mené les industriels à créer les huiles recombinaison à partir du mélange d'huile de tournesol standard et d'huile de tournesol oléique de manière à fournir une combinaison équilibrée d'acides gras mono et polyinsaturés. Dans la même optique d'équilibrer les apports en acides gras, une variété «mi-oléique» (Nun Sun) présentant une composition intermédiaire à celle du tournesol classique et oléique a été développée de manière à apporter une source d'acide oléique et d'acide linoléique naturellement plus équilibrée (Delplanque, 2000). L'huile de tournesol oléique est également utilisée par les professionnels de la friture du fait de sa grande stabilité vis-à-vis de la chaleur et sa résistance à l'oxydation (Dobarganes *et al.*, 1993). D'autres branches de l'industrie agroalimentaire (secteur de la conserve, démoulage en pâtisserie) sont intéressées par le caractère de résistance au rancissement de l'acide oléique. Au même titre que l'huile de tournesol classique, l'huile de tournesol oléique est employée pour sa forte teneur en acide oléique, en combinaison avec d'autres huiles présentant des intérêts nutritionnels complémentaires.

4.4.1.2. Composés mineurs

La richesse en composés mineurs apporte à l'huile de table un intérêt nutritionnel supplémentaire. L' α tocophérol, présent en quantité importante dans l'huile de tournesol, possède une activité vitaminique E qui lui confère des propriétés anti-oxydantes bénéfiques pour la santé (Miettinen et Gylling, 1997). Ces molécules jouent un rôle dans la prévention contre les maladies cardiovasculaires, et particulièrement l'athérosclérose (Léger, 2000). L'effet des tocophérols sur d'autres maladies, telles que certains cancers (prostate, poumons, pancréas) et des maladies

neurodégénératives (Alzheimer), sont actuellement à l'étude et laisse présager de nombreuses autres vertus de ces molécules (Léger, 2000). Les tocophérols sont majoritairement des produits de synthèse, mais l'activité vitaminique naturelle des tocophérols issus de végétaux s'avère deux fois plus efficace. Dans la recherche de produits issus du végétal en substitution aux produits de synthèse, la graine de tournesol peut constituer une source intéressante.

Les phytostérols contenus dans l'huile de tournesol sont de plus en plus utilisés dans la fabrication de margarines (Moreau *et al.*, 2002), pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes car ils ont la capacité de se substituer au cholestérol (Pelletier *et al.*, 1995). Les résultats les plus récents indiquent que les phytostérols (β sitostérol particulièrement) et leurs dérivés esters hydrogénés (phytostanols) consommés avec un régime normal à des doses optimales comprises entre 1.5 et 3g/jour, réduisent efficacement l'absorption intestinale du cholestérol (Heinemann *et al.*, 1991; Mattson *et al.*, 1977) et le taux de LDL-cholestérol plasmique (-10 à 15%) sans modifier le HDL-cholestérol (Nigon *et al.*, 2000; Quiles *et al.*, 2003). Une telle diminution est associée à la baisse de l'apparition des maladies cardio-vasculaires (Law *et al.*, 1994). Outre leur effet sur la réduction du taux de cholestérol sanguin reconnu par de nombreux auteurs, les phytostérols pourraient avoir une action protectrice contre certains cancers (colon, prostate, poumons) en influençant favorablement la croissance cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales (Tapiero *et al.*, 2003). De plus, l'huile de tournesol est pauvre en squalène (10 fois moins que dans l'huile d'olive par exemple; Delplanque, 2000), hydrocarbure précurseur du cholestérol ; ceci accentue l'intérêt de l'utilisation de cette huile dans les régimes hypocholestérolémiants.

4.4.1.3. Procédés de transformation

La valorisation des constituants s'accompagne de l'amélioration des procédés de transformation mis en œuvre pour préserver les caractéristiques intrinsèques de la graine (acides gras, composés mineurs de l'huile, protéines), pour modifier des propriétés (solubilité des protéines par exemple) ou encore pour éliminer des composés indésirables. Dans le domaine alimentaire par exemple, un effort particulier est porté d'une part, sur la création de nouveaux procédés de transformation (extrusion-pression, extrusion à vis co-rotatives,...) et d'autre part, sur l'utilisation de solvants moins toxiques tels que l'isohexane, l'éthanol, l'isopropanol, des fluides supercritiques, ou encore l'eau. L'utilisation de ce dernier nécessite l'ajout d'enzymes hydrolytiques facilitant la libération de l'huile. Enfin, l'optimisation des procédés de raffinage des huiles brutes représente un secteur d'innovation important dans le but de mieux répondre aux exigences des consommateurs sur le plan alimentaire ainsi que sur le plan sanitaire. Cet objectif implique le respect de différents critères de

qualité de composition: la préservation des acides gras poly-insaturés, l'absence d'isomères *trans* nocifs pour la santé, teneurs élevées en tocophérols et absence de contaminant tels que les pesticides (Evrard, 2003).

4.4.2. Débouchés non alimentaires

Les caractéristiques technologiques et la composition de l'huile de tournesol (standard et oléique) offrent un large potentiel de développement dans les applications non alimentaires. Les principales applications non alimentaires concernent la fraction lipidique, les utilisations des autres constituants de la graine constituent encore des débouchés qui demeurent à l'état de recherche.

Les huiles végétales sont utilisées par les industries non alimentaires pures, ou sous forme d'esters méthyliques d'acides gras, appelés aussi Diester, issus de la trans-estérification des acides gras liés au glycérol composant les triglycérides de l'huile. Ce sont ces esters méthyliques d'huiles végétales qui font l'objet de valorisation spécifiques en tant que biolubrifiants (Hillion et Proriol, 2003), biosolvants (Hoang *et al.*, 2003), biotensioactifs (Parant, 1999) ou biocarburants (Antolin *et al.*, 2002).

Les acides gras provenant de l'hydrolyse chimique ou enzymatique des huiles sont souvent utilisés par les industriels de la lipochimie en tant qu'intermédiaires suite à leur modification par synthèse chimique. Ils trouvent alors des applications dans des domaines tels que les émulsifiants, lubrifiants synthétiques et fluides; ainsi que dans les industries du textile, du papier, pharmaceutique et cosmétique et des matières plastiques (Hancock et Leeves, 1989). C'est en particulier le cas des acides gras saturés (acide palmitique et stéarique), grâce auxquels l'huile de tournesol peut trouver des applications dans le domaine des biolubrifiants (Quelenis, 2005) et des biotensioactifs dans la composition de détergents (lessives, adoucissants, liquides vaisselle, produits d'entretien et agents de surface), et de produits cosmétiques et pharmaceutiques.

Un autre exemple est celui de l'acide oléique qui, après réaction avec une base, est converti en savon et est largement utilisé en cosmétologie. En raison de sa stabilité à la chaleur et à l'oxydation et son point de solidification bas, l'huile de tournesol oléique présente des propriétés particulièrement adaptées aux exigences physico-chimiques nécessaires à la fabrication des biolubrifiants. De plus, l'acide oléique utilisé dans l'industrie chimique provient généralement d'huile extraite de palme et du suif. Contrairement à l'oléine (ester d'acide oléique) extraite de suif qui renferme des composés odorants gênants dans le domaine des détergents (lessives et autres), l'oléine de tournesol oléique présente l'avantage d'être inodore et de rester incolore au cours des

procédés de transformation (La Taille, 1995). Le développement de variétés possédant des teneurs en acide oléique supérieures à 90%, renforce le positionnement du tournesol sur le marché des biolubrifiants.

Enfin, d'autres biomolécules en faible teneur, tels que les phytostérols, amène une valeur ajoutée à l'extraction de l'huile de tournesol pour des utilisations non alimentaires (Tableau 9).

Tableau 9 : Valorisation non alimentaire des phytostérols

Phytostérols utilisés	Domaines d'utilisation
90% β sitostérol + 10% campestérol	Emollient
45% β sitostérol + 25% campestérol + 20% stigmastérol	Cosmétiques
50% β sitostérol + 25% campestérol + 25% stigmastérol	Emulsifiant, dispersant, solubilisant
Phytostanol: phytostérols saturés	Emulsifiant, dispersant

d'après Folmer, 2003

Les phytostérols possèdent des propriétés de surfactant utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour solubiliser les hormones stéroïdes dans la formulation de certaines crèmes. De plus, ils présentent des effets curatifs sur la peau ainsi qu'une action anti-inflammatoire similaire à celle de la cortisone et des corticoïdes.

En tant que bons émulsifiants, les stérols sont utilisés pour la formulation de produits cosmétiques variés. L'ajout de phytostérols dans les crèmes permet d'améliorer l'hydratation de la peau et sa tonicité (Folmer, 2003). Selon les préparations, ils servent d'émulsifiants principaux ou auxiliaires, modificateurs de consistance et d'apparence, d'agents contrôlant la viscosité ou d'émollients. Ils sont employés pour la formulation de shampoings, pour lesquels ils réduisent la charge électrostatique; de lotions hydratantes, rouges à lèvres, crèmes de corps, solutions après rasage (Folmer, 2003).

4.5. Valorisation des coproduits de la culture de tournesol

Le tournesol n'est pas seulement une plante à huile. Si les graines de tournesol contiennent entre 30 et 50% de lipides, produit majoritairement utilisé, il n'en reste pas moins qu'elles renferment également 20 % de protéines qui constitue une source pour une autre voie de valorisation pour le tournesol.

4.5.1. Tourteau et protéines

Le tourteau est principalement issu des résidus des graines entières broyées et extraites de leur huile, appelé aussi tourteau « pailleux ». Il existe également un tourteau dit « décortiqué » (parmi lequel le tourteau « 40 » contenant 40 % de protéines) produit à partir de graines décortiquées préalablement à l'extraction d'huile et dont les avantages sont la moindre usure du matériel, la diminution de la teneur en cire des huiles brutes et surtout la production d'un tourteau de plus haute valeur protéique (Bureau, 1994).

En tant que matière végétale riche en fibres et en protéines, le tourteau produit par l'industrie huilière est utilisé dans l'alimentation animale. Il présente le double avantage d'être riche en acides aminés soufrés et de ne pas contenir de facteurs antinutritionnels. En revanche, la teneur en acide aminé essentiel (lysine par exemple) est faible et la teneur forte en cellulose lui confère une faible valeur énergétique (Evrard, 1986). Des applications non alimentaires du tourteau de tournesol ont été trouvées dans les emballages comme pots de repiquage biodégradables. Le développement de ces « agromatériaux » (matériaux d'origine agricole) prévoit la substitution des pots plastiques néfastes pour l'environnement, ou des pots en tourbe ou papier présentant un manque de tenue et l'impossibilité de mécaniser la production, ou encore des pots en plastiques synthétiques biodégradables (acides polylactiques et polyprolactones) dont la dégradation trop lente empêche un bon développement racinaire lors du repiquage du pot (Geneau *et al.*, 2004; Rouilly *et al.*, 2000).

D'autres voies de valorisation comme la combustion énergétique pour le chauffage, les amendements organiques ou la fermentation des protéines du tourteau pour la production de molécules intéressent l'industrie pharmaceutique (Lemarié, 1996).

A l'instar des protéines de soja, les protéines de tournesol trouvent des débouchés dans le secteur alimentaire, principalement pour l'alimentation animale (bétail et animaux domestiques). L'introduction de farine de tournesol dans les boissons, les jus de viandes (Rossi, 1988), ou dans les compléments pour produits carnés et dans l'alimentation diététique, constitue un vaste débouché des protéines de tournesol en alimentation humaine.

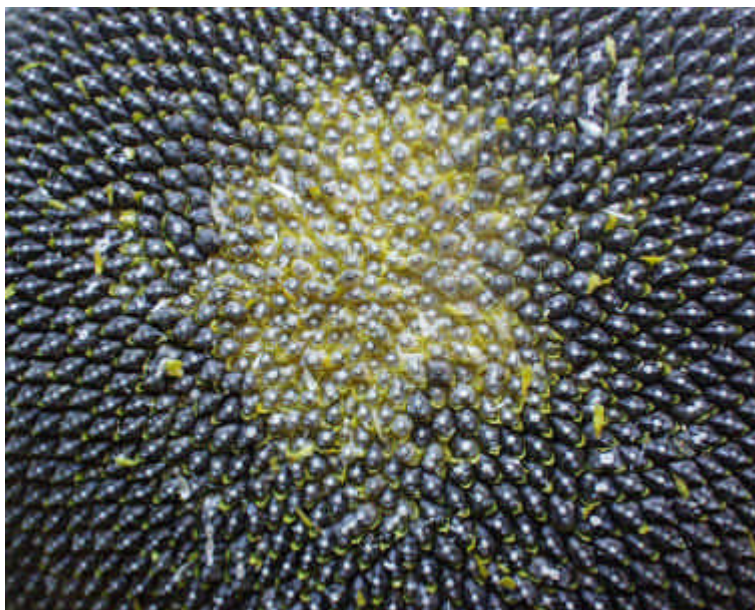
4.5.2. Biomasse végétative

La culture de tournesol génère en France et dans le monde des quantités considérables de matière végétale non valorisée, telles les tiges, les feuilles et les capitules évidés. Ces résidus de récolte peuvent être incorporés au sol pour améliorer sa structure et l'enrichir en matière organique.

Ces résidus cellulosiques trouvent également des applications basées sur la formation de biomatériaux grâce à la présence de composés volatils, dérivés terpéniques, substances pectiques et résidus cellulosiques. Par exemple, les substances pectiques peuvent être utilisées comme gélifiant dans les aliments à basses calories, et les esters pectiniques comme stabilisateur d'émulsions. Les résidus cellulosiques entiers de la tige peuvent être utilisés pour la fabrication de pâte à papier (Maréchal et Rigal, 1999), ou peuvent également servir pour le traitement des effluents de l'industrie textile (adsorption de teintures) (Vandenbossche-Maréchal, 1998).

4.5.3. Graine entière de bouche

Dans certains pays (Maroc, Espagne, Chine...), les graines entières de tournesol sont consommées grillées et salées. Ce débouché est limité mais constitue une voie permettant d'apporter un complément nutritionnel. Les graines de bouche décortiquées sont également consommées pour agrémenter salades et crudités. Des variétés de tournesol présentant des caractéristiques facilitant le décorticage (graines de grosses taille,...) sont actuellement sélectionnées de façon à alimenter la production de graines de bouche (Hua, 2004; Kaya, 2004).



(Graines matures, J. Roche)

5. Facteurs de variabilité de la qualité

La qualité de la récolte de tournesol est tributaire de facteurs qui peuvent être regroupés en deux catégories.

Le potentiel génétique constitue le premier facteur déterminant la composition des graines des plantes oléoprotéagineuses. Dans le cas particulier du tournesol, les objectifs de composition pour les filières d'utilisations dépendent d'une part, du choix de variétés (oléique ou standard); et d'autre part, des potentialités du génome à produire des molécules d'intérêt. Le niveau de synthèse de ces molécules est déterminé par la présence et l'expression de gènes spécifiques. Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire permettant d'étudier les gènes et de comprendre leur fonctionnement, les potentialités génétiques peuvent être mieux cernées et permettent l'amélioration des performances agronomiques des espèces cultivées.

L'expression du potentiel génétique est conditionnée par le contexte de développement de la culture. Cette seconde source de variabilité de la qualité des graines est liée à des facteurs environnementaux non maîtrisables (climat et sol) associées aux conditions culturales. Ce sont les « facteurs agri-environnementaux ».

L'évolution des techniques de sélection qui ont conduit à comprendre le déterminisme génétique lié aux critères de qualité de la graine sont présentés dans une première partie. L'influence des facteurs agri-environnementaux sur la composition de la graine de tournesol est exposée dans une seconde partie.

5.1. Déterminisme et amélioration génétique

5.1.1. Sélection génétique

Les processus qui participent à la réponse intégrée de la plante en terme de qualité de composition de la graine sont complexes et leur déterminisme au niveau génétique est encore mal connu. Il concerne la composition de la graine ainsi que la répartition des constituants de l'huile. Les techniques de sélection ont permis de faire évoluer la compréhension des mécanismes physiologiques qui sous-tendent le déterminisme de l'élaboration de la qualité des graines. En parallèle, ces techniques ont été développées pour élargir le pool génétique disponible. Dans l'évolution des programmes de sélection, deux types d'orientation ont été choisies: d'une part, l'exploitation du pool génétique naturel a permis de sélectionner des critères d'intérêt par

croisements génétiques, et d'autre part, le pool naturel a pu être élargi à des critères spécifiques par des méthodes de mutations génétiques.

5.1.1.1. Evolution et exploitation du potentiel génétique

Les gènes codant pour des caractères héréditaires des plantes varient souvent entre espèces, avec des différences géniques spécifiques à chaque espèce. La réorganisation continue des gènes par la reproduction sexuée et les mutations peuvent déterminer l'existence de gènes et/ou leur expression, ou encore générer de nouveaux gènes. Cette évolution permet aux populations de plantes de diversifier leur patrimoine génétique de manière à s'adapter aux conditions environnementales les plus sévères pour survivre. Ces potentialités naturelles ont largement été exploitées pour faire évoluer les performances agronomiques du tournesol cultivé. Ainsi, depuis plusieurs dizaines d'années, des gènes de résistance aux maladies (rouille, mildiou, sclérotinia), à l'infestation par l'orobanche, ont été identifiés chez des espèces sauvages et transférés chez le tournesol cultivé.

5.1.1.2. Croisements génétiques: la sélection dirigée

L'utilisation efficace de ces espèces naturelles s'accompagne de la sélection dirigée par croisements de manière à fixer les caractères d'intérêt et ainsi conserver ces caractéristiques d'un programme de sélection à l'autre. De plus, le tournesol étant allogame, il ne favorise pas la création de lignées pures. La sélection a nécessité l'utilisation de structures hybrides afin de faire évoluer les performances du tournesol cultivé. Depuis 1960, avec l'obtention de la stérilité mâle cytoplasmique (Leclercq, 1969), les progrès issus de la sélection d'hybrides à partir de croisements génétiques ont permis de doubler la production mondiale de tournesol en seulement 20 ans.

La sélection chez le tournesol s'est orientée dans un premier temps vers l'amélioration du rendement par la recherche et l'identification de variétés à fort potentiel de production. Dans cette optique, l'accent a été mis sur la sélection pour la résistance aux maladies responsables d'importantes pertes de rendement (phomopsis, sclérotinia, mildiou, orobanche et depuis 1996 phoma) et a conduit à la création d'hybrides de plus en plus résistants (Leclercq, 1970; Skoric, 1985; Tourveille de Labrouhe *et al.*, 2000; Vear et Tourveille de Labrouhe, 1988) grâce notamment au clonage et à la cartographie de certains gènes de résistance (Gentzbittel *et al.*, 1998). Ces 30 dernières années, l'amélioration des hybrides a notamment conduit à réduire la sensibilité à la verse (-80%), les attaques de sclérotinia sur capitule (-60%) et les dommages causés par le phomopsis sur tige (-30%) (Vear *et al.*, 2003). De nombreux croisements ont ainsi contribué à inscrire au catalogue

officiel des hybrides de plus en plus performants. L'homogénéité du remplissage des graines dans le capitule (taille du capitule, taille des graines à l'intérieur du capitule) a été recherchée par l'amélioration du remplissage à travers le choix de génotypes (hybrides à grosses graines) présentant le moins de fluctuation dans la distribution de matière sèche dans le capitule (Merrien, 1992). Dans la même optique, d'autres auteurs se sont intéressés à la synchronisation de la floraison entre génotypes de façon à optimiser la pollinisation (Somasekahara *et al.*, 2000).

Parallèlement à l'exploitation des potentialités génétiques, les programmes de sélection se sont attachés à améliorer les hybrides en étudiant l'adaptation des génotypes à l'environnement. Ainsi, des programmes de sélection ont été développés pour créer des pools génétiques tolérants à la sécheresse (fort ajustement osmotique des feuilles : Chimenti *et al.*, 2004; Chimenti et Hall, 1994), ou permettant une meilleure gestion de la fertilisation azotée.

Depuis longtemps, l'amélioration des teneurs en huile des akènes de tournesol constitue une priorité des programmes de sélection des pays de l'Est de l'Europe (Skoric, 1988). Les croisements réalisés en URSS ont permis d'augmenter la teneur en huile de 30% (20 à 50%) (Fick, 1975). Le pourcentage d'huile varie selon la proportion de l'amande (pouvant aller de 40 à 70%) et selon la proportion relative d'huile contenue dans l'amande (48 à 78%) (Leon *et al.*, 1995). Cette variabilité est d'origine génotypique (Vancreanu, 1977). D'ailleurs, une étude a montré qu'il est possible d'atteindre une teneur en huile de 63 % selon l'hybride concerné (Fick, 1983). Au niveau génétique, la quantité d'huile de la graine semble être sous la dépendance du génotype maternel (Thompson *et al.*, 1979).

Avec l'apparition des possibilités de jachère industrielle, les sélectionneurs se sont attachés à faire évoluer la composition des constituants de l'huile pour l'adapter à la demande de l'industrie alimentaire ou non alimentaire:

- faibles teneurs en acides gras saturés et fortes teneurs en tocophérols et phytostérols pour l'alimentation humaine,
- fortes concentrations en acides gras saturés évitant l'hydrogénation des margarines et matières grasses,
- faible concentration en C18:2 et de fortes concentrations en anti-oxydants (?- et d-tocophérols) tolérant de fortes températures lors de l'extraction de l'huile et une meilleure conservation de l'huile,
- fort taux de C18:1 ou phytostérols conférant des propriétés nutritionnelles et/ou fonctionnelles de l'huile.

Tous ces nouveaux critères de production qualitatifs ont conduit à développer des techniques de mutations génétiques dans le but de générer des génotypes présentant une composition modifiée de l'huile.

5.1.2. Mutations génétiques

Outre la sélection génétique traditionnelle ayant contribué à améliorer les seuils de composition naturels, les techniques de mutagenèse physico-chimique développées dès les années 70 ont conduit à la création de mutants présentant de teneurs modifiées en acides gras (Tableau 10). Ces mutants ont été développés de manière à fournir une large gamme de composition en acides gras, d'une part afin d'alimenter des filières industrielles spécifiques nécessitant des taux déterminés d'acides gras; d'autre part, dans le but d'étudier les processus biochimiques impliqués dans la biosynthèse des acides gras.

Tableau 10 : Composition en acides gras (%) de la graine de tournesol pour des mutants naturels ou induits en comparaison avec le tournesol standard

Mutants	Caractéristiques de l'huile	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	Références
Standard	Forte teneur en C18:2	7.0		4.0	17.0	72.0	Dorrell et Vick, 1997
Standard	Forte teneur en C18:2	6.5		3.0	40.9	49.6	Fernandez-Martinez <i>et al.</i> , 1993
2698-1	Forte teneur en C18:2					78.0	Miller et Vick, 2001
F6-sel.	Forte teneur en C18:2					77.3	Simpson <i>et al.</i> , 1989
Pervenets	Forte teneur en C18:1				79.3	14.8	Soldatov, 1976
HO lignées	Forte teneur en C18:1	4.9		2.9	90.3	1.8	Fernandez-Martinez <i>et al.</i> , 1993
M-4229	Forte teneur en C18:1	3.4		4.1	86.1	3.9	Vick et Miller, 1996
M-3067	Teneur mi-oléique	3.9		5.2	54.6	33.9	Vick et Miller, 1996
CAS-5	Forte teneur en C16:0	25.2	3.7	3.5	11.4	55.1	Osario <i>et al.</i> , 1995
CAS-12	Forte teneur en C16:0 Teneur mi-oléique	30.7	7.6	2.1	56.0	3.1	Fernandez-Martinez <i>et al.</i> , 1997
CAS-37	Forte teneur en C16:0 Forte teneur en C16:1	29.5	12.3	1.4	5.4	38.7	Salas <i>et al.</i> , 2004
CAS-14	Forte teneur en C18:0	8.4		37.3	12.4	38.0	Fernandez-Moya <i>et al.</i> , 2002
CAS-3	Forte teneur en C18:0	5.1		26.0	13.8	55.1	Osario <i>et al.</i> , 1995
CAS-4	Teneur mi-stéarique	5.4		11.3	34.6	48.0	Osario <i>et al.</i> , 1995
CAS-8	Teneur C18:0	5.8		9.9	20.4	63.8	Osario <i>et al.</i> , 1995

Les concentrations modifiées sont signalées en gras.

5.1.2.1. Mutants riches en acide oléique

Les variétés oléiques sont issues de la première variété population de tournesol oléique, Pervenets, obtenue par mutagenèse chimique au diméthylsulfate de la population VNIMK 8931 (Soldatov, 1976). La mutation se traduit par une augmentation de la teneur en C18:1 dans les triglycérides de réserve de la graine en réponse à la perte d'activité enzymatique embryonnaire de la Δ 12 désaturase responsable de la conversion de C18:1 en C18:2 (Garcés et al., 1989). En 1981, une autre mutation « hautement oléique » a été obtenue (lignée No654, Ivanov et Georgiev, 1981). Par la suite, ces génotypes ont été utilisés (Miller et Vick, 1984; Petakov, 1990) pour la sélection de variétés hybrides qui a conduit à des progrès significatifs assurant des potentiels de teneurs en C18:1 dans la graine intermédiaires par rapport aux génotypes standard (mi-oléique, 55%) (Vick et Miller, 1996), voire nettement supérieurs (oléique, plus de 90%) (Fernandez-Martinez *et al.*, 1993).

Les croisements entre lignées provenant de la population Pervenets et de lignées non oléiques ont permis d'étudier la ségrégation mendélienne des gènes de la mutation « hautement oléique ». La mutation sur un gène dominant (O11) s'est avéré fortement responsable du caractère « haute teneur en C18:1 » dans la graine (Fick, 1984; Urie, 1985). Néanmoins, d'autres croisements ont révélé l'existence d'un ou deux autres gènes supplémentaires responsables de cette mutation (O12 et O13) (Fernandez-Martinez *et al.*, 1989; Perez-Vich *et al.*, 2002), avec des effets moindres sur la teneur en C18:1. Ces gènes récessifs joueraient le rôle de facteurs « modificateurs » responsables des plus faibles teneurs en C18:1 obtenue pour certains croisements (Miller *et al.*, 1987). Le caractère « hautement oléique » correspond donc à un facteur génétique majeur influencé par ces « modificateurs » qui agissent indépendamment des conditions environnementales (Fick *et al.*, 1984). Ainsi, la présence de la mutation n'est pas suffisante pour induire le phénotype oléique; le caractère « hautement oléique » serait contrôlé par au moins trois loci (Lacombe *et al.*, 2004) (. Cependant, dans ces études, le phénotype oléique est toujours dominant sans effet maternel majeur Lacombe et Bervillé, 2000; Varès *et al.*, 2000).

Au niveau moléculaire, la mutation oléique est caractérisée par une duplication associée à un réarrangement du gène Δ 12 désaturase sur un même locus. Cette duplication modifierait les séquences régulatrices adjacentes et entraînerait l'absence d'expression du gène de la Δ 12 désaturase (Hongtrakul *et al.*, 1998). Certains auteurs émettent l'hypothèse que cette région répétée en tandem serait à l'origine du caractère « hautement oléique » soit par un phénomène de suppression de l'expression du gène non muté de la Δ 12 désaturase, soit par un effet « gene silencing » qui induirait l'expression du gène muté (Lacombe *et al.*, 2002). De plus, cette insertion unique porterait une partie des séquences codantes et des introns de l'oléate désaturase (Lacombe *et*

et al., 2004). Bien que plusieurs études aient mis en évidence la réduction de l'expression du gène de la $\Delta 12$ désaturase dans les graines de génotypes oléiques (Kabbaj *et al.*, 1996; Lagravère *et al.*, 2000; Lacombe *et al.*, 2000) le caractère allo-polyploïde du tournesol ainsi que le caractère aléatoire des mutants présentant le phénotype oléique laissent envisager de nombreuses isoformes des enzymes désaturases et complexifie de ce fait les études moléculaires ainsi que la production de génotypes à hautes teneurs oléiques stables et performants.

5.1.2.2. Mutants riches en acide stéarique

Des mutants contenant des teneurs en C18:0 six fois supérieures aux teneurs des variétés classiques ont été développés (Osario *et al.*, 1995). Ces mutants ont été obtenus par traitement à l'éthylméthane sulfonate de la lignée RDF-1-532. Le croisement du mutant « hautement stéarique » avec des variétés oléiques a donné naissance à une autre catégorie de mutants (CAS-3, Perez-Vich *et al.*, 2000b) dont l'huile possède une forte stabilité oxydative due à la présence de C18:1 ainsi qu'une haute plasticité grâce au C18:0. L'huile obtenue a une haute valeur ajoutée pour l'industrie alimentaire (Purdy, 1986; Wardlaw et Snook, 1990). Plus récemment, un mutant à très haute teneur en C18:0 (supérieur à 35%) a été isolé (Fernandez-Moya *et al.*, 2002). Le caractère de forte teneur en C18:0 est déterminé par deux loci qui subissent un effet épistasique par les loci responsables de la haute teneur en acide palmitique (C16:0) (Perez-Vich *et al.*, 2000a). Certains auteurs suggèrent que *in vivo*, le phénotype « riche en C18:0 » résulte de l'effet combiné de la réduction de l'activité de l'enzyme stearoyl-ACP désaturase et de l'augmentation de l'activité acyl-ACP thioestérase (Cantisano *et al.*, 2000).

5.1.2.3. Mutants riches en acide palmitique

Les variétés mutantes « riches en C16:0 » (environ 30%) ont été obtenues par irradiation aux rayons X de tournesols standard (génotype CAS-5) (Osario *et al.*, 1995) et oléique (génotype CAS-12) (Fernandez-Martinez *et al.*, 1997). Trois gènes sont responsables du caractère « riches en C16:0 » (Perez-Vich *et al.*, 1998). Ce phénotype serait dû à un effet combiné de l'activité de deux enzymes intervenant dans la synthèse des acides gras (activité faible de la β -kétol-acyl protéine synthase II et une haute activité thioestérase sur le palmitoyl-ACP (C16:0-ACP)) (Garcés *et al.*, 2000). Ces mutants possèdent trois autres acides gras : l'acide palmitoléique (16:1 $\Delta 9$), l'acide asclépique (18:1 $\Delta 11$) et l'acide palmitolinoléique (16:2 $\Delta 9 \Delta 12$) du à l'hydrolyse complète du C16-ACP par la thioestérase (Salas *et al.*, 2004).

5.1.2.4. Mutants riches en tocophérols

La modification du profil tocophérols a également été étudiée dans le but de remplacer l' α -tocophérol par d'autres dérivés tocophérols de façon à augmenter le degré de stabilité oxydative de l'huile de tournesol. Les efforts de sélection ont conduit au développement et à la caractérisation de plusieurs sources de profil tocophérolique modifié chez le tournesol. Deux lignées (LG15, LG17) ont été isolées contenant respectivement d'importantes teneurs en β -tocophérol (50% des tocophérols totaux) et en γ -tocophérol (95% des tocophérols totaux) (Demurin, 1993; Demurin *et al.*, 1996). D'autres auteurs ont obtenu encore davantage d' γ -tocophérol (>95%) (Velasco *et al.*, 2004). Demurin (1993) ont également mis en évidence les deux gènes indépendants (*Tph1* et *Tph2*) contrôlant la composition en tocophérols des graines de tournesol. Le gène *Tph1* contrôle le ratio α/β tocophérols tandis que le gène *Tph2* affecte les formes α et γ .

La sélection facilite l'évolution continue des potentialités variétales à travers la création de nouveaux hybrides. En associant les modifications génétiques engendrées par mutagenèse, les recherches pour la sélection tendent vers une large diversité de composition qui soit également stable et héritable. Ainsi, la stabilité du caractère richesse en oléique des génotypes est un objectif primordial de sélection.

Concernant les critères de composition en acides gras de l'huile de tournesol, deux types variétaux ont été développés jusqu'à ce jour: les cultivars standard et oléiques. Cependant, il existe des sources de variation au sein de ces deux types qui dépendent de leurs origines géographique et génétique: croisement de lignées entre elles, de lignées et d'hybrides ou d'hybrides entre eux. En effet, beaucoup d'études ont mis en évidence un fort effet du facteur « génotype » qui correspond à l'origine parentale des hybrides concernés (Radford et Nielsen, 1982; Unger, 1980). Par exemple, certains travaux ont montré une variabilité du rapport teneur en huile/rendement selon les génotypes (El Asri *et al.*, 2000; Fernandez-Martinez *et al.*, 1995; Piva *et al.*, 2000); ainsi que la variabilité de composition en acides gras. L'influence des génotypes module la réponse selon leur capacité à tolérer les stress et à accumuler des acides gras déterminés (notamment pour les variétés oléiques). Chez les hybrides standard, les teneurs en C18:2 peuvent varier de 25 à 45% tandis que chez les hybrides oléiques, la gamme s'étend de 70 à 90%. Le facteur « génotype » semble également être une source de variation de la concentration en composés mineurs tels que les phytostérols; chez le colza par exemple (Abidi *et al.*, 1999). En Argentine, de nombreux programmes de sélection ont été entrepris visant à évaluer la stabilité des génotypes dans des environnements géographiques spécifiques vis-à-vis du rendement grain, de la teneur en huile et en C18:1 (Aguero *et al.*, 2000).

L'expression de ces potentialités génétiques varie selon les conditions environnementales (température, eau...) et les conduites de culture (régime hydrique, apport azoté, date de semis). La composition de la graine est donc tributaire de deux types de facteurs agri-environnementaux: ceux que l'on ne peut contrôler (climat, sols), ceux qu'il est possible de maîtriser (apports nutritifs par la fertilisation, disponibilité hydrique par l'irrigation, choix du génotype, prévention contre les maladies).

5.2. Facteurs agri-environnementaux

5.2.1. Température

La température subit par la plante durant la formation de la graine de tournesol constitue un facteur déterminant sa composition.

5.2.1.1. Huile et protéines

Selon l'espèce oléagineuse (colza, ricin, lin textile, carthame et tournesol), la teneur en huile varie différemment avec la température (Canvin, 1965). Alors qu'une augmentation de température de 10 à 21°C en moyenne induit une accumulation de l'huile dans la graine de ricin et de tournesol, la teneur en huile des graines de colza et de lin textile diminue proportionnellement avec l'élévation de température (Trémolières et al., 1982; Harris *et al.*, 1978; Rondanini *et al.*, 2003). Cependant, au delà de 21°C, une augmentation de 1°C diminue la teneur en huile de la graine de tournesol de 1% (Triboi-Blondel *et al.*, 2000). Cette variation de teneur en huile sous l'effet des conditions de température est parfois inversement corrélée à la teneur en protéines de la graine (Goyne *et al.*, 1979; Triboi-Blondel *et al.*, 2000). Cette corrélation est comparable à celle observée chez le colza (Triboi et Renard, 1999) pour laquelle une augmentation de 8°C s'accompagne de la réduction de 5.5% de la teneur en huile et de l'augmentation de 6.4% de la teneur en protéines. Ainsi, l'augmentation de la température se traduit par une augmentation de la teneur en protéines. Néanmoins, il existe des interactions entre les conditions environnementales et le génotype. En effet, certains auteurs n'observent pas de modification de la teneur en huile pour deux génotypes (standard et oléique) en conditions contrôlées de hausse de température de jour (Champolivier et Merrien, 1996) ou de nuit (Izquierdo *et al.*, 2002).

Les pratiques culturales, comme le décalage de la date de semis, constitue un moyen de générer des conditions thermiques différentes durant la maturation des graines et d'en observer les

conséquences sur la composition de la graine. Cette pratique est surtout utilisée dans les pays méditerranéens (Italie, France, Espagne, Maroc...) afin d'éviter les contraintes climatiques généralement sévères, telles les fortes températures, les forts déficit hydriques ou encore le froid pendant l'installation du couvert (semis d'automne). En Espagne, le semis précoce (hivernal) peut s'avérer une stratégie pour éviter de trop longues périodes de sécheresse nuisibles à la production (Gimeno *et al.*, 1989; Soriano *et al.*, 2004). Dans d'autres pays où le tournesol est semé en culture de printemps, les conditions climatiques d'un semis décalé (mi-Janvier à mi-Février), s'avèrent moins favorables à l'élaboration du rendement et à l'accumulation d'huile qu'un semis classique (Singh *et al.*, 1997). Mais dans tous les cas, ces pratiques mettent en jeu des variations de températures et des bilans hydriques distincts qui entraînent des modifications de paramètres dépendants de la physiologie de la plante.

Globalement, des réductions du taux d'huile sous l'effet de semis tardifs ont été observées que ce soit dans des environnements tempérés (Miller et Vick, 1984; Robinson, 1970; Unger, 1980) ou sub-tropicaux (Bange *et al.*, 1997; Patil *et al.*, 1989). Cet effet résulte dans certains cas d'une interaction entre date de semis et génotype utilisé. Une forte interaction « date de semis*génotype » dans le cas de semis d'automne (fin Octobre, mi Décembre) a été démontré, précisant toutefois que 75% de la variabilité du rendement en huile est expliquée par le facteur « date de semis » (De la Vega et Hall, 2002a; De la Vega et Hall, 2002b). Les variations de taux d'huile entre dates de semis seraient dues à un effet combiné de changements de durée de remplissage du grain et de proportions d'huile dans l'amande.

5.2.1.2. Acides gras

Les effets des conditions de température sur la teneur en acides gras apparaissent moins controversées. Globalement, l'élévation de température est associée à une augmentation de la teneur en C18:1 et une diminution concomitante de la teneur en C18:2 (Canvin, 1965; Champolivier et Merrien, 1996; Piva *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 1989). A l'inverse, des températures plus tempérées entraînent une chute du pourcentage de C18:1. Dans le cas de génotypes standard, le ratio C18:1/ C18:2 est modifié lorsque ces conditions de température sont appliquées durant l'ensemble du cycle (Lajara *et al.*, 1990; Rawson *et al.*, 1984; Trémolières *et al.*, 1982), de l'anthèse à la maturité (Martinez-Force *et al.*, 1998; Triboi-Blondel *et al.*, 2000) ou en fin de remplissage de la graine (Merrien *et al.*, 1993).

Les variations de pourcentages en acides gras insaturés peuvent être attribuées à différents critères de température. En effet, certaines études proposent de tenir compte de la température moyenne (Seiler, 1983) tandis que d'autres proposent les extrêmes de température minimum (Harris *et al.*, 1978); ou maximum (Nagao et Yamazaki, 1983), pour expliquer la modification du degré d'insaturation des acides gras de l'huile de tournesol. Certains auteurs suggèrent que les températures de nuit en phase post-florale (de 15°C à 22°C) expliquent davantage les variations de teneurs en acides gras insaturés (Rochester et Silver, 1983). Izquierdo *et al.* (2002) précisent que l'augmentation de teneur en C18:1 serait liée à de brèves hausses de températures de nuit, en particulier appliquées pendant les phases précoces du développement (entre 0 et 200°C jour après floraison).

Il a été montré, chez une autre espèce (*Arabidopsis thaliana*), que l'expression du génome pourrait être régulée par la température à travers une augmentation du taux d'ARNm produit et donc de l'enzyme disponible (Okuley *et al.*, 1994). Dans le cas du tournesol, la température joue un rôle sur l'expression du gène de la Δ 12 désaturase et le taux de transcription du gène est accru pour des conditions de températures de 26°C/22°C (diurne/nocturne) par rapport à des températures de 20°C/18°C (Kabbaj *et al.*, 1996).

La température exerce également une action significative sur l'activité enzymatique *in vitro* de la Δ 12 désaturase (oleoyl-PC désaturase contenue dans la fraction microsomale), avec une augmentation progressive jusqu'à 20°C (Garcés *et al.*, 1989), suivie d'une diminution pour des températures supérieures à 20°C (jusqu'à 45°C) (Garcés et Mancha, 1991). Ce comportement à faible température s'observe aussi sur la graine de carthame pour laquelle l'activité Δ 12 désaturase augmente pour des températures comprises entre 12 et 35°C (Stymne et Stobart, 1986). Il en résulte une relation négative entre la température et la teneur en C18:2. Plus la température est élevée, plus le pourcentage de C18:1 dans l'huile augmente et plus celui du C18:2 diminue.

Néanmoins l'action de l'enzyme Δ 12 désaturase n'est pas seule responsable de la teneur finale en acides gras. En effet, Lagravère *et al.* (2000) suggère que l'activité ou l'expression du gène de l'enzyme Δ 9 désaturase (stéaroyl-ACP désaturase) catalysant la transformation de l'acide stéarique (C18:0) en C18:1, soient également sous la dépendance de la température. Kabbaj *et al.* (1996) ont montré que pour une lignée standard, le niveau de transcription de cette enzyme et de la Δ 12 désaturase est accrue lorsque la température augmente (26°C jour/22°C nuit par rapport à 20°C jour/18°C) et que dans ces conditions de température, la quantité d'ARN_m de Δ 9 désaturase est supérieure à celle de la Δ 12 désaturase. Ainsi, la forte teneur en C18:1 serait due à la combinaison d'une forte accumulation d'ARN_m de Δ 9 désaturase associée à une baisse d'activité de l'enzyme

?12 désaturase. Une autre étude menée en conditions naturelles sur 33 sites avec des génotypes standard a montré que plus les températures sont froides, plus la teneur en C18:0 est forte (Lajara *et al.*, 1990); l'amplitude de variation pouvant atteindre 2.8%. Des variations similaires ont été observées dans le cas des mutants CAS-4 et CAS-8 dont les teneurs en C18:0 sont un peu plus élevées et pour lesquels une corrélation positive a été décrite entre teneur en C18:0 et faible température (Martinez-Force *et al.*, 1998). Cependant, l'action de la température varie selon le génotype ou l'espèce concerné. L'enzyme stéarate désaturase, responsable du phénotype « haute teneur en C18:0 » des graines de mutants CAS-14, est au contraire inhibée lorsque la température avoisine 40°C/25°C par rapport à des températures plus fraîches (30/20°C), conduisant à une teneur en C18:0 maximale (Fernandez-Moya *et al.*, 2002). Ces résultats coïncident avec ceux obtenus sur le soja montrant une activité de la stéarate désaturase diminuée sous l'influence de fortes températures, ce qui conduit à augmenter le pourcentage de C18:0 (Cheesbrough, 1990). Une étude chez le lin (*Linum usitatissimum* L.) montre également une augmentation significative des pourcentages en acides gras saturés (C18:0 et C16:0) en réponse à une augmentation de température (Green, 1986).

Que ce soit en réponse aux variations de température de nuit ou de jour, les génotypes standard présentent des variations de teneurs en acides gras les plus importantes par rapport aux génotypes oléiques (Izquierdo *et al.*, 2002; Lagravère *et al.*, 2000). Certains auteurs enregistrent néanmoins des variations de la teneurs en C18:1 de génotypes oléiques (de 85 à 90%), semblables à celles d'un génotype standard sous l'effet de fortes températures (34°C/22°C à 21°C/14°C). La répartition des acides gras est identique dans les deux conditions de températures en fonction des classes lipidiques (triglycérides, diglycérides, lipides polaires) (Garcès et Mancha, 1989).

Outre le niveau de température lui-même, le stade d'application d'un stress thermique fort (> à 35°C) influe sur la composition en acides gras. Le profil d'acides gras est modifié au cours de son élaboration principalement entre 19 et 26 jours après anthèse. L'application de ce stress dans les phases précoces du développement permet à l'oléate désaturase de retrouver partiellement son activité en fin de traitement alors que si le stress est appliqué tardivement (fin du processus d'accumulation d'huile), l'arrêt de l'activité désaturase est irréversible et 3 jours de fortes températures situés en début de formation des graines suffisent à modifier le profil final d'acide gras (Rondanini *et al.*, 2003).

En conditions naturelles, la pratique des semis décalés génère une gamme de variations de températures et de sommes de températures accumulées durant le développement de la culture. La date de semis influencerait sur la composition en acides gras en modifiant l'ontogenèse (Connor et

Sadras, 1992). Pour les hybrides standard, en raison de la hausse de température, le retard de semis induit une réduction de teneur en C18:1 et une augmentation du pourcentage en C18:2 (Jones, 1984; Unger, 1986). Outre une modification des sommes de température, ces pratiques entraînent également des variations de durée de remplissage. Une étude pluri-annuelle a montré que le décalage de la date de semis d'un mois (de Avril à Mai) induit une augmentation significative du ratio C18:1/C18:2 (près de +7% de C18:1) dans les graines des génotypes standard (hybrides et populations provenant du Maroc) en raison de l'augmentation de la durée de la période de remplissage du grain associée à de fortes températures pendant cette période (Roche *et al.*, 2004). Des variations similaires de composition en acides gras et de teneur en huile dans les graines de génotypes oléiques ont été observées (Flagella *et al.*, 2002). Un effet de la durée de remplissage sur la teneur en huile est également noté lorsque le semis est décalé de Mars à Mai (Anastasi *et al.*, 2003).

5.2.1.3. Composés mineurs

Peu d'études relatent des modifications de la composition de la fraction insaponifiable. Certaines soulignent néanmoins que la température semble jouer un rôle dans l'accumulation de certains phytostérols chez divers oléagineux. Dans la graine de soja, la quantité de phytostérols totaux augmentent avec l'élévation de température (variation de 2.5 fois entre 20°C/10°C et 35°C/25°C jour/nuit) (Vlahakis et Hazebroek, 2000). Cependant, la composition phytostérols varie selon le stérol considéré. Ainsi, de fortes températures induisent une augmentation du campestérol mais une diminution du stigmastérol et du β sitostérol. A l'inverse, le niveau de tocophérols des graines de soja diminue lorsque la température est plus forte (Dolde *et al.*, 1999), qui se traduit par une corrélation négative entre phytostérols et tocophérols totaux. Chez le tournesol, la concentration en tocophérols totaux est corrélée négativement avec la teneur en C18:1, et positivement avec les acides gras saturés (Nagao et Yamazaki, 1983), suggérant que le facteur température agit sur la concentration en tocophérols de la même manière que sur la composition en acides gras insaturés. De même, chez le soja, une très forte corrélation positive entre la concentration en tocophérols totaux et la teneur en C18:2 a été mise en évidence; tandis qu'aucune relation n'a pu être établit entre ces deux critères chez le colza. D'après Anastasi *et al.*, 2000, la fraction insaponifiable de l'huile de le tournesol est négativement affectée par de fortes températures. Néanmoins, le maximum de tocophérols et phytostérols est observé lorsque les températures sont les plus élevées; ce qui suggère que d'autres composés appartenant à la fraction insaponifiable, tels les alcools, diminuent dans ces conditions.

5.2.2. Disponibilité hydrique

Contrairement à la température, le facteur « eau » a été davantage étudié en raison de son influence sur la productivité. La réponse physiologique du tournesol à la disponibilité hydrique est relativement bien connue et sa consommation en eau est maîtrisée pour l'obtention de rendements optimums (Picq, 1989; Merrien *et al.*, 1981a; Connor *et al.*, 1985).

Cependant, les données concernant l'effet de la disponibilité hydrique sur la composition de la graine de tournesol sont souvent peu nombreuses et contradictoires en raison de la variabilité des conditions expérimentales (intensité et stades d'application des stress) qui modifient la réponse de la culture en terme de transpiration et de développement (Flénet *et al.*, 1996; Flénet *et al.*, 1997). La période de sensibilité du tournesol relative à l'alimentation hydrique se situe entre le début de la floraison jusqu'au remplissage des graines lorsque les graines sont susceptibles d'avorter, donc de réduire leur nombre produit par unité de surface (Steer et Hocking, 1987), ainsi que leur poids (Hall *et al.*, 1985). La sensibilité est forte dans le cas d'un stress hydrique brutal (Hall *et al.*, 1985) alors qu'un stress progressif permet une adaptation qui améliore le remplissage. D'après Maury (1997), il existe néanmoins différentes stratégies d'adaptation à la sécheresse selon le potentiel génétique régis, notamment, à travers le contrôle stomatique de la face inférieure de la feuille (Planchon, 1990).

5.2.2.1. *Remplissage de la graine et translocations*

Un stress hydrique sévère et brutal pendant le remplissage de la graine affecte les caractéristiques physiques des graines comme leur taille (Baldini *et al.*, 1999), leur poids (Unger, 1982) et le pourcentage de coque (Connor et Hall, 1997).

Le remplissage des graines dépend du fonctionnement photosynthétique du couvert et du transfert de photoassimilats. Dans de bonnes conditions d'alimentation hydrique, le remplissage des akènes s'effectue principalement grâce à l'assimilation post-floraison qui est conditionnée par l'état physiologique de l'appareil végétatif (Blanchet et Merrien, 1982). En conditions de stress hydrique, le remplissage des graines s'effectue plutôt à partir de la redistribution d'assimilats des feuilles vers le capitule provenant des organes végétatifs. L'alimentation hydrique joue un rôle important sur la survie du feuillage (Connor *et al.*, 1985; Merrien *et al.*, 1981a), et par conséquent sur le maintien de l'activité photosynthétique. Souvent, celle-ci n'assure qu'une partie de la lipidogénèse et le complément est fourni par l'hydrolyse des composés glucidiques des tiges et des feuilles

sénescentes dont les produits sont redistribués vers les graines. Selon l'importance des deux sources, les graines sont plus ou moins bien remplies (Blanchet, 1987).

5.2.2.2. Huile et protéines

De manière générale, un stress hydrique appliqué après la floraison entraîne une diminution de la teneur en huile des graines de tournesol récoltées. De brèves périodes d'exposition à un stress hydrique provoque une réduction de la teneur en huile qui est associée à l'augmentation de la proportion de coque (Hall *et al.*, 1985; Hall *et al.*, 1990).

Le stade d'application du stress hydrique joue un rôle capital dans l'élaboration de la fraction lipidique. Talha et Osman (1974) ont étudié 4 périodes du cycle de croissance (faible élongation, 15 jours après semis; rapide élongation, 38 jours après semis; floraison, 63 jours après semis; et remplissage de la graine, 86 jours après semis) durant lesquelles un stress hydrique sévère (-1,5 MPa) est appliqué. Ces auteurs constatent que plus le stade d'application du stress hydrique est précoce, plus la teneur en huile est réduite. Cette diminution s'accompagne de l'amélioration de l'efficacité d'utilisation de l'eau pour la production des graines et d'huile; plus le stress est tardif, plus l'efficacité est meilleure car la plante a le temps de mettre en place sa stratégie d'adaptation à la contrainte hydrique. Toutefois, les stades de sensibilité maximale de la plante pour la synthèse de la fraction lipidique concernent les phases finales du remplissage de la graine (Morizet et Merrien, 1990). La lipidogénèse s'effectue tardivement, à partir des métabolites fournis par l'assimilation qui se produit en fin de cycle. Piva *et al.* (2000) précisent que les hautes teneurs en huile semblent dépendre de l'état hydrique de la plante pendant les phases F1-M0 (début floraison-début remplissage de la graine) et M0-M2 (début remplissage de la graine-fin remplissage de la graine) (Merrien, 1992). Baldini *et al.* (2002) observent également une réduction du taux d'huile (9 points) suite à un stress hydrique sévère alors qu'un stress hydrique modéré s'accompagne d'une augmentation du pourcentage d'huile.

L'intensité de la contrainte hydrique s'avère également d'une grande importance dans la détermination de la teneur en huile. Ainsi, Santonoceto *et al.* (2003) notent un renforcement de ce taux corrélé positivement à l'apport d'irrigation de 33% à 100% de la satisfaction des besoins en eau de la culture. De manière générale, une conduite irriguée en phase post-florale permet d'améliorer le taux d'huile quelle que soit la situation (El Asri *et al.*, 2000; Flagella *et al.*, 2000; Mekki *et al.*, 1999).

Cette augmentation de la teneur en matières grasses s'accompagne d'une relative stabilité de la teneur en protéines des graines en condition de stress hydrique (Talha et Osman, 1974).

5.2.2.3. Acides gras

Les relations entre la composition en acides gras de l'huile et la disponibilité hydrique restent encore mal connues et controversées. Ces résultats variables entre études résultent des différences dans les dates d'application et d'intensité du stress hydrique, ainsi que de la multiplicité de critères utilisés pour caractériser le niveau de disponibilité hydrique.

Quelques travaux (Baldini *et al.*, 2000; Baldini *et al.*, 2002) font ressortir l'effet positif du stress hydrique modéré sur la teneur en C18:1 (+5%) dans le cas de génotypes standard et oléique. Talha et Osman (1974) relèvent également une augmentation de cette teneur pour un stress appliqué au stade d'élongation et une diminution simultanée de la teneur en C18:2. Ces auteurs précisent que plus le stade d'application du stress est tardif, plus le ratio de C18:1/C18:2 diminue (de 2.09 pour le stade le plus précoce à 1.52 pour le stade le plus tardif).

A contrario, d'autres études ont montré que l'apport d'eau favorise la production de C18:1. Santonoceto *et al.* (2003) indiquent que jusqu'à 67% de l'ETM (évapotranspiration maximale), la teneur en C18:1 n'est pas affectée et que le régime hydrique satisfaisant les besoins en eau de la culture (100% de l'ETM) permet d'atteindre les maximum en C18:1. Néanmoins, une forte interaction génotype*régime hydrique introduit un élément de variabilité de la composition des graines supplémentaire.

Dans le cas des acides gras saturés, l'effet de la disponibilité hydrique varie également selon les conditions expérimentales. Un déficit hydrique durant le remplissage de la graine est associé à une augmentation des teneurs en acides gras saturés (Piva *et al.*, 2000); alors que d'autres études n'enregistrent cette augmentation que pour le C18:0 (Flagella *et al.*, 2002), ou aucune augmentation des acides gras saturés (Santonoceto *et al.*, 2003).

5.2.3. Rayonnement incident

Comme nous l'avons vu précédemment, il apparaît que l'activité photosynthétique du couvert végétal influence l'élaboration du rendement, le remplissage des graines et donc la mise en place des constituants. L'énergie solaire est transformée par la photosynthèse en énergie potentielle chimique sous forme de biomasse contenue dans les différents organes (racines, tiges, feuilles...) et

de composés de réserve de la graine (glucides, protéines et huile). Il est donc légitime de prendre en compte la lumière solaire qui constitue le moteur du fonctionnement des principaux capteurs et transformateurs de l'énergie solaire incidente que sont les feuilles. Le rayonnement global incident capté par la plante peut être déterminé par le PAR (photosynthetic active radiation), correspondant à l'énergie lumineuse photosynthétiquement active interceptée par le couvert (Picq, 1989). Ce paramètre permet de rendre compte de l'activité photosynthétique du couvert. Il est défini par la loi de Beer suivante: $PAR_j = a \times (RA_j) \times (1 - \exp(-bLAI_j))$ où RA correspond au rayonnement global journalier ($MJ.m^{-2}$); a, le coefficient de transformation d'énergie (0.5); (-b), le coefficient d'extinction et LAI, l'indice foliaire journalier.

Récemment, les effets du rayonnement incident sur la répartition des composés de la graine ont été étudiés. Ainsi, Dans le cas d'une intervention sur la surface foliaire interceptrice, la diminution de rendement en huile observée pour des plantes soumises à un effeuillage ou à une période d'ombrage est positivement liée à celle du PAR (Dosio *et al.*, 2000). Le PAR intercepté jouerait donc un rôle sur le remplissage des graines en déterminant la production d'huile. Cette réduction résulterait plus particulièrement, de l'effet du rayonnement intercepté sur les trois composantes du rendement huile que sont le nombre de graines, le poids des graines, et la teneur en huile; en modifiant notamment le taux et la durée de remplissage. Les variations de concentrations en huile sont corrélées au PAR intercepté de la fin floraison (R6, +46°C jours après floraison, base 6) à la maturité physiologique (R9, Schneiter et Miller, 1981). Une diminution du PAR entre 7 à 10 jours pendant le remplissage de la graine affecte la teneur en huile et leur poids; et le PAR intercepté entre 250 et 450°C jours après floraison explique le mieux la variabilité de ces deux composantes du rendement en huile (Aguirrezabal *et al.*, 2003). D'ailleurs, d'autres auteurs ajoutent que la moyenne journalière de PAR entre 30 jours avant et 20 jours après floraison est un bon indice de prédiction du nombre de graines potentielles (Cantagallo *et al.*, 1997). Cependant, ces observations impliquent de nouveau des interactions avec le génotype, puisque ces études montrent que des génotypes à faible potentiel de production d'huile ne sont pas concernés par l'effet du rayonnement incident. De plus, d'après Aguirrezabal *et al.* (2003), il semble qu'il y ait un seuil au au-delà duquel la teneur en huile ne varie plus (Figure 17).

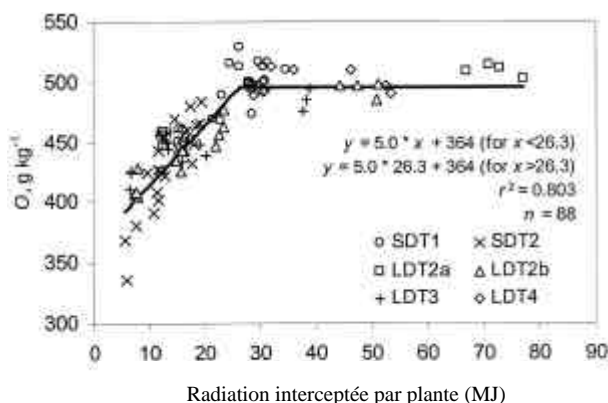


Figure 17 : Teneur en huile (O, g d'huile/kg de matière sèche) en fonction de la radiation interceptée par plante entre 250 et 450°C jours après floraison pour plusieurs génotypes, d'après Aguirrezabal *et al.* (2003)

D'un point de vue productivité, l'énergie interceptée est largement corrélée au rendement (Figure 18), jusqu'à l'obtention d'un indice foliaire (IF) permettant d'intercepter l'énergie maximale (2,5-3) (Aguirrezabal *et al.*, 2003; Picq, 1989) (Figure 19). Donc globalement, ce n'est qu'en deçà d'un seuil critique que l'interception du rayonnement devient un facteur limitant pour l'accumulation de matière sèche et d'huile dans la graine. Concernant l'efficacité de l'interception lumineuse du couvert, il est à noter que la densité de peuplement influe également sur l'activité photosynthétique du couvert. Un peuplement de forte densité (10 plantes/m²) peut engendrer une compétition entre plante qui peut conduire à une diminution du rendement liée à la modification des relations source-puits (Merrien *et al.*, 1983). De même, une faible densité de semis n'entraîne pas d'augmentation du nombre potentiel de grains (Lopez Pereira *et al.*, 2004). Cet effet peuplement est bien connu et la densité de peuplement classiquement utilisée (7 plantes/m²) permet d'éviter ce type de comportement du couvert et de se placer dans des conditions optimales de formation et de remplissage de la graine.

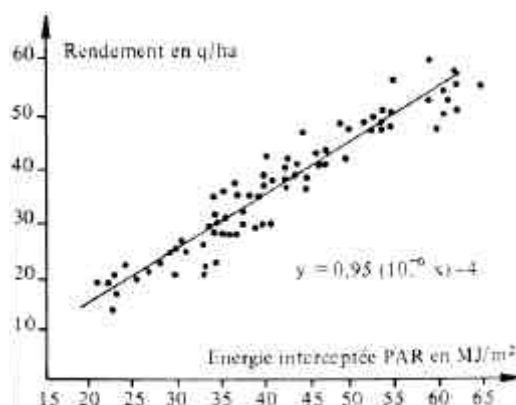


Figure 18 : Rendement en grain et rayonnement intercepté par le couvert de fin floraison à maturité, d'après Picq, 1989

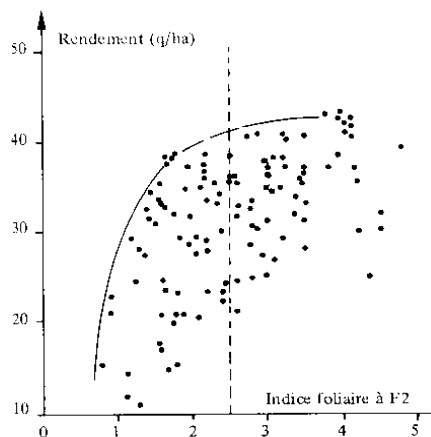


Figure 19 : Relation entre rendement et indice foliaire à F2, d'après Merrien et Grandin, 1990

5.2.4. Alimentation azotée

La fertilisation azotée intervient dans le remplissage de la graine et plus particulièrement dans l'accumulation des composés protéiques dans la mesure où elle influence l'assimilation nette d'azote au cours du cycle. Une fourniture azotée précoce favorise le développement de l'appareil végétatif, l'assimilation nette s'arrête précocement et le remplissage des akènes s'effectue alors à partir de la redistribution d'assimilats pour aboutir à des akènes riches en protéines (Blanchet *et al.*, 1986). En revanche, lorsque l'azote est apporté plus tardivement, le couvert est maintenu actif jusqu'à un stade proche de la maturité ce qui augmente la durée du fonctionnement photosynthétique et indirectement la lipidogénèse. Les akènes sont dans ce cas plus riches en lipides. D'après Picq (1989), le tournesol présentant un IF élevé à la floraison (entre 4 et 5) conduit à de fortes teneurs en protéines et de faibles teneurs en huile, alors qu'un IF réduit (entre 2 et 3) permet d'obtenir des graines présentant une forte teneur en huile et une teneur en protéines moyenne. Dans ce cas encore, c'est la durée de remplissage plus longue pour des plantes présentant un IF réduit qui influe sur la composition des graines. Ainsi, lorsque les conditions d'alimentation minérale ne donnent pas lieu à des carences physiologiques, le rôle de la fertilisation azotée sur la composition des graines relève davantage de l'établissement d'un couvert suffisamment important pour capter l'énergie nécessaire au remplissage que de l'effet direct de l'alimentation azotée. Toutefois, il a été observé que de fortes disponibilités en azote, particulièrement après la floraison et durant le remplissage des graines, peut réduire le taux d'huile contenu dans les graines, bien que les quantités absolues d'huile par graine augmente (Steer et Hocking, 1984). De même, des doses croissantes d'azote (de 0.5g à 6g d'N/plante) entraîne une augmentation de la teneur en protéines, mais traduit surtout une insuffisance d'alimentation azotée lorsque les doses sont trop faibles (Blanchet, 1987). Ceci laisse supposer que la composition en huile et en protéines dépend

également des redistributions tardives de composés qui sont indépendantes de l'activité photosynthétique des feuilles alors sénescentes.

De manière plus globale, les besoins en azote du tournesol se situent autour de 180-200 kg.ha⁻¹ (pour un rendement de 30q/ha). Cependant, la limitation de l'apport azoté permet de contrôler le développement foliaire, et ainsi de favoriser la synthèse des constituants de l'huile sans que cet itinéraire ne pénalise le rendement. Aussi, dans les conditions de culture où la fertilité du sol n'est pas limitante, c'est-à-dire un itinéraire cultural adapté associé à des apports azotés raisonnés, le facteur « alimentation azotée » peut être maîtrisé pour la production d'une récolte de qualité.

5.2.5. Sol

L'effet du sol correspond à l'impact des différentes caractéristiques de celui-ci susceptibles de modifier la croissance et le développement de la culture. Par exemple, la forte salinité caractérisant certains types de sol (0.6 à 12 dS.m⁻¹), entraîne des modifications de développement qui se répercutent sur la formation et le remplissage des graines. Ainsi, le rendement et la teneur en huile des graines diminuent tandis que la teneur en C18:1 augmente, traduisant une réduction de la phase d'accumulation des lipides et des modifications de fonctionnements métaboliques (Flagella *et al.*, 2004). Mais c'est essentiellement à travers la disponibilité hydrique que l'effet du type de sol se manifeste. Par exemple, dans une étude réalisée sur des cultures de tournesols oléiques, la faible profondeur du sol explique en partie la baisse de rendement par rapport aux tournesols classiques généralement implantés dans des sols profonds à forte réserve utile (Lagravère *et al.*, 1998). De même, le drainage du sol influe sur les propriétés du sol; les jeunes plants soumis à un ennoyage de plus de 3 jours ne survivent pas (Kawase, 1974). En conséquence, évaluer l'effet du sol revient à étudier l'effet des facteurs précédemment présentés qui le caractérisent et qui influencent la culture.

L'étude bibliographique présentée ici met en évidence l'importance sur la culture de facteurs abiotiques ayant une action prédominante sur la composition de la graine de tournesol, comme la disponibilité hydrique et la température; en rapport avec l'élaboration et l'accumulation des constituants majeurs de la graine (huile, protéines), et les composés de l'huile (acides gras et phytostérols). La difficulté de maîtriser la qualité des graines réside dans le fait que le génotype interagit avec ces facteurs de milieu. C'est pourquoi, il est essentiel d'évaluer l'effet de ces facteurs en interaction avec les génotypes sélectionnés pour des critères définis et de connaître les moyens de les contrôler à travers les techniques de culture afin d'obtenir une récolte de qualité.

Chapitre II - Matériels biologiques, méthodes analytiques et caractérisation des conditions culturales

1. Choix des génotypes

Le choix des génotypes retenus est basé sur des critères de qualité définis par des typologies de composition de la graine (Tableau 11). Les génotypes sélectionnés présentent des critères qualitatifs différant par:

- leur teneur en acides gras (particulièrement la teneur en acide oléique),
- leur teneur en constituants mineurs (phytostérols),
- leur capacité d'adaptation à de faibles ressources hydrique (génotypes principalement cultivés dans des zones arides du Maroc en semis de printemps). Ce dernier critère sera exploité dans l'étude de l'expression des gènes en réponse aux conditions agri-environnementales (chapitre V) afin de mettre en évidence des fonctionnements physiologiques différenciés selon l'aptitude des génotypes à mieux tolérer la sécheresse.



(Plusieurs génotypes au stade végétatif, J. Roche)

Tableau 11 : Caractéristiques des géotypes étudiés

Variétés	Catégorie du géotype	Critères qualitatifs exploités	Année d'inscription *	Origine ou semencier producteur
Proléic 204	Hybride oléique	Teneur en C18:1 élevée	1993	Rustica (Euralis Soltis)
Trisun 870	Hybride oléique	Teneur en C18:1 très élevée	1994	Mycogen Verneuil
Santiago II	Hybride standard	Teneur en C18:1 standard	1999	Novartis (Syngenta)
Aranda	Hybride standard	Teneur en C18:1 standard	1995	Novartis (Syngenta)
All Star	Hybride standard	Teneur en C18:1 standard	1998	Rustica
Salima	Population standard	Adaptation à de faibles ressources hydriques	1990	INRA Maroc
Karima	Population standard	Adaptation à de faibles ressources hydriques	1990	INRA Maroc
Ichraq	Population standard	Adaptation à de faibles ressources hydriques	1999	INRA Maroc
HA300b	Lignée	Teneur élevée en Méthylphytostérols	Non inscrit	USDA USA**
2603	Lignée	Teneur élevée en phytostérols totaux	Non inscrit	INRA France**

* au catalogue officiel, **fournit par le Laboratoire de Biotechnologie et Amélioration des Plantes

2. Conduites culturales et dispositifs expérimentaux

Deux types d'expérimentations complémentaires ont été menés, en serre et au champ.

Le choix de l'expérimentation en serre a été dicté par la nécessité de contrôler certains paramètres de milieu (température, rayonnement incident et apport d'eau) afin de préciser les effets spécifiques d'une conduite limitante en eau durant la phase post-florale sur différents potentiels génétiques.

Au champ, la variabilité des conditions agri-environnementales a été utilisée en jouant sur les facteurs culturaux: la date de semis, le positionnement et le volume des apports hydriques. Le décalage de la date de semis a généré des variations de température caractérisables et l'apport ou non d'irrigation a permis d'induire des niveaux de disponibilités hydriques contrastés. Le facteur année a été intégré à travers la caractérisation des séquences climatiques (niveaux de disponibilité hydrique, de température et de rayonnement global) au cours des différentes phases de la culture. La

disposition des essais dans le dispositif pluriannuel au champ 2002 est présenté pour l'exemple de l'année dans l'annexe 5.

Le Tableau 12 récapitule les différents traitements appliqués au cours des années expérimentales.

Tableau 12 : Récapitulatif des traitements appliqués en serre et en champ

Année calendaire	1999	2000	2002	2003	
Condition expérimentale	Champ	Champ	Serre	Champ	Champ
Date de semis	DS1 et DS2	DS1		DS1 et DS2	DS1 et DS2
	NIRR	NIRR et IRR		NIRR et IRR	NIRR et IRR
Régime hydrique			70% ETM 55% ETM (8j) 55% ETM (55j)		
	Santiago II	Santiago II	Santiago II	Santiago II	Santiago II
	Aranda	Aranda	Proléic 204	Proléic 204	Proléic 204
Génotypes	Trisun 870	Trisun 870		Karima Salima Trisun 870	HA300b 2603 Ichraq

ETM: évapotranspiration maximale. NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive.

2.1. Expérimentation en milieu contrôlé

L'approche expérimentale en conditions contrôlées vise à établir plus précisément l'effet d'une contrainte hydrique appliquée en post-floraison sur les cinétiques d'accumulation des principaux constituants de la graine ainsi que le déplacement de leurs équilibres en situation d'eau limitante.

2.1.1. Conditions de culture et mise en place des essais

L'expérimentation en milieu contrôlé a été menée sur le site de l'INRA Toulouse-Auzeville dans une serre automatisée permettant le contrôle de la température, de l'hygrométrie et du rayonnement. Un système de chauffage (tubes radiants alimentés en eau chaude et un ventilo-convecteur diffusant la chaleur) permet de contrôler la température, fixée à 18/28°C diurne/nocturne. L'éclairage est assuré par une série de lampe mobiles équipées d'ampoules à sodium (4000 watts) délivrant 30

0000 lux procurant le spectre nécessaire à la photosynthèse avec une photopériode de 16h de jour/8h de nuit. Un mécanisme de brumisation permet de maintenir l'hygrométrie à 80%.

Les plantes ont été cultivées dans des pots de 19.5L contenant 10 kg de terre argilo-limoneuse prélevée sur les parcelles expérimentales du dispositif « rotations-qualité » additionné de 1kg de terreau et de 1.5 kg de gravier permettant une meilleure aération des racines.

Le semis a été effectué à raison de 5 plantes par pot, démarié à 2 plantes par pot au stade 2 paires de feuilles. L'ensemble des traitements a été irrigué jusqu'à saturation de manière à permettre une levée optimale. Avec un équivalent de 40U/ha d'azote et un rapport C/N de 10 dosé dans la terre préalablement à la mise en culture, l'alimentation minérale a été complétée à partir du stade 3 paires de feuilles par une solution nutritive (annexe 6) à raison d'apports réguliers jusqu'au stade M0.

Des suivis d'enregistrements automatiques et continus de température et de rayonnement incident ont été effectués à l'aide de sondes reliées à une centrale d'acquisition CAMPBELL® de manière à contrôler régulièrement les conditions climatiques appliquées aux plantes.

2.1.2. Régime hydrique

L'expérimentation conduite en milieu contrôlé a permis d'évaluer l'impact de deux stress hydriques d'intensité et de durée différentes (Tableau 12):

- une alimentation hydrique conduite à 70 % de l'ETM, servant de référence,
- un stress hydrique sévère de courte durée: 55 % de l'ETM durant 10 jours pendant la floraison (2002 et 2003),
- un stress hydrique sévère plus long: 55% de l'ETM pendant toute la floraison (55 jours).

Les trois régimes hydriques ont été appliqués en fonction des stades phénologiques de la culture (Figure 20). De la levée jusqu'à l'apparition du bouton floral, les plantes ont été conduites en condition d'eau non limitante (100% ETM) afin d'assurer une levée optimale. Au stade 5 paires de feuilles (B5), l'alimentation hydrique a été restreinte à 70% ETM de manière à éviter le développement excessif de la partie végétative. La contrainte hydrique a été appliquée dès le début de la floraison (F1) jusqu'à la fin de la floraison (F3.2) (55% ETM pendant 8 jours, noté stress court) dans le cas du premier stress hydrique et jusqu'au début de la fin de remplissage des graines (M2) (55% ETM pendant 55 jours, noté stress long).

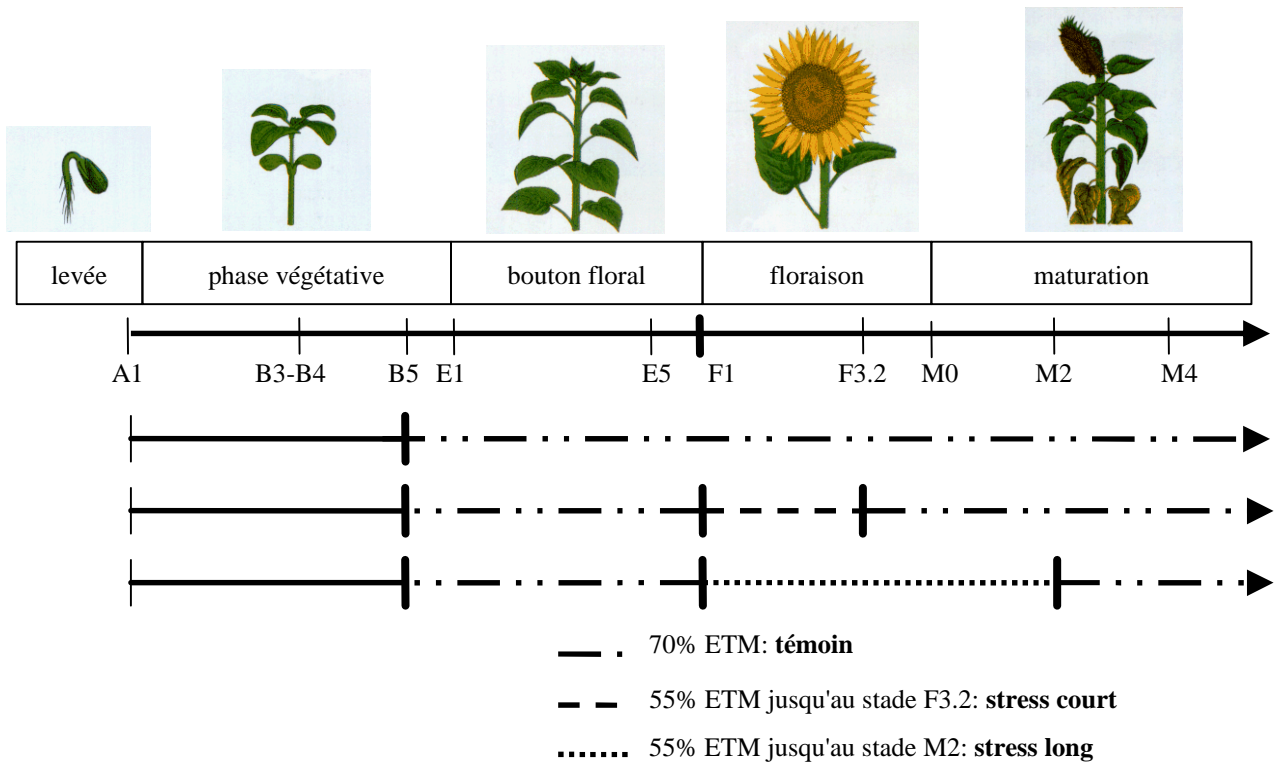


Figure 20 : Régimes hydriques appliqués en fonction des stades phénologiques en milieu contrôlé

La conduite d'irrigation a été réalisée par le biais d'un dispositif de pilotage automatique de l'irrigation constitué d'une canalisation hydrique de tuyaux en PVC rigide et de tête d'arrosage à plusieurs sorties. La gestion des régimes hydriques d'alimentation restreinte à 70 ou 55% des besoins a été calée sur les consommations de plantes conduites à la satisfaction des besoins en eau (100% ETM). La répartition des goutteurs a été réalisée de façon à respecter l'équidistance entre pots. Les tuyaux sont alimentés par une pompe auto-amorçable reliée à une cuve de 300L de contenance. L'amorçage de la pompe se fait via des ponts de contrôle et d'électrovannes commandés par une centrale d'acquisition CAMPBELL CRIO[®]. Le contrôle de l'irrigation a été effectué par l'intermédiaire de sondes capacitives (sondes TDR Time-Domain-Reflectometer) mesurant l'humidité du sol. Au-delà d'un seuil d'humidité volumique du sol défini selon les traitements hydriques désirés, la centrale d'acquisition permet de déclencher l'irrigation de façon automatique.

Afin d'atténuer d'éventuels effets d'hétérogénéité liés à la disposition dans l'espace (rayonnement, température...) ou des effets de bordure, les différentes combinaisons géotype*régime hydrique ont été réparties selon un dispositif en blocs aléatoires complets à trois répétitions.

2.2. Expérimentations en milieu naturel

2.2.1. Dispositif « rotations-qualité »

Les expérimentations réalisées en plein champ ont été conduites sur le dispositif « rotations-qualité » de l'INRA Toulouse-Auzeville. Ce dispositif pluriannuel de rotation a été mis en place en 1995 suite à la réorganisation d'un dispositif longue durée d'optimisation des intrants et des systèmes de culture créés en 1981. Il est axé sur l'étude de l'impact de la conduite de culture sur la qualité des récoltes. Des contraintes *a priori* ont été imposées telles la réduction des intrants et une contrainte hydrique modérée. Une autre caractéristique de ce dispositif réside dans la succession culturale d'oléagineux et de protéagineux associée à une diversification des géotypes étudiés. Les principales rotations sont les suivantes:

- rotations classiques: céréalières (maïs/blé) ou céréales/oléagineux (soja/blé, soja/maïs ou tournesol/blé/soja)
- rotations oléagineuses: lin/tournesol/soja,
- rotations protéagineuses: soja/haricot.

Les parcelles ont été implantées sur un sol de type argilo-limoneux profond dont le pH avoisine la neutralité (6.8).

2.2.2. Conditions de culture

Malgré l'amélioration génétique des variétés résistantes opérée depuis de nombreuses années par les sélectionneurs, le tournesol demeure une culture relativement sensible aux maladies.

Pour éviter l'interaction entre les effets éventuels des maladies et ceux des facteurs étudiés sur la composition de la graine, les variétés commercialisées ont reçu un traitement phytosanitaire en complément du traitement dispensé par les semenciers.

Trois types de traitements ont été apportés au semis:

- contre les limaces (Metarex, 5 à 7 kg/ha),
- contre le phomopsis, (Punch, 0.8 L/ha),
- contre le phoma et le mildiou (Dihane, 2 kg/ha).

Par précaution, les semences des cultivars marocains ont été enrobées par deux fongicides:

- contre le *Botrytis*, l'*Anthracnose*, la pourriture grise, la fonte du semis et le mildiou (Wakil XL, 0.4 kg/q),
- contre le mildiou (Vamin LM, 2 L/q).

Pour éviter la compétition avec des plantes parasites, deux types de désherbages (Duclor, 2.2L/ha et Ronstar, 2.2L/ha) ont été appliqués en pré-semis et pré-levée, stades correspondant aux périodes les plus propices à l'élimination des dicotylédones. La culture de tournesol étant également très sensible à la carence en bore, du Bortrax (2.5L/ha) a été apporté à la culture au stade 5 paires de feuilles.

Le semis a été réalisé à 3-4 cm de profondeur au semoir pneumatique à raison de 71 000 pieds par hectare.

Une fertilisation azotée de 70 U (urée, 46%) a été apportée au semis pour chaque année expérimentale en se basant sur le calcul de restitution de l'azote.

La surface des parcelles élémentaires utilisées a varié de 126m² (14m x 9m) à 180m² (6m x 30m) selon les années culturales, à l'exception des essais portant sur les lignées (HA300b, 2603) pour lesquels la quantité limitée de semences disponibles nous a contraint à réduire les parcelles élémentaires à 35m² (6m x 5m). Les parcelles expérimentales ont été choisies sur des critères d'homogénéité du sol (profondeur, structure et texture stockées dans une base de données INRA). Les différents traitements ont été répartis selon un dispositif en split-plot.

Les graines ont été récoltées à maturité (teneur en eau de la graine de 9%) par moissonneuse-batteuse, à raison de trois passages machine correspondant à 42 m² (soit environ 300 plantes par répétitions) en 2002 et 60m² en 2003 (soit environ 430 plantes par répétitions). Chaque répétition a été triée afin d'éliminer les impuretés, puis pesée. Une partie aliquote de 800g de chaque répétition a été prélevée puis séchée à l'étuve à 80°C pendant 48 heures de façon à obtenir 0% d'humidité nécessaire aux dosages des composés biochimiques et à la détermination de la teneur en eau des graines et du poids de mille graines (PMG) à l'aide d'un compteur à grains (Chopin-Numigral, France). En 2003, une récolte manuelle de 20 capitules par génotype a également été réalisée pour les lignées.

2.2.3. Traitement date de semis

L'impact de la date de semis a été étudié de manière à mettre en évidence l'effet de différentes gammes de températures sur l'accumulation biochimique des constituants de la graine. La date de semis classique (mi-Avril), préconisée par les instituts technique pour l'optimisation du rendement, a été comparée à une date de semis plus tardive décalée d'un mois (mi-Mai). L'année 2000 n'a fait l'objet que de l'étude des disponibilités hydriques.

2.2.4. Traitement hydrique en phase post-florale

Deux traitements hydriques ont été appliqués au cours du développement de l'appareil reproducteur: un traitement correspondant à des apports d'irrigation permettant de satisfaire 70% des besoins en eau, et un traitement soumis aux seules conditions pluviales (sans apport d'irrigation complémentaire) générant des déficits hydriques caractérisables par le calcul du bilan hydrique de la culture. L'effet de la disponibilité hydrique n'a pas été étudié en 1999.

La conduite des régimes hydriques a été réalisée par apports fractionnés avec des sprinklers automatiques après avoir établi le bilan hydrique selon la formule: $ETP = k \times ETM$, permettant de connaître les besoins hydriques de la plante tout au long du développement. L'ETP (EvapoTranspiration Potentielle) correspond à l'évaporation d'eau liée aux conditions climatiques; l'ETM (EvapoTranspiration Maximale) correspond à la quantité d'eau permettant un fonctionnement optimal du couvert; et k représente les coefficients culturaux qui varient selon les stades de développement et selon l'espèce cultivée, et traduisent la variabilité des besoins en eau en fonction de l'évolution de la surface évaporante du couvert (Picq, 1989).

2.2.5. Caractérisation des séquences climatiques

L'ensemble des conditions agri-environnementales étudiées a généré différentes séquences climatiques qui correspondent à la variation des principaux facteurs du climat (températures, précipitations, rayonnement global incident) pendant les différentes phases du développement.

La caractérisation des séquences climatiques présente l'intérêt d'associer les variations de ces facteurs avec celles de la composition biochimique de la graine par phase de développement.

Les données climatiques journalières ont été collectées sur le site d'Auzeville par la station météorologique automatisée CIMEL de l'INRA Toulouse-Auzeville, composée d'une sonde thermique (mesure des températures moyenne, maximale et minimale), d'un pluviomètre (volume des précipitations) et d'un pyranomètre (mesure du rayonnement global incident). L'ETP a été calculé à partir de la formule de Penman (1948). L'évolution des différents paramètres climatiques (températures, précipitations, ETP et rayonnement global) pour les 4 années expérimentales (1999, 2000, 2002 et 2003), et pour un profil annuel calculé sur 25 et 10 ans sont représentés annexe 7.

2.2.5.1. Climat

Dans la comparaison avec les relevés climatiques (températures, pluie, ETP et rayonnement global incident) calculés sur les moyennes de 1970 à 1995 (année moyenne) ou 1995 à 2005 (pour le rayonnement global incident), les séquences climatiques des années durant lesquelles nous avons expérimenté se distinguent par les points suivants (annexe 7) :

- 2002 est une année représentative de l'année moyenne en terme de pluie, température, ETP et rayonnement global incident.
- 1999 et 2000, sont également proches de l'année moyenne avec cependant des différences d'un point de vue précipitations: 1999 présente un léger déficit pluviométrique en Juin, au moment du développement floral du tournesol alors que l'année 2000 est caractérisée par des pluies abondantes en Juin.
- 2003 est une année particulièrement sèche, le déficit pluviométrique par rapport à l'année moyenne débute dès Mars et se poursuit jusqu'en Septembre avec une demande évaporative (ETP) largement plus levée (+10mm par mois) sur l'ensemble du développement de la culture que celle de l'année moyenne. Les températures moyennes sont également supérieures de 5°C à la moyenne pluriannuelle.

2.2.5.2. Bilan hydrique

Dans cette étude pluriannuelle, les différentes séquences climatiques et la gestion de l'irrigation ont engendrées des bilans hydriques très contrastés selon les années et les phases de développement (Tableau 13). Les bilans hydriques de chaque année culturale permettent de calculer le statut hydrique du sol qui se traduit par des déficits hydriques subit par la plante pour chaque période de son développement par rapport à la conduite irriguée à 70% de l'ETM.

Tableau 13 : Bilan hydrique (mm) par rapport à 70% de l'ETM établi au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année

Année culturale		1999		2000	
Date de semis		DS1	DS2	DS1	DS1
Traitement hydrique		NIRR	NIRR	NIRR	IRR
Phases physiologiques	A2-F1	-101	-205	-66	-66
	F1-M0	-71	-46	<u>-2</u>	<u>-2</u>
	M0-M2	-59	<u>-17</u>	-67	-27
	M2-M4	-31	-48	-59	-59

Année culturale		2002				2003			
Date de semis		DS1	DS1	DS2	DS2	DS1	DS1	DS2	DS2
Traitement hydrique		NIRR	IRR	NIRR	IRR	NIRR	IRR	NIRR	IRR
Phases physiologiques	A2-F1	-38	-38	-96	-96	-95	-92	-148	-148
	F1-M0	-52	-12	-52	-22	-69	-33	<u>-90</u>	-18
	M0-M2	-56	-56	-19	-19	<u>-88</u>	-81	-69	-68
	M2-M4	-14	-14	-11	-11	-102	-87	-36	-31

DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive; NIRR: traitement non irrigué, IRR: traitement irrigué. En gras: valeurs des phases critiques de l'accumulation des composés de la graine; en souligné: les maxima et minima pour les phases F1-M0 et M0-M2 quelle que soit l'année.

L'évaluation des bilans hydriques instantanés par le logiciel BilH permettant de gérer l'irrigation des grandes cultures a permis de confirmer les déficits hydriques obtenus (Nolot et Debaeke, 2001). L'annexe 8 représente un exemple de bilans hydriques obtenus pour les séquences climatiques des années 2002 et 2003 pour nos différentes situations expérimentales.

Les cultures ont été irriguées entre les stades F1 et M0, correspondant aux phases critiques d'accumulation des constituants de la graine. Les déficits hydriques les plus marqués entre ces deux stades concernent l'année 2003, pour laquelle un maximum de 72 mm d'écart a été enregistré entre les traitements hydriques. L'année 2000 présente des apports plus tardifs, entre les stades M0 et M2, qui se caractérise par un déficit hydrique moins marqué dans le cas de la conduite irriguée durant cette période. La plus grande amplitude de variation, autour de 40mm, durant la phase de maturation des graines (M0-M2) concerne les séquences climatiques des années 1999 et 2000. Contrairement à l'année 2000, l'année 1999 n'a été conduite que selon un régime hydrique non

irrigué, ce qui explique les plus forts déficits hydriques enregistrés entre F1 et M0 pour les deux semis. Globalement, l'année 2002 indique une situation intermédiaire entre les années 1999/2000 et 2003, avec des écarts de déficits hydriques de 40mm entre le régime irrigué et le régime non irrigué localisés entre F1 et M0; et des déficits hydriques relativement plus faibles entre M0 et M2 par rapport aux deux premières années.

2.2.5.3. Gamme de températures moyennes

L'expérimentation pluriannuelle et le décalage de la date de semis ont permis de tester des séquences thermiques distinctes durant le développement des graines et d'analyser l'impact de la température sur la composition de la graine (Tableau 14).

Tableau 14 : Température moyenne (°C) au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année

Année culturale		1999		2000	2002		2003	
Date de semis		DS1	DS2	DS1	DS1	DS2	DS1	DS2
Phases physiologiques	A2-F1	17.0	19.7	17.9	16.8	20.2	18.8	23.3
	F1-M0	22.6	22.7	<u>19.9</u>	20.3	20.5	22.8	<u>24.2</u>
	M0-M2	22.2	22.2	21.0	20.2	<u>19.1</u>	25.3	<u>27.3</u>
	M2-M4	22.4	22.3	22.2	19.0	17.7	25.9	21.6

DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive; NIRR: traitement non irrigué, IRR: traitement irrigué. En gras: valeurs des phases critiques de l'accumulation des composés de la graine; en souligné: maxima et minima pour les phases F1-M0 et M0-M2 quelle que soit l'année.

Globalement, l'année 2003 apparaît beaucoup plus chaude que les trois autres et se caractérise par une élévation de température sur l'ensemble du cycle, depuis la levée jusqu'à la fin de la maturation des graines (M2) (environ 2.5, 3.5 et 4.5°C par rapport à 2002, 2000 et 1999 respectivement). Les écarts les plus importants entre année concerne principalement les phases de formation et de dessiccation de la graine (F1-M0 et M0-M2), pour lesquelles on note respectivement des variations allant de 19.9°C (année 2000) jusqu'à 24.2°C (année 2003) et 19.1°C (année 2002) jusqu'à 27.3°C (année 2003).

Le décalage de la date de semis a également induit des variations de températures au sein de chaque année culturale. L'année 1999 se caractérise par des températures relativement constantes entre date de semis pendant tout le cycle de croissance. Inversement, en 2003, le semis tardif enregistre une augmentation de températures moyennes durant la phase végétative (Levée-F1) et la phase reproductive (F1-M0 et M0-M2); 4.8°C et 1.4 et 2 °C respectivement; alors que seule la phase de

dessiccation (M0-M2) enregistre une diminution (4.3°C) dans le cas du semis tardif. Enfin, l'année 2002 présente une situation intermédiaire caractérisée par une relative stabilité des températures moyennes pendant la floraison (F1-M0) (autour de 20°C) et une diminution de 1.1°C pendant la phase de maturation (M0-M2) entre la date de semis classique et la date de semis tardive.

2.2.5.4. Somme des températures

Calculée par phases du développement physiologique, la somme des températures constitue une variable agronomique correspondant à une échelle de temps physiologique du développement de la biomasse végétative. Son calcul est défini par l'équation suivante:

$$\text{Somme des températures} = \sum((T_{\text{max}} + T_{\text{min}})/2) - T_{\text{base}} \text{ (}^\circ\text{Cjours)}$$

T_{max} : température maximale
 T_{min} : température minimale
 T_{base} : température de base

La température de base a été fixée à 6°C (Merrien, 1992) correspondant au zéro de végétation.

Globalement, le Tableau 15 montre que le retard de semis a entraîné un raccourcissement du cycle de développement quelle que soit l'année. Cette diminution concerne les phases de maturation de la graine (M0-M2 et M2-M4). A l'inverse, la phase comprise entre les stades F1 et M0 révèle une somme de températures plus élevée (+35°Cjours).

Tableau 15 : Somme des températures (°C jours) au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année

Année culturale		1999		2000	2002		2003	
Date de semis		DS1	DS2	DS1	DS1	DS2	DS1	DS2
Phases physiologiques	A2-F1	772.4	800.1	870.6	845.9	791.3	872.3	895.1
	F1-M0	249.1	280.2	207.1	242.7	291.0	258.0	278.7
	M0-M2	321.5	184.9	322.3	406.6	301.9	292.9	324.9
	M2-M4	581.3	463.6	451.5	280.6	152.2	654.8	469.1
	Cumul	1874.2	1729.3	1751.5	1775.8	1536.3	2077.9	1967.8

DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive; NIRR: traitement non irrigué, IRR: traitement irrigué. En gras: somme des températures cumulée sur tout le cycle pour chaque année culturale.

2.2.5.5. Rayonnement global incident

Le rayonnement global incident perçu par le couvert présente souvent une corrélation avec l'énergie interceptée par le couvert et, par conséquent, avec l'activité photosynthétique des feuilles. Le Tableau 16 indique que les quantités totales de rayonnement global incident perçu par le couvert végétal varient au cours des années et des différentes phases du développement.

Tableau 16 : Somme (a) et moyenne (b) du rayonnement incident global (MJ.m^2 ou $\text{MW.s}^{-1}.\text{m}^2$) au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année

a)

Année culturale		1999		2000	2002		2003	
Date de semis		DS1	DS2	DS1	DS1	DS2	DS1	DS2
Phases physiologiques	A2-F1	772.4	800.1	870.6	1520.9	1219.9	1457.7	1385.4
	F1-M0	244.1	280.7	207.1	328.5	399.4	420.9	387.7
	M0-M2	271.5	184.9	322.3	543.8	350.3	474.0	385.9
	M2-M4	581.3	463.6	451.5	343.6	212.0	716.3	514.0
	Cumul	1869.2	<u>1729.3</u>	1851.5	2736.7	2181.6	<u>3068.9</u>	2673.1

b)

Année culturale		1999		2000	2002		2003	
Date de semis		DS1	DS2	DS1	DS1	DS2	DS1	DS2
Phases physiologiques	A2-F1	20.8	24.4	21.8	22.0	22.2	20.2	26.0
	F1-M0	25.3	22.4	23.1	19.6	19.7	26.4	25.1
	M0-M2	23.1	21.7	22.5	19.0	15.2	25.5	23.6
	M2-M4	20.9	19.7	19.5	16.3	16.9	22.9	18.3
	Moyenne	22.5	22.0	21.7	19.2	<u>18.5</u>	<u>23.8</u>	23.2

DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive; NIRR: traitement non irrigué, IRR: traitement irrigué. En gras: somme et à la moyenne du rayonnement cumulé sur tout le cycle pour chaque année culturale; en souligné: maxima et minima quelle que soit l'année.

Globalement, l'interception maximum concerne les années 2002 et 2003, en raison d'un rayonnement plus intense pendant la phase végétative (levée-F1) et, dans le cas de l'année 2003, pendant la phase de fin de maturation des graines (M2-M4). D'autre part, le décalage de la date de semis induit une baisse de la quantité de lumière perçue sur l'ensemble du cycle (-140, -555 et -426 MJ.m^{-2} pour les années 1999, 2002 et 2003 respectivement), mais également par phases. Les valeurs de rayonnement global incident exprimées en moyenne (Tableau 16 b) confirment que l'année 2003

présente les plus forts niveaux de rayonnement (23.5 en moyenne). En revanche, l'année 2002 présente des rayonnements incidents plus faible en moyenne quelle que soit la date de semis. Cette expression indique également que le retard de semis induit une légère diminution de taux moyen de rayonnement intercepté par le couvert. Toutefois, les écarts de rayonnement entre année s'avèrent moins marqués exprimés en moyenne qu'exprimés en somme.

2.2.6. Caractérisation du statut hydrique

Le statut hydrique des plantes a été déterminé à deux niveaux. L'humidité volumique permet de définir la contrainte hydrique appliquée au niveau du sol, Le potentiel hydrique foliaire conduit à estimer le niveau de stress hydrique à travers la physiologie de la plante. L'humidité volumique n'a été mesurée qu'en conditions contrôlées.

2.2.6.1. Humidité volumique du sol

Le dispositif de pilotage automatique d'irrigation a permis de suivre instantanément l'évolution de l'humidité volumique du sol grâce aux mesures fréquentes (10 sec d'intervalle) de tension du sol via les sondes capacitives reliées à la centrale d'acquisition. Ces sondes ont été étalonnées sur un échantillon du sol utilisé pour les expérimentations, selon le protocole établi par CAMPBELL®. Cet étalonnage permet d'établir une relation linéaire entre la tension de l'eau dans le sol (U) et l'humidité volumique du sol (Hv) selon l'équation suivante:

$$Hv \text{ (m}^3\text{/m}^3\text{)} = 0.541 \times U \text{ (mV)} - 0.03$$

La capacité au champ de ce sol a été mesuré pour une tension de 909mV, soit 0.461 m³/m³. La Figure 21 illustre l'évolution de l'humidité volumique selon les régimes hydriques.

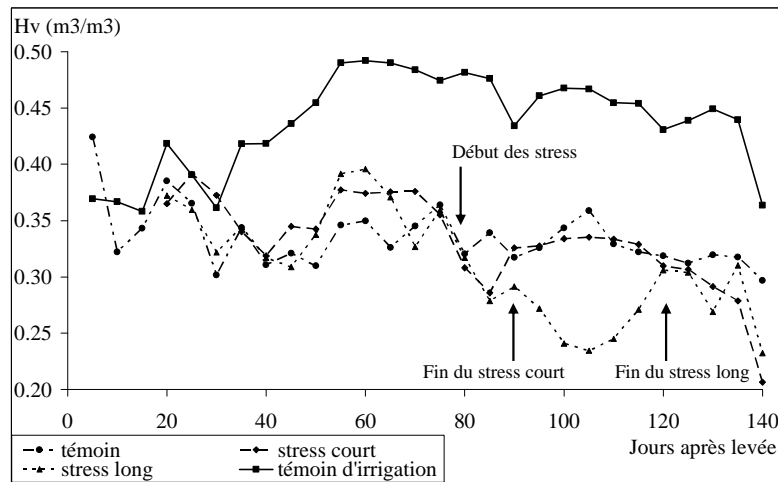


Figure 21 : Humidité volumique du sol (Hv) mesurés en condition contrôlée au cours du cycle de développement pour différents niveaux d'alimentation hydrique

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM; stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM entre F1 et F3.2 (10 jours); stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM entre F1 et M2 (55 jours); témoin d'irrigation: régime hydrique conduit à 100% ETM.

Ce suivi permet de contrôler le niveau des contraintes hydriques appliquées ainsi que les périodes concernées. Les traitements hydriques à 55 % de l'ETM ont été appliqués 76 jours après le semis, le stress hydrique court a pris fin 84 jours après semis tandis que le stress long, 177 jours après semis. Cette caractérisation au niveau du sol confirme la durée et l'intensité des stress appliqués par rapport au témoin conduit à 70% de l'ETM.

2.2.6.2. Potentiel hydrique foliaire

Afin d'apprécier plus finement l'effet des stress hydriques subit par les plantes, des mesures de potentiels hydriques foliaires ont été effectuées. D'un point de vue physico-chimique, cette mesure correspond à la différence entre le potentiel chimique de l'eau du système considéré et celui de l'eau pure dont la valeur a été fixée arbitrairement à zéro. Plus les valeurs sont négatives, plus l'état de liaison des molécules d'eau dans le système est élevé. Le potentiel hydrique de la plante dépend de celui du sol et de la transpiration. La transpiration étant réduite pendant la nuit, le potentiel hydrique de la plante mesuré en fin de nuit (Ψ_{base}) se trouve en équilibre avec celui du sol. La mesure du Ψ_{base} permet l'estimation de la contrainte soumise par le sol indépendamment des conditions climatiques. Cependant, le potentiel hydrique des feuilles peut également être déterminé en milieu de journée ($\Psi_{\text{mi-journée}}$), au maximum d'activité photosynthétique. Dans ce cas, les conditions climatiques modifient l'état hydrique du système et la valeur du potentiel reflète alors, en complément de la caractérisation du niveau de la contrainte, les différentes stratégies que chaque génotype est susceptible de développer en réponse au manque d'eau.

Les mesures du potentiel hydrique foliaire ont été effectuées à l'aide d'une chambre à pression (Scholander *et al.*, 1965) sur une des feuilles matures les plus jeunes comme décrit par Turner, 1981.

En serre, le Ψ_{base} a été déterminé à heure constante avant l'aube tout au long du cycle, pour chaque régime hydrique, à chaque changement d'alimentation hydrique caractéristique des traitements, et pour chaque génotype (Figure 22). Les niveaux de Ψ_{base} mesurés traduisent l'augmentation de l'intensité du stress hydrique subi par les plantes (Zhu *et al.*, 2004).

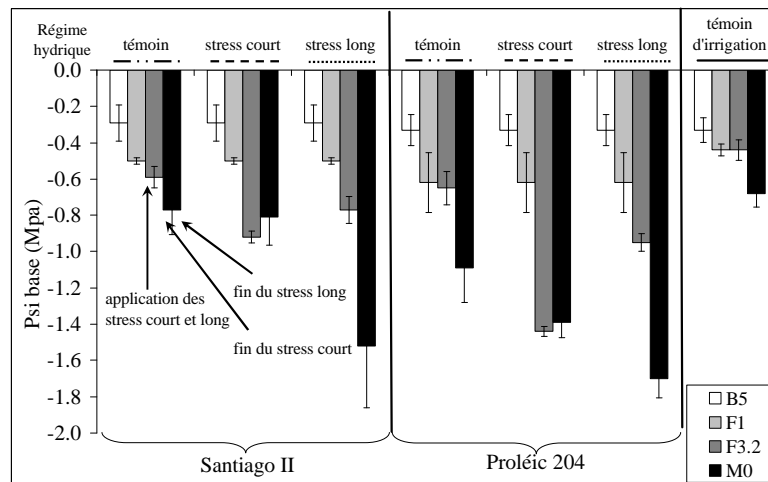


Figure 22 : Potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{base} en MPa) mesurés en milieu contrôlé à différents stades du cycle de développement en fonction des différents niveaux d'alimentation hydrique pour les deux génotypes Santiago II et Proléc 204

B5: 5 paires de feuilles, F1: début floraison, F3.2: fin floraison, M0: début de maturation des graines. Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM entre F1 et F3.2 (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM entre F1 et M2 (55 jours); témoin d'irrigation: régime hydrique conduit à 100% ETM.

Durant les premières phases de développement (A2-B5) pour lesquelles l'alimentation hydrique est non limitante (100% de l'ETM et non stressé à 70% de l'ETM), le Ψ_{base} se maintient autour de -0.5MPa et n'est pas différent du potentiel hydrique correspondant au témoin d'irrigation (100% de l'ETM), excepté pour Proléc 204 dont la moyenne est légèrement plus faible et avoisine -0.6MPa. Pendant la phase F1-F3.2, une baisse de potentiel hydrique est enregistrée de 35% et de 55% dans le cas du stress hydrique court, et 23 et 34 % dans le cas du stress hydrique long, pour Santiago II et Proléc 204 respectivement. En fin de stress hydrique court (F3.2-M0), on observe une augmentation de Ψ_{base} des plantes soumises au stress de courte durée qui ne retrouve néanmoins pas le niveau de celui des plantes non stressées. A l'inverse, le potentiel hydrique foliaire des plantes ayant subi le stress long continue de chuter pour atteindre des valeurs comprises entre -1.5 et -1.7MPa. En qualité d'indicateur de l'état de stress des plantes (Mullet et Whitsitt, 1996), ses valeurs hautement négatives attestent de la forte intensité des stress appliqués. D'autre part, les valeurs du

potentiel hydrique foliaire du génotype oléique (Proléic 204) se situent à un niveau plus élevé que celui du génotype standard (Santiago II) quel que soit le régime hydrique appliqué.

En conditions contrôlées, les valeurs de $\Psi_{\text{mi-journée}}$ mesurés présentent une évolution similaire que celle du Ψ_{base} et se caractérisent par la relation suivante:

$$\Psi_{\text{base}} = (40 \text{ à } 50\% * \Psi_{\text{mi-journée}}) / 100$$

En conditions naturelles, la mesure des $\Psi_{\text{mi-journée}}$ a été effectuée afin de confirmer les niveaux de déficits hydriques obtenus dans les différentes séquences climatiques. Le Tableau 17, représente les potentiels hydriques mesurés dans les années 2002 et 2003 pour les différents génotypes étudiés.

Tableau 17 : Potentiel hydrique foliaire à la mi-journée ($\Psi_{\text{mi-journée}}$ en MPa) mesuré au champ en 2002 (a) et 2003 (b) à deux stades du développement (F1 et M0) en fonction du régime hydrique et de la date de semis pour les génotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations marocaines (Karima et Salima en 2002; et Ichraq en 2003)

a)	Génotypes	Date de semis	Régimes hydriques	Stades phénologiques	
				F1	M0
Santiago II	DS1		NIRR	-0.55±0.04	-0.84±0.07
			IRR	-0.55±0.04	-0.52±0.07
	DS2		NIRR	-0.40±0.03	-0.92±0.06
			IRR	-0.35±0.04	-0.62±0.05
Proléic 204	DS1		NIRR	-0.54±0.03	-0.88±0.08
			IRR	-0.54±0.06	-0.64±0.08
	DS2		NIRR	-0.56±0.04	-0.96±0.00
			IRR	-0.60±0.04	-0.76±0.04
Karima/Salima	DS1		NIRR	-0.55±0.17	-0.88±0.12
			IRR	-0.54±0.14	-0.53±0.15
	DS2		NIRR	-0.60±0.09	-0.96±0.08
			IRR	-0.45±0.10	-0.67±0.09

b)			Stades phénologiques	
Génotypes	Date de semis	Régimes hydriques	F1	M0
Santiago II	DS1	NIRR	-1.47±0.17	-2.38±0.07
		IRR	-1.47±0.17	-1.74±0.07
	DS2	NIRR	-1.40±0.12	-2.59±0.03
		IRR	-1.40±0.09	-2.05±0.10
Proléic 204	DS1	NIRR	-1.73±0.05	-2.66±0.04
		IRR	-1.73±0.05	-1.66±0.20
	DS2	NIRR	-1.40±0.10	-2.90±0.06
		IRR	-1.23±0.10	-1.96±0.02
Ichraq	DS1	NIRR	-1.71±0.22	-2.74±0.07
		IRR	-1.71±0.22	-1.68±0.06
	DS2	NIRR	-1.23±0.09	-2.99±0.10
		IRR	-1.40±0.08	-2.13±0.10

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. En gras: valeurs < à -2MPa. F1: début floraison, M0: début de maturation des graines.

Globalement, pour tous les génotypes, l'année 2003 a conduit à des stress hydriques beaucoup plus intenses aux stades F1 (- 1.5 MPa pour les deux régimes hydriques) et M0 (-1.8 et -2.7MPa pour les régimes irriguée et non irriguée respectivement) par rapport à l'année 2002 pour laquelle les potentiels hydriques foliaires sont globalement constants entre régime hydrique pour les deux stades (-0.5 à -0.9MPa à F1 et M0 respectivement). Ainsi, les potentiels hydriques foliaires de 2003 sont significativement plus marqués entre conditions irriguée et non irriguée (environ -1MPa de différence contre -0.3MPa en moyenne par rapport à 2002), traduisant une plus forte intensité des stress hydriques entre F1 et M0. Comme en milieu contrôlé, les génotypes se différencient par leur niveau de potentiel hydrique foliaire (-2.5, -2.8 et 2.9MPa en non irriguée pour Santiago II, Proléic 204 et Ichraq respectivement), qui reflète différentes stratégies d'adaptation aux stress.

2.2.6.3. Teneur en eau relative des feuilles

La teneur en eau relative des feuilles, mesurée en serre, constitue également un critère de détermination du niveau de stress hydrique. Elle est calculée selon la formule suivante (Turner, 1981):

$$\frac{(PF-PS)}{(Pturg-PS)} \times 100$$

PF: poids frais de la feuille

Pturg: poids de turgescence de la feuille après réhydratation durant 4 heures, à 4°C et à l'obscurité

PS: poids sec de la feuille après étuve 48h à 80°C

En fonction de la durée des stress hydriques appliqués, l'évolution de la teneur en eau des plantes illustre le rythme de dessiccation des plantes (Figure 23).

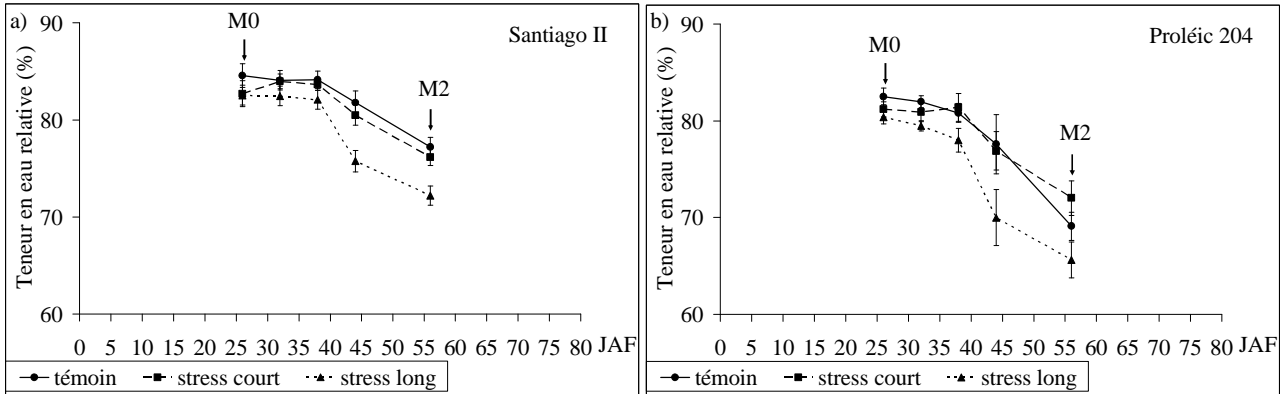


Figure 23 : Teneur en eau relative des plantes en fonction des jours après floraison (JAF) pour a) un géotype standard (Santiago II) et b) un géotype oléique (Proléic 204)

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours). Les lignes pointillées schématisent les périodes d'application des stress courts et long.

La teneur en eau des plantes est affectée négativement dans le cas du stress long, alors que le stress de courte durée (stress court) n'a que peu d'influence et la teneur en eau est voisine de celle du témoin conduit à 70% de l'ETM. Il apparaît une différence de comportement génotypique vis-à-vis de la contrainte hydrique concernant la biomasse végétative qui se dessèche plus rapidement chez Proléic 204 que chez le géotype standard (65% et 72% respectivement à M2 dans le cas du stress court).

2.2.6.4. Estimation du niveau de stress hydrique

Par la caractérisation du stress hydrique au niveau du sol (déficits hydriques) entre la floraison (F1) et la fin de maturation des graines (M2), il est possible d'établir différents niveaux de stress hydriques selon l'irrigation et la demande évaporative de l'année climatique (Tableau 18).

Tableau 18 : Estimation du niveau de stress hydrique entre le début floraison (F1) et la fin de maturation des graines (M2) selon l'année

Année expérimentale	Itinéraires techniques	DH		Cumul	NSH
		F1-M0	M0-M2		
1999	DS1 NIRR	-71	-59	-130	4
	DS2 NIRR	-46	-17	-63	2
2000	DS1 NIRR	-2	-67	-69	2
	DS1 IRR	-2	-27	-29	1
2002	DS1 NIRR	-52	-56	-108	4
	DS1 IRR	-12	-56	-68	2
	DS2 NIRR	-52	-19	-71	2
	DS2 IRR	-22	-19	-41	1
2003	DS1 NIRR	-69	-88	-157	5
	DS1 IRR	-33	-81	-114	4
	DS2 NIRR	-90	-69	-159	5
	DS2 IRR	-18	-68	-86	3

Les niveaux de stress hydrique (NSH) ont été établis par rapport aux cumuls des déficits hydriques entre les stades début floraison (F1) et fin de maturation des graines (M2). DH: déficit hydrique (mm).

NSH 1: $0 > DH > -40\text{mm}$, **NSH 2:** $-40\text{mm} > DH > -70\text{mm}$, **NSH 3:** $-70\text{mm} > DH > -100\text{mm}$, **NSH 4:** $-100\text{mm} > DH > -130\text{mm}$, **NSH 5:** $DH < -130\text{mm}$
 DS1 NIRR: date de semis classique, régime hydrique non irrigué; DS1 IRR: date de semis classique, régime hydrique irrigué, DS2 NIRR: date de semis tardive, régime hydrique non irrigué, DS2 IRR: date de semis tardive, régime hydrique irrigué

2.2.7. Contrôle du développement de la culture

La composition de la graine résulte du transfert de composés accumulés dans les feuilles et les tiges vers les organes reproducteurs grâce aux processus actifs pendant toute la vie de la plante. Ainsi, de la biomasse produite dépend l'accumulation des composés d'intérêt dans la graine. Plusieurs paramètres relatifs à l'évolution de la surface du couvert, de la biomasse totale, du poids et de la teneur en eau des graines, ont été utilisés pour caractériser le développement de la culture et fournir des éléments de comparaison entre années culturales. Ils peuvent également caractériser les différences de comportement physiologique des génotypes étudiés ainsi que leur productivité afin de dégager des relations quantité/qualité et d'identifier d'éventuels indicateurs physiologiques de qualité de la graine.

La surface foliaire photosynthétiquement par plante (SF) a été calculée selon la méthode d'estimation biométrique établie par Pouzet et Bougeat (1985), selon la formule suivante:

$$SF \text{ (dm}^2 \cdot \text{plante}^{-1}) = [(n_i/2) \times (S_1 + S_2)] + [(n_s/2) \times (S_1 + S_3)]$$

S_1 : surface de la plus grande feuille (longueur x largeur x 0.7)

n_i : nombre de feuilles vertes en dessous de la plus grande

S_2 : surface de la feuille verte la plus basse (longueur x largeur x 0.7)

n_s : nombre de feuilles vertes au dessus de la plus grande,

S_3 : surface de la plus petite feuille verte (longueur x largeur x 0.7)

y compris celle-ci

2.2.7.1. Exemple de l'évolution de la surface foliaire en fonction de la disponibilité hydrique

Les stress hydriques post-floraison appliqués en conditions contrôlées présentent un effet significatif sur l'évolution de la surface foliaire photosynthétiquement active, et atteste d'une sénescence plus rapide lorsque le stress s'étend du début de la floraison au début de maturation des graines (stress long) quel que soit le génotype (Figure 24 a et b). La réduction de la surface foliaire verte est plus marquée dans le cas du génotype Proléic 204 que pour le génotype standard Santiago II.

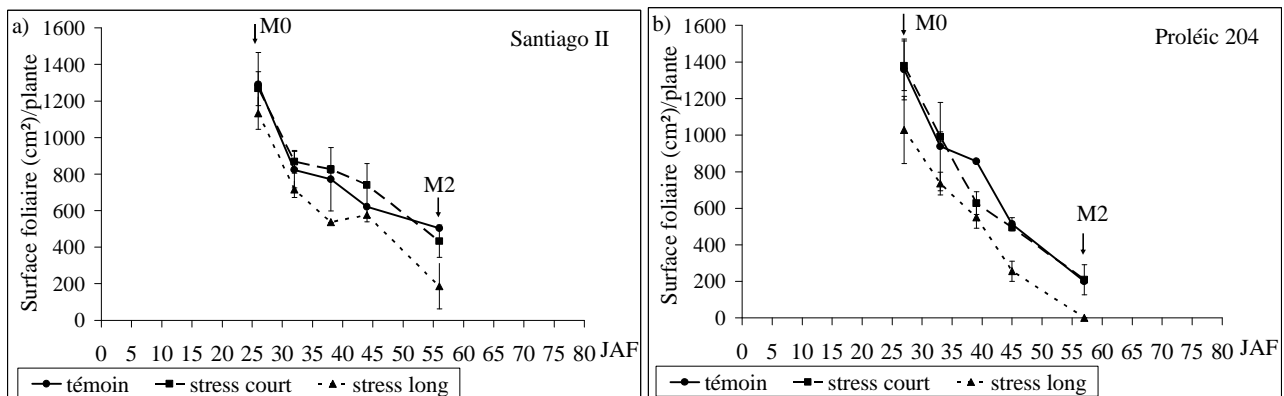


Figure 24 : Surface foliaire (cm²/plante) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les génotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b)

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours).

Au cours de la campagne 2003, l'évolution de la surface foliaire présente une accélération similaire de la sénescence foliaire en condition de stress hydrique (Tableau 19). Il apparaît également une différence entre génotypes mais contrairement aux conditions contrôlées, Proléic 204 présente la surface foliaire la plus développée au même stade (M2). Il en est de même pour les conditions naturelles en 2002, bien que dans ce cas, il n'existe pas de différence significative entre régime hydrique.

Tableau 19 : Surface foliaire (cm²/plante) des géotypes Santiago II et Proléc 204 lors de la campagne 2003 (a) et de la campagne 2002 (b) en fonction de la date de semis et du régime hydrique

a)			Stades phénologiques	
Géotype	Date de semis	Régime hydrique	M0	M2
Santiago II	DS1	NIRR	4541 a	1066 b
		IRR	3806 a	1578 a
	DS2	NIRR	2390 b	1002 b
		IRR	2640 b	1251 a
Proléc 204	DS1	NIRR	5689 a	3425 b
		IRR	5329 a	4779 a
	DS2	NIRR	4846 b	3419 b
		IRR	6583 a	5620 a

b)			Stades phénologiques	
Géotype	Date de semis	Régime hydrique	M0	M2
Santiago II	DS1	NIRR	5036 a	2233 a
		IRR	5984 a	2722 a
	DS2	NIRR	4224 a	4200 a
		IRR	3882 a	3479 a
Proléc 204	DS1	NIRR	6678 a	4509 a
		IRR	6803 a	4228 a
	DS2	NIRR	5979 a	6386 a
		IRR	6482 a	6074 a

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. M0: début de maturation des graines, M2: fin de maturation des graines. Pour chaque interaction date de semis*géotype, les valeurs moyennes entre régimes hydriques possédant la même lettre ne sont pas différents au seuil de $\alpha=5\%$.

Malgré ces différences, la surface foliaire du géotype Proléc 204 est la plus développée quelle que soit la situation (contrôlée ou naturelle) et les potentiels foliaires de base et à la mi-journée de ce dernier indique des valeurs plus faibles par rapport au géotype standard. Ce comportement laisse supposer une différence d'adaptation au stress hydrique entre géotype. Quel que soit le géotype, les contraintes hydriques les plus sévères (serre 2002 et campagne 2003) ont engendré une réduction de la durée pendant laquelle la surface foliaire est photosynthétiquement active (plus faible surface foliaire au même stade).

2.2.7.2. Exemple de la durée du cycle de développement en fonction de la date de semis

Les gammes de température étudiées par l'intermédiaire du décalage de la date de semis ont généré des différences significatives dans la durée des phases de développement exprimée en jours après levée et en sommes de températures.

Globalement, quelle que soient les séquences climatiques générées dans les années 2002 et 2003, une réduction significative de la durée totale du cycle caractérise le retard de semis (Figure 25), en particulier pour les phases M2-M4 et A2-F1. Le stade de floraison est avancé lorsque le semis est retardé (Figure 25 a). On observe également un effet significatif du décalage de la date de semis en fonction de l'année. Le début de la floraison (F1) est précoce dans le cas de l'année 2003 (DS2 puis DS1) par rapport à l'année 2002 (DS2 puis DS1) et les phases F1-M0 et M0-M2 sont globalement plus courtes.

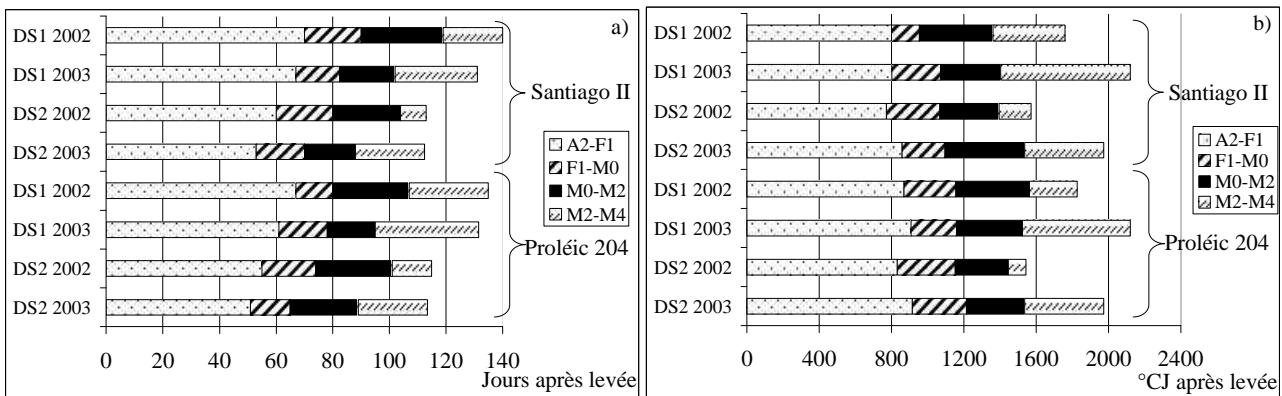


Figure 25 : Durée des différentes phases du cycle en jours après levée (a) et sommes des températures (b) (°CJ après levée) en fonction de la date de semis et des campagnes 2002 et 2003 selon les 4 phases phénologiques pour les géotypes Santiago II et Proléic 204

DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive, stades phénologiques: levée-floraison (A2-F1), floraison-début de maturation des graines (F1-M0), début de maturation des graines-fin de maturation des graines (M0-M2), fin de maturation des graines-maturité (M2-M4).

L'expression du temps en sommes des températures (°Cjours après levée) atteste également du raccourcissement de la durée du cycle en réponse au semis tardif quelle que soit l'année. Cependant, le cycle de développement diffère entre date de semis et année culturale au sein des différentes phases. Ainsi, la phase entre F1 et M0 est généralement plus courte dans le cas du semis tardif, à l'exception du géotype Santiago II en 2002 pour lequel c'est dans le cas de la date de semis classique que la durée entre F1 et M0 est la plus courte. On observe également un raccourcissement très marqué de la dernière phase (M2-M4) dans le cas du semis tardif par rapport au semis classique. Sur l'ensemble du cycle, la somme des températures de la campagne 2003 est

plus importante par rapport à celle de 2002 et illustre le raccourcissement de la durée du cycle en réponse à de fortes températures.

3. Prélèvements des échantillons biologiques

Les stades phénologiques ont été déterminés par notation hebdomadaire selon les caractéristiques décrites par le CETIOM correspondantes aux grandes étapes de développement de la culture (annexe 9) et reconnues sur le plan international (Schneiter et Miller, 1981) (Tableau 20).

Tableau 20 : Stades phénologiques retenus pour le suivi de la culture

Stade phénologique	Références	
	CETIOM, 2004	Schneiter et Miller, 1981
Levée	A2	VE
3-5 paires de feuilles	B3-B5	V4
Bouton étoilé	E1	R1
Bouton étoilé détaché	E4-E5	R2
Début floraison	F1	R5
Pleine floraison	F3.2	R5.8
Début maturation des graines	M0	R6
Maturation des graines	M1.1, M1.2, M1.3	R7
Fin maturation des graines	M2	R8
Maturité physiologique	M3	R9

L'étude cinétique de l'accumulation des composés de la graine a nécessité le prélèvement de plantes entières au cours du développement des graines. Ces prélèvements ont été effectués en fonction des stades phénologiques déterminant le développement de la plante et de la graine, à partir de M0 afin de suivre précisément l'accumulation des composés, 5 à 7 prélèvements depuis la floraison jusqu'à la maturité physiologique (récolte) ont été réalisés en 2002 (annexe 10):

- en conditions contrôlées, pour chaque interaction génotype*régime hydrique,
- en conditions naturelles, pour chaque interaction génotype*traitement hydrique*date de semis, à l'exception des génotypes marocains en semis tardif dont le faible pourcentage de levée a réduit le peuplement ce qui aurait pu fausser l'interprétation.

En 2003, 3 prélèvements ont été effectués de manière à valider les cinétiques de l'année 2002, la période de prélèvement étant établie par rapport au maximum d'accumulation de l'huile observée durant cette campagne (annexe 10).

Chaque prélèvement renferme 3 blocs de répétitions comprenant:

- en serre en 2002, de 1 à 4 plantes par répétition, soit 3 à 12 plantes selon le prélèvement,
- en conditions naturelles 3 plantes par répétition, soit 9 plantes.

A chaque prélèvement, les graines récoltées ont été triées, pour ne garder que les graines pleines, et séchées à l'étuve à 80°C pendant 48 heures de façon à obtenir 0% d'eau dans la graine, nécessaire aux analyses chimiques. Le séchage à 80°C peut entraîner des réactions métaboliques à l'intérieur de la graine. Préalablement à l'analyse des composés de la graine, un test a permis d'évaluer différentes modalités de séchage vis-à-vis de la composition en acides gras sur trois lots de graines du génotype Proléic 204 (Tableau 21).

Tableau 21 : Teneur en acides gras majeurs des graines du génotype Proléic 204 à maturité pour trois modalités de durée de séchage et de température

Durée de séchage (h)	Température de séchage (°C)	%HR	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
24	60	10	3.91 a	2.55 a	90.58 a	1.42 a
48	80	0	3.94 a	2.43 a	90.79 a	1.32 a
48	105	0	3.91 a	2.39 a	91.08 b	0.95 b

C16:0: acide palmitique, C18:0: acide stéarique, C18:1: acide oléique, C18:2: acide linoléique. Pour chaque acide gras, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$. HR: Humidité relative de la graine

Les données montrent que seule la température de séchage de 105°C modifie significativement la teneur en acides gras insaturés. Un séchage de 24 heures à 60°C ne permettant pas d'obtenir 0% d'humidité, la modalité 80°C pendant 48 heures apparaît être le meilleur compromis.

En 2003, des graines des génotypes Santiago II, Proléic 204 et Ichraq ont été prélevées à M0 et congelées de façon à fixer le matériel génétique pour une extraction d'ARN nécessaire à la caractérisation génomique présentée dans le chapitre V.

4. Détermination des teneurs en constituants de la graine

La composition biochimique des graines a été déterminée sur un broyat obtenu à l'aide d'un broyeur de type Krups 70 pendant 30 secondes de manière à obtenir une granulométrie suffisante pour une extraction optimale. Les analyses de la composition en acides gras et en phytostérols et l'extraction des huiles ont été réalisées sur la plateforme de lipochimie de l'UMR INRA/ENSIACET (Ecole Nationale Supérieure des Ingénieurs en Arts Chimiques Et Technologiques). Les déterminations de teneur en huile effectuée en RMN ont été effectuées à l'INRA de Meknès (Maroc) dans le cadre d'une collaboration franco-marocaine de l'équipe.

4.1. Détermination de la teneur en huile

Trois méthodes ont été utilisées pour la détermination du contenu lipidique. La validité et la fiabilité de ces méthodes ont fait l'objet d'un travail de DEA réalisé par Thomas Barranco en 2003.

4.1.1. Méthode de référence (Soxhlet)

La méthode normée du Soxhlet (NF EN ISO 659) a servi de référence pour la détermination de la teneur en huile. Cette méthode consiste en une extraction de l'huile par un solvant organique (isohexane) sur une matrice solide (broyat de graines). L'extraction est réalisée en enceinte fermée selon un processus semi continu à partir de 10g de broyat. L'isohexane contenant les lipides dissous est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif. Cette technique permet de renouveler le solvant sans intervenir sur le dispositif. Plusieurs extractions sont nécessaires pour extraire la totalité de l'huile. Cette méthode est longue (8h) et peu économique en solvant.

4.1.2. Accelerated Solvent Extractor (ASE 200⁰ Dionex)

La méthode ASE (Accelerated Solvent Extractor) repose sur le même principe que la méthode du Soxhlet. Cette récente technique d'extraction par solvant organique fonctionne à des températures et des pressions élevées de façon à accroître l'efficacité de l'extraction. L'extraction s'effectue dans des cellules métalliques contenant une masse de broyat connue et se déroule automatiquement selon les étapes décrites ci-dessous (Figure 26).

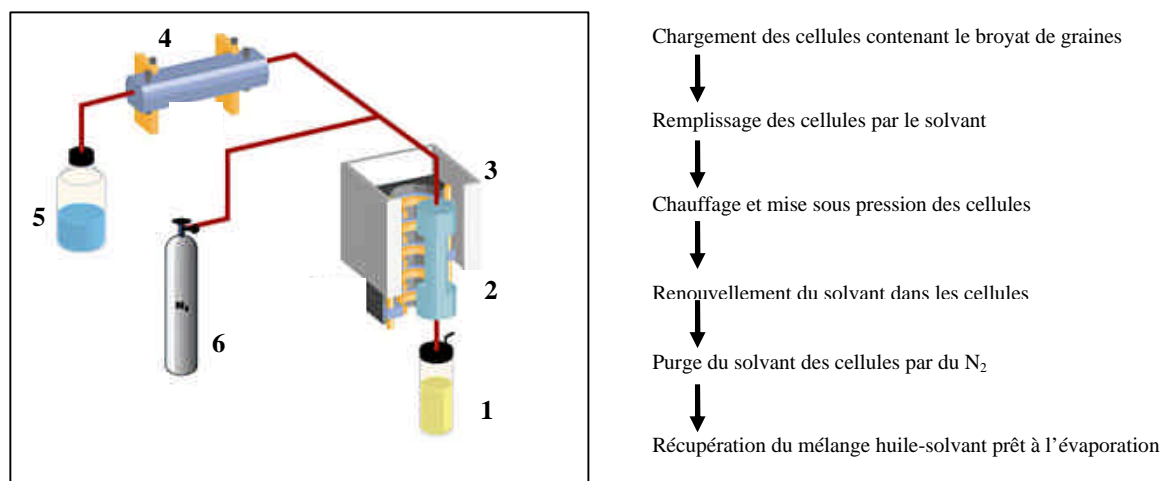


Figure 26 : Principe et composants de l'Accelerated Solvent Extractor (ASE) (ASE 200⁰ Dionex)

1: cellule de récupération, 2: cellule d'extraction, 3: four, 4: pompe, 5: solvant, 6 : bouteille de N₂.

L'intégralité des paramètres déterminant les conditions d'extraction ainsi que le nombre de cycles ont été définis d'après Matthaüs et Brühl, 2001) (annexe 11). Ces paramètres sont programmés préalablement via une interface électronique. A la différence de la méthode de référence du Soxhlet, cette technique présente l'avantage d'être rapide (30 min par échantillon), peu onéreuse (utilisation de quantités moindres de solvant) et nécessitant peu de manipulation (24 extractions programmables). La comparaison des méthodes ASE et Soxhlet a montré que ces deux techniques permettent d'extraire la totalité de l'huile et fournissent des teneurs en huile identiques (Barranco, 2004). La détermination de la teneur en huile par la méthode ASE constitue un bon compromis entre la méthode de référence et la RMN. Elle permet de réaliser le dosage d'un grand nombre d'échantillons et de récupérer les huiles extraites nécessaires à l'analyse du profil phytostérolique.

Pour les deux techniques d'extraction, après évaporation du solvant (sous pression et à 40°C), la quantité d'huile est pesée et exprimée en g d'huile par rapport à 100g de matière sèche de broyat de graines à 0% d'eau.

4.1.3. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Bien que communément utilisée pour l'analyse structurale des molécules, la méthode RMN (Oxford-4000) permet également de déterminer la composition de mélanges (norme NF EN ISO 10565). Cette application nécessite de mesurer séparément les aires des signaux provenant des constituants qui doivent être distincts. La RMN du proton est largement utilisée dans l'industrie pour de nombreux dosages de l'eau, de l'huile et d'autres composés comportant des hydrogènes. Cette méthode de détermination quantitative permet l'analyse sans préparation ni destruction du matériel biologique (directement sur graine entière). Pratiquement, l'appareil est étalonné par des standard, dont l'aire correspond à 100% et à 0% d'huile. Le pourcentage d'huile de l'échantillon est déterminé en comparant l'aire du signal produit à celle des étalons. Cette méthodologie est fiable, rapide et facile à mettre en œuvre.

Les teneurs en huile ont été déterminées par RMN pour les campagnes 1999 et 2000. La méthode ASE a permis de déterminer la teneur en huile des campagnes 2002 et 2003.

4.2. Détermination de la teneur en acides gras

La teneur en acides gras a été déterminée par analyse des esters méthyliques d'acides gras en chromatographie phase gazeuse (CPG) selon la norme NF EN ISO 5508 qui nécessite deux étapes préliminaires: l'extraction et l'estérification des acides gras (Figure 27).

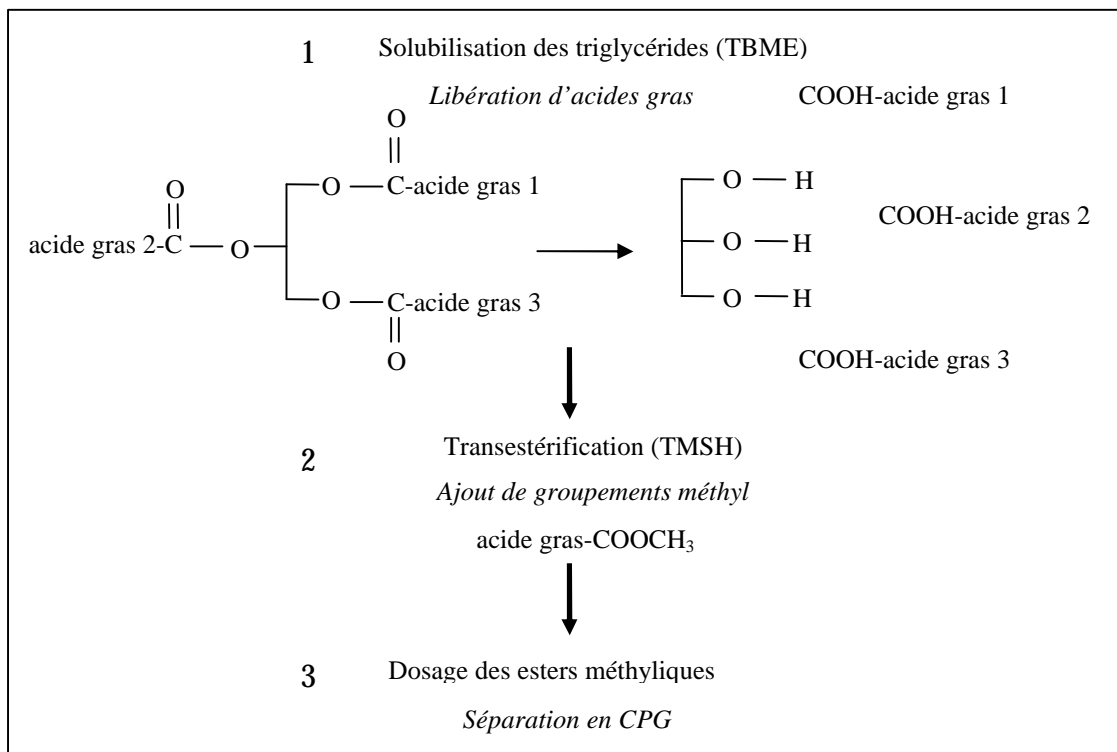


Figure 27 : Les trois étapes nécessaires au dosage des acides gras

4.2.1. Extraction et estérification des acides gras

L'extraction des acides gras correspond à la solubilisation des triglycérides contenus dans l'huile dans un solvant organique. Cette étape est suivie d'une méthyl-trans-estérification qui consiste à ajouter un groupement méthyl aux acides gras libérés pour former des esters méthyliques d'acides gras dont la séparation sera facilitée. En effet, cette dérivatisation permet de rendre les acides gras plus volatils garantissant la stabilité nécessaire à l'analyse CPG. Généralement, l'extraction et la méthylation des acides gras ont été effectués sur l'huile extraite. Lorsque l'huile n'était pas disponible, les acides gras ont été extraits directement à partir du broyat de graines. Cette méthode d'extraction sur graine entière, appelée FAME (Fatty Acids Methyl Ester) (ISO 5509: 1990), a été comparée à la méthode d'extraction des acides gras sur huile. Les résultats issus des deux méthodes ne sont pas significativement différents et leur seuil de reproductibilité est similaire et fiable (Barranco, 2004).

4.2.2. Dosage des esters méthyliques d'acides gras par CPG

La séparation et le dosage des esters méthyliques d'acides gras par CPG constituent la dernière étape. Cette technique de séparation des composants d'un mélange repose sur la différence

d'affinité des substances à analyser vis-à-vis d'une phase mobile courante et d'une phase stationnaire. En CPG, la phase mobile est appelée gaz vecteur. La méthode consiste à vaporiser l'échantillon liquide à analyser dans le gaz porteur (l'hélium). Le flux gazeux passe dans la colonne de séparation, à travers laquelle les composants de l'échantillon se déplacent à des vitesses influencées par le degré d'interaction de chaque constituant avec la phase non-volatile stationnaire. Les molécules présentant la plus grande interaction avec la phase stationnaire sont plus fortement retardées et inversement pour celles dont l'interaction est moins forte. En sortie de colonne, les composés sont détectés par un détecteur FID (Flame Ionisation Detector) et leur signal est amplifié. L'élution s'effectue donc par ordre croissant de masses moléculaires (C14, C16, C18, ...) et du nombre d'insaturations (C18, C18:1, C18:2, ...). La proportion relative d'acide gras est quantifiée par une interface informatique qui permet l'intégration de l'aire des pics séparés rapportée à la somme des aires intégrées. La comparaison du temps de rétention de chaque pic avec le profil d'un mélange d'huile de composition connue (rapeseed oil mix, Supelco, USA) permet d'identifier chaque acide gras séparé.

Les conditions de températures et de pression ont été optimisées pour permettre une meilleure séparation. L'annexe 12 récapitule le protocole et les conditions de dosage ainsi que les caractéristiques de l'appareillage adapté à l'analyse des acides gras. Chaque échantillon a été dosé 3 fois.

4.3. Détermination de la teneur en phytostérols

4.3.1. Extraction des phytostérols

L'extraction des phytostérols a été réalisée sur l'huile extraite. Une méthode d'extraction directe sur broyat de graines basée sur la méthode normée NF 5508, a été évaluée dans la mesure où celle-ci pourrait présenter un intérêt pour l'analyse de nombreux échantillons (Barranco, 2004).

Dans les deux méthodes, le principe d'extraction est identique.

Les phytostérols contenue dans la fraction insaponifiable de l'huile sont extraits par saponification avec ajout d'eau puis d'isohexane qui crée un mélange biphasique dont la phase supérieure, épiphase, contient la fraction insaponifiable dont les phytostérols, alors que la phase inférieure aqueuse renferme des sels solubles (savons) contenant les acides gras.

L'analyse quantitative par comparaison à un étalon interne (cholestanol) qui est ajouté dans tous les échantillons d'huile avant toute étape d'extraction. Le protocole d'extraction est détaillé annexe 13.

L'effet du décortiquage sur le dosage des phytostérols a été comparé à celui réalisé sur graines entières (Figure 28).

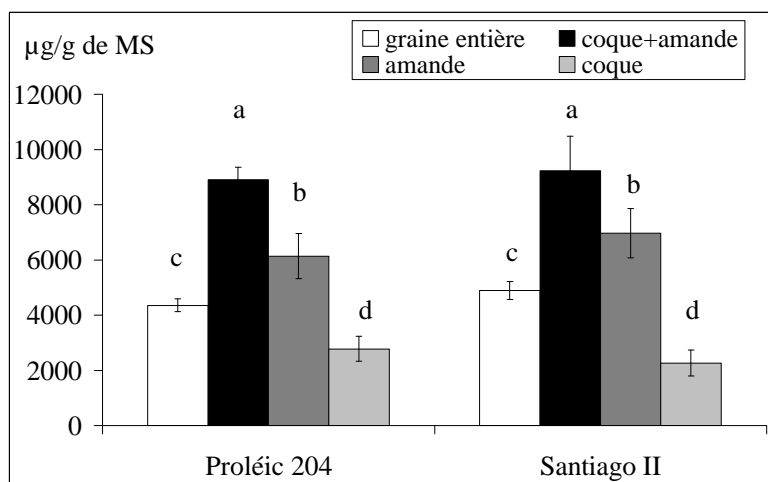


Figure 28 : Quantités de phytostérols totaux dosés dans la graine entière, dans la coque + l'amande de la graine décortiquée, dans la coque et dans l'amande séparément pour les génotypes Santiago II et Proléc 204

Pour chaque génotype, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$.

Il apparaît que l'extraction effectuée sur chacune des parties de la graine décortiquée permet d'extraire significativement plus de phytostérols que lorsqu'elle est pratiquée sur la graine entière pour les deux génotypes testés. Cette différence de quantités peut s'expliquer par le fait que lorsque la graine est décortiquée, le broyage permet d'extraire la totalité des phytostérols et notamment les stérols présents dans le tégument séminal protégeant l'amande par exemple, qui dans ce cas, se trouvent plus accessibles, contrairement à l'extraction sur graine entière. Lors de l'extraction d'une graine entière broyée, cette enveloppe reste probablement étroitement liée aux fragments d'amande ou de coque, ne permettant pas l'extraction de l'intégralité des phytostérols la constituant. Un coefficient de proportionnalité proche entre quantités de stérols totaux, sur graine entière et sur graine décortiquée sur les deux génotypes, justifie cette hypothèse.

Pour l'étude de la répartition des phytostérols au sein des deux compartiments, l'extraction des phytostérols a été réalisée indépendamment sur broyat de coque, d'amande et du mélange coque+amande.

4.3.2. Dosage des phytostérols par CPG

De la même manière que pour les acides gras, les extraits stéroliques sont dérivatisés par ajout d'un groupement silyl de manière à les rendre plus volatils ce qui facilite leur séparation en CPG. L'efficacité de séparation des constituants dépend également des conditions de température de

l'injecteur et du four dont le calibrage est fait préalablement. En sortie de colonne, un détecteur FID et une interface informatique permettent d'identifier les molécules par rapport aux temps de rétention réglés au préalable. Chaque dosage a fait l'objet de 3 répétitions. Les conditions de dosage des phytostérols en CPG sont récapitulées annexe 13.

4.4. Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines a été déterminée par la méthode Dumas réalisée sur un analyseur CHN (Leco® CHN-2000) à l'UMR ARCHE (1248) de l'INRA Toulouse-Auzeville. Cette méthode consiste en une combustion d'un broyat de graines sèches (100mg). L'azote, le carbone et l'hydrogène provenant du dégagement gazeux issu de la combustion sont dosés et exprimés en pourcentage. La teneur en protéines est calculée selon l'estimation standard qui consiste à multiplier le pourcentage d'azote par un coefficient reconnu au niveau international de 6.25.

5. Expression des résultats en quantités

La teneur en huile est exprimée en pourcentage de matière sèche de graines. Pour chaque acide gras, la teneur est exprimée en pourcentage du total des acides gras. Pour mesurer l'impact des contraintes agri-environnementales sur l'accumulation des composés dans la graine, nous avons choisi d'exprimer la composition en quantités par graine ou par capitule:

- quantité d'huile (g/graine) = poids sec d'une graine (g) x teneur en huile (g pour 100 g de matière sèche),
- quantité d'huile (g/capitule) = poids sec des graines par capitule (g) x teneur en huile (g pour 100 g de matière sèche).

L'huile est composée de 99% de triglycérides contenant les acides gras:

- quantité d'acides gras = matière sèche des graines par capitule (g) x teneur en huile (g pour 100 g de matière sèche) x 0.99 x % acides gras (% par rapport au total d'acides gras).

6. Méthodes d'analyses statistiques

L'analyse de variance est utilisée de façon à mettre en évidence des différences entre traitements pour un paramètre donné. La variance a été analysée à deux niveaux afin de dégager les effets des principaux facteurs et ceux des interactions entre facteurs. Le premier niveau concerne l'analyse de

variance à deux ou trois facteurs selon les expérimentations, incluant le génotype, le régime hydrique et le régime thermique ou la date de semis. Le second niveau d'analyse à 1 ou 2 facteurs a permis d'interpréter l'effet des conduites de culture par génotype dans la mesure où chacun d'entre eux présente un comportement spécifique vis-à-vis de l'accumulation des constituants de la graine. Le test de Newman & Keuls a permis d'analyser statistiquement la différence entre moyennes avec un seuil de tolérance à 5, 1 et 0.1% lorsque l'effet est significatif. Les analyses de variance, les coefficients de corrélation, calculé via le test de Spearman, et les régressions linéaires ont été déterminés grâce au logiciel Sigmastat (version 2.0, USA).

Une analyse en composantes principales (ACP) a également été réalisée de façon à mettre en évidence rapidement d'éventuelles corrélations entre variables. L'ACP réduit le nombre de variables selon leur abondance et trouve de nouvelles coordonnées correspondantes à la combinaison linéaire des variables. Le premier axe représente la plus grande variance, le second axe explique la seconde plus large variance et ainsi de suite. En fin d'analyse, le système multidimensionnel est réduit à un, deux ou trois composantes principales (ou axes) qui expliquent la majorité de la variabilité observée (inertie). Les résultats de l'ACP sont représentés graphiquement par des graphiques à deux dimensions. Le graphique représentant les variables met en évidence le rôle de chaque variable dans la participation à la définition des axes, celui représentant les individus illustre le comportement des échantillons individus. Le logiciel (Splus 6, USA) a permis de réaliser les analyses statistiques en composantes principales.

Chapitre III - Conduites culturales et critères agronomiques

Avant-propos

L'étude s'inscrit dans un contexte économique agricole qui se situe à deux niveaux en terme de qualité des récoltes de tournesol. D'une part, la diversification des utilisations de l'huile et des co-produits dans de nouveaux domaines complémentaires de la transformation agro-industrielle, s'avère un atout essentiel de valorisation de la culture pour relancer son développement. D'autre part, outre la composition de la graine, la qualité des récoltes se décline également à travers une agriculture respectueuse de l'environnement visant à améliorer la gestion de la fertilisation, et de la ressource hydrique qui tend à s'épuiser.

De ce constat ressort la nécessité de mettre en oeuvre les moyens d'accéder à des seuils biologiques de composition directement liés à la demande industrielle, tout en utilisant des techniques respectueuses de l'environnement. Il s'agit donc d'envisager la culture depuis la production jusqu'à la transformation et l'utilisation. Pour améliorer la maîtrise culturale et préciser l'apport de la sélection génétique, il faut une analyse approfondie du fonctionnement de la plante, de la formation des composés de la graine et des modalités d'action des facteurs limitants leur production.

Les objectifs de ce premier chapitre de résultats sont:

- d'identifier les moyens de valoriser la qualité des récoltes en définissant les seuils en composés d'intérêt susceptibles d'être atteints par le jeu des itinéraires techniques et le choix des génotypes,
- de fournir des éléments de gestion de la conduite culturale pour réaliser une production de qualité en termes de constituants majeurs et de co-produits en conditions de ressources en eau limitées,
- de proposer et valider les hypothèses établies concernant les mécanismes physiologiques régissant l'élaboration des composés de la graine en réponse à ses conduites de culture.

Dans un premier temps, la variabilité de composition à la récolte en réponse aux facteurs agri-environnementaux et aux génotypes retenus, sera évaluée. Ces données seront ensuite mises en relation avec les composantes de production. L'étude des équilibres entre constituants permettra de caractériser les seuils de composition et de concentration en molécules utiles susceptibles d'être atteints par la conduite de culture et le choix des génotypes et aptes à être valorisées selon les nouvelles méthodes de transformation des produits végétaux.

1. Variabilité de la composition de la graine en réponse aux conduites de culture

Cette partie présente l'impact des facteurs agri-environnementaux et génotypique sur la composition biochimique de la graine. Les constituants étudiés sont d'une part, l'huile et les protéines qui présentent un intérêt particulier dans l'industrie agro-alimentaire; et d'autre part, les acides gras et les phytostérols dont l'intérêt croissant concerne aussi bien la filière alimentaire que la filière non alimentaire.

Le génotype constitue le premier facteur de variation des composantes du rendement (Tableau 22 a) et de la composition de la graine (Tableau 22 b). Son effet est très hautement significatif sur le niveau de production en graines (rendement graines et poids de 1000 graines (PMG)), sur la teneur en huile, en protéines, et sur la composition en acides gras saturés (acide stéarique, C18:0 et palmitique, C16:0) et insaturés (acide oléique, C18:1 et acide linoléique, C18:2) quelle que soit l'année climatique. La seconde source de variation de ces critères provient du facteur « date de semis » tandis que le régime hydrique représente le troisième facteur à l'origine de la variabilité étudiée.

Tableau 22 : Effets des facteurs génotype (G), régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leurs interactions (G*DS, G*RH, DS*RH, G*DS*RH) sur le rendement en graines, le poids de 1000 graines (PMG), les teneurs en huile et en protéines (a) et sur les teneurs en acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0) oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) (b) selon l'année

a)

		Année	G	DS	RH	G*DS	G*RH	DS*RH	G*DS*RH	Résidus	
Rendement graines (q/ha)	1999	MS	162.6	11.6		6.9				2.7	
		P	***	NS		NS					
	2000	MS	153.5		50.5		0.4			5.5	
		P	***		**		NS				
	2002	MS	2634.0	2140.9	34.0	7.0	72.0	99.5	11.4	11.0	
		P	***	***	NS	NS	***	**	NS		
	2003	MS	1403.3	37.7	1666.8	65.8	90.2	146.8	38.8	8.3	
		P	***	*	***	***	***	***	***		
	PMG (g)	1999	MS	309.7	178.8		35.0				7.8
			P	***	***		*				
2000		MS	170.7		7.5		6.5			3.7	
		P	***		NS		NS				
2002		MS	1551.7	567.7	4.2	203.9	71.9	68.3	21.5	25.6	
		P	***	***	NS	***	*	NS	NS		
2003		MS	54.8	587.0	2008.5	343.5	47.9	36.9	14.3	7.2	
		P	**	***	***	***	***	*	NS		

MS: Mean Square, p: probability value. *: significatif pour p<0.05, **: significatif pour p<0.01, ***: significatif pour p<0.001, NS: non significatif

Résultats: Conduites culturales et critères agronomiques

b)	Année		G	DS	RH	G*DS	G*RH	DS*RH	G*DS*RH	Résidus	
Teneur en huile (%/matière sèche)	1999	MS	32.5	0.0		0.5				1.0	
		P	***	NS		NS					
	2000	MS	18.4		0.1		1.0			1.3	
		P	***		NS		NS				
	2002	MS	648.2	206.2	27.1	17.5	24.9	284.3	8.4	5.4	
		P	***	***	*	*	**	**	NS		
	2003	MS	155.5	471.4	78.4	10.9	3.2	27.9	5.2	1.7	
		P	***	***	***	***	NS	***	*		
	Teneur en protéines (%/matière sèche)	1999	MS	31.4	3.9		0.8				0.3
			P	***	**		NS				
2000		MS	19.8		1.0		0.9			0.4	
		P	***		NS		NS				
2002		MS	46.7	261.0	119.2	19.9	6.7	1.6	2.4	2.9	
		P	***	***	***	***	NS	NS	NS		
2003		MS	29.1	93.1	7.1	5.1	2.7	1.6	1.6	1.0	
		P	***	***	*	***	*	NS	NS		
C16:0 (% des acides gras totaux)		1999	MS	12.2	1.1		0.1				0.0
			P	***	***		***				
	2000	MS	12.6		0.1		0.0			0.0	
		P	***		**		NS				
	2002	MS	42.2	2.7	0.3	1.1	0.3	0.0	0.1	0.1	
		P	***	***	*	***	***	NS	NS		
	2003	MS	9.6	3.2	6.5	0.1	0.1	1.2	0.2	0.0	
		P	***	***	***	*	**	***	***		
	C18:0 (%des acides gras totaux)	1999	MS	1.2	0.2		0.01				0.0
			P	***	***		NS				
2000		MS	5.2		0.0		0.1			0.0	
		P	***		NS		NS				
2002		MS	21.5	3.3	2.6	1.1	0.1	0.0	0.0	0.1	
		P	***	***	***	***	NS	NS	NS		
2003		MS	1.2	4.1	1.1	0.1	0.1	0.6	0.1	0.0	
		P	***	***	***	*	NS	***	**		
C18:1 (%des acides gras totaux)		1999	MS	7244.9	66.7		20.9				1.6
			P	***	***		***	NS	NS	NS	
	2000	MS	7779.8		0.5		0.7			1.1	
		P	***		NS		NS				
	2002	MS	32757.3	177.4	0.6	310.9	21.4	7.3	25.7	10.8	
		P	***	***	NS	***	NS	NS	NS		
	2003	MS	3956.4	20.1	249.6	36.0	14.1	15.0	6.1	3.0	
		P	***	*	***	***	***	*	NS		
	C18:2 (%des acides gras totaux)	1999	MS	6752.3	43.2		19.8				1.5
			P	***	***		***				
2000		MS	7017.8		0.4		0.7			1.0	
		P	***		NS		NS				
2002		MS	29192.0	112.8	2.9	281.8	19.9	8.0	20.6	10.0	
		P	***	***	NS	***	NS	NS	NS		
2003		MS	3583.0	59.8	140.8	34.5	12.0	5.2	5.6	3.0	
		P	***	***	***	***	**	NS	NS		

1.1. Caractérisation de l'effet génotype sur la qualité biochimique de la graine et sur les indicateurs de production

L'effet du facteur génotype est très hautement significatif. Globalement, les génotypes non oléiques standard (Santiago II, Aranda, All Star) produisent plus de graines et d'huile que les génotypes oléiques (Proléic 204, Trisun 870) quelle que soit l'année culturale (Tableau 23).



(Génotype oléique, J. Roche)

Tableau 23 : Effet du facteur génotype sur le rendement grains, le poids de 1000 graines (PMG) et les teneurs en huile, protéines, acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) selon l'année

Année	1999				2000				
	Génotypes	Santiago II	Aranda	Proléic 204	Trisun 870	Santiago II	Aranda	Proléic 204	Trisun 870
Rendement (q/ha) à 0% HR	28.40 a	29.90 a	18.20 c	25.80 b	25.90 b	30.30 a	18.10 c	25.10 b	
PMG (g)	61.53 a	50.03 b	47.75 bc	45.30 c	52.84 a	42.87 c	40.79 c	43.73 bc	
Teneur en huile (% MS)	51.15 a	51.22 a	48.12 b	46.52 c	53.36 a	53.29 a	49.98 b	50.69 b	
Teneur en protéines (% MS)	17.93 b	15.18 c	19.97 a	15.33 c	21.80 a	18.27 b	21.66 a	18.97 b	
C16:0 (%)	5.03 b	6.08 a	3.37 c	3.07 d	4.92 b	5.94 a	3.31 c	2.79 d	
C18:0 (%)	3.72 a	2.78 c	2.80 c	3.32 b	5.36 a	3.64 c	3.23 d	3.93 b	
C18:1 (%)	33.50 c	24.60 d	87.32 b	90.72 a	22.30 c	19.35 d	80.66 b	85.47 a	
C18:2 (%)	56.32 b	65.20 a	4.70 c	1.38 d	64.03 b	66.94 a	8.85 c	3.92 d	

111

Année	2002				2003						
	Génotypes	Santiago II	Proléic 204	Karima	Salima	Santiago II	Proléic 204	All Star	Ichraq	2603	HA300b
Rendement (q/ha) à 0% HR	25.85a	22.20b	11.88c	11.06c	18.23 b	33.02 a	31.54 a	28.83 a	10.54 c	8.58 c	
PMG (g)	55.21 c	50.50 d	58.44 b	64.04 a	47.32 b	48.77 b	61.37 a	55.76 a	55.77ab	42.19 b	
Teneur en huile (% MS)	51.67 a	49.46 b	44.08 c	44.76 c	44.68 a	41.60 a	43.13 a	43.77 a	35.39 b	45.12 a	
Teneur en protéines (% MS)	19.81 c	20.85 b	21.55 ab	22.10 a	20.93 c	23.40 b	20.82 c	23.15 b	24.29 a	21.60 c	
C16:0 (%)	5.23 a	3.35 b	5.22 a	5.23 a	5.62 c	4.05 d	6.64 a	5.47 c	6.22 b	5.96 bc	
C18:0 (%)	4.37 a	2.93 c	4.29 a	4.08 b	3.98 ab	3.36 c	4.22 a	3.55 c	3.54 c	3.76 b	
C18:1 (%)	29.53 c	81.88 a	28.20 c	31.38 b	41.15 bc	84.06 a	36.36c	42.60 b	38.34 c	41.18 bc	
C18:2 (%)	59.13 a	9.69 c	60.38 a	57.35 b	47.73 ab	6.62 c	51.063 a	46.87 b	50.40 a	47.71 ab	

MS: Matière Sèche. Pour chaque année, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$. HR: humidité relative de la graine

Les teneurs en huile atteignent 50.0% en moyenne dans le cas des génotypes standard alors que les hybrides oléiques renferment seulement 47.2% d'huile en moyenne. Les mêmes tendances s'observent sur le rendement en graines, avec une supériorité de environ 5q/ha pour les hybrides standard, à l'exception du génotype Santiago II pour lequel le rendement en graines est le plus faible. Les génotypes populations (Karima, Salima) (12q/ha et 44.4% d'huile) présentent un rendement faibles, à l'exception du génotype Ichraq qui se maintient au niveau des génotypes standard. Les lignées possèdent les plus faibles niveaux de production de graines et d'huile (9.6q/ha et 35.4% pour la lignée 2603).

Les génotypes populations renferment les plus fortes teneurs en protéines (22.3%). Associée à un poids significativement supérieur à celui des autres génotypes (59.4g en moyenne), cette caractéristique présente un intérêt particulier pour l'utilisation de ces génotypes en graines de bouches. Les graines du génotype Proléic 204 possèdent également une teneur élevée en protéines, significativement supérieure à celles des graines des autres hybrides quelle que soit l'année (21.5% en moyenne). Ces graines sont généralement plus légères (47% en moyenne) mais de poids plus constant que celles des génotypes standard dont la situation est plus contrastée selon le génotype et l'année culturale.

Le facteur génotype présente un effet très hautement significatif en ce qui concerne la teneur en acides gras globale.

Outre la supériorité significative de teneur en acide oléique (C18:1) caractéristique des génotypes oléiques par rapport aux génotypes standard (environ 85% et 30% respectivement), il existe un gradient de teneur en cet acide gras au sein des hybrides oléiques et standard. En effet, les teneurs en C18:1 varient de 86 à 91% dans les graines de Trisun 870, de 81 à 87% dans celles de Proléic 204; et respectivement de 22 à 41% et 19 à 25% dans les graines de Santiago II et de Aranda. La proportion en C18:1 des populations atteint 30% environ, à l'exception du génotype marocain Ichraq dont les graines présentent une teneur autour de 40% à l'instar de celles des lignées (2603, HA300b). Les graines du génotype Proléic 204 renferme le plus faible niveau de C18:2. Pour tous les génotypes, la teneur en acide linoléique (C18:2) varie inversement à celle du C18:1 qui se traduit par une étroite corrélation négative entre ces deux acides (Figure 29).

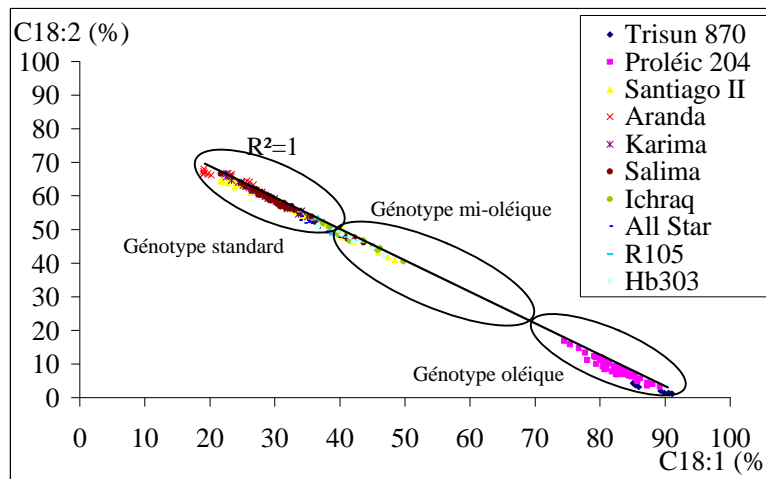


Figure 29 : Corrélation entre la teneur en acide oléique (C18:1) et celle de l'acide linoléique (C18:2) pour tous les génotypes et les années culturales

La relation met en évidence la large gamme des teneurs en C18:1 et C18:2 accessible par le choix du génotype (oléique, mi-oléique et standard).

La teneur en acides gras saturés (C18:0 et C16:0) présente également des variations significatives selon les génotypes. Les pourcentages en C16:0 varient de 26% entre génotypes standard et de 31% entre génotypes oléiques. Les graines des hybrides oléiques accumulent les teneurs les plus faibles de C18:0 et de C16:0 (3.3% de chaque). La situation s'avère plus contrastée chez les hybrides standard: dans le cas du génotype Santiago II, la teneur est la plus élevée quelle que soit l'année (4.4%), tandis que chez Aranda la teneur en C18:0 avoisine celles des graines des génotypes oléiques.

Choix des génotypes retenus

Le choix du génotype présente un intérêt primordial dans l'étude des interactions génotype*milieu. Lors des différentes expérimentations menées en conditions naturelles, un nombre important de génotypes a été retenu afin d'évaluer leur réponse aux conditions agri-environnementales d'un point de vue qualitatif. Dans ce chapitre, nous avons choisi de présenter parmi les génotypes oléiques et standard ceux dont le comportement est le plus influencé par les pratiques culturales.

Les variables culturales prises en compte lors de cette étude (date de semis et régimes hydriques) influencent l'accumulation de l'huile, des protéines, des acides gras et des phytostérols dans la graine. Bien que les résultats obtenus rendent compte de l'interaction de plusieurs facteurs de l'environnement et du facteur génotype, nous avons également choisi de traiter chaque facteur séparément afin de faciliter l'interprétation de l'effet de chacun d'eux sur la composition de la graine. D'une part, la spécificité de chaque génotype vis-à-vis de la composition de la graine justifie

ce choix. D'autre part, les données des années 1999 et 2000 ont été étudiées selon les variables génotype*date de semis en 1999 et génotype*régime hydrique en 2000. Seules les années 2002 et 2003 ont fait l'objet de l'analyse de la triple interaction génotype*date de semis*régime hydrique.

1.2. Impact des conduites culturales sur la composition de la graine

1.2.1. Huile et protéines

1.2.1.1. Impact de la date de semis

Le facteur date de semis a engendré des différences hautement significatives de teneurs en huile et en protéines, à l'exception des cultures semées en 1999 (Tableau 22 a). La réponse au facteur est modulée selon les séquences climatiques (Figure 30 a et b).

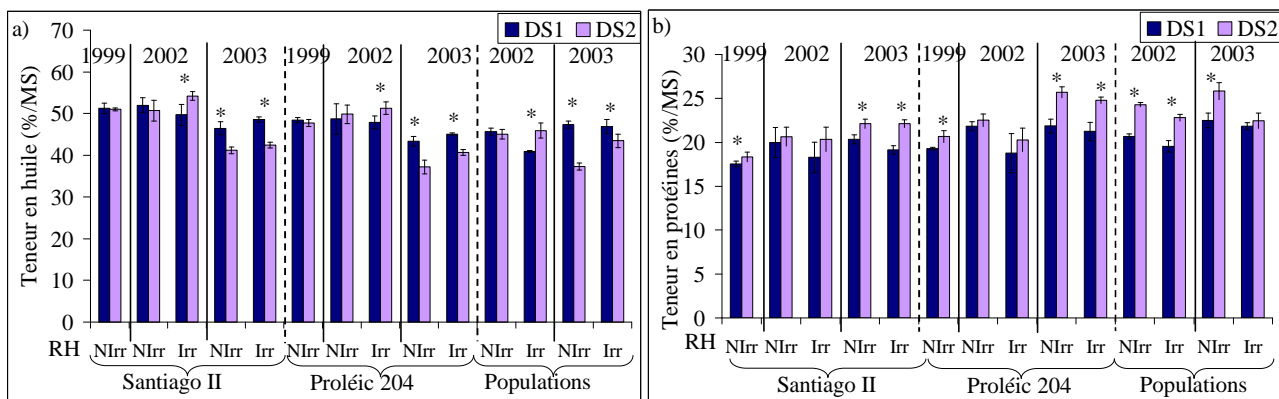


Figure 30 : Effet de la date de semis sur la teneur en huile (a) et en protéines (b) (g/100g de matière sèche (MS) dans le cas des génotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichraq en 2003) selon l'année

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$.

Dans le cas d'une année à fort déficit hydrique et températures élevées (2003), une diminution de la teneur en huile est observée en réponse au facteur date de semis (-15.6 et -9.9% en conditions non irriguée et irriguée respectivement) associée à une augmentation de la teneur en protéines (+12.0 et +14.0% en conditions non irriguée et irriguée respectivement); alors que la situation inverse caractérise une année à faible déficit hydrique et températures faibles (2002), pour laquelle la teneur en huile est significativement supérieure dans le cas du semis tardif quel que soit le génotype. Pour des températures moyennes relativement constantes (autour de 22.5°C) à partir de la floraison (1999), la teneur en huile n'a pas variée (51%) selon la date de semis. Des températures globalement plus tempérées dans le cas du semis tardif (2002), particulièrement durant la fin du cycle (M2-M4) et pendant la phase de remplissage (M0-M2), a favorisé l'accumulation de l'huile dans les graines. *A contrario*, durant l'année 2003 pour laquelle les températures ont été

globalement plus chaudes, le décalage de la date de semis a engendré une augmentation de températures moyennes pendant les phases de floraison (F1-M0) et de remplissage de la graine (M0-M2) (+1.4°C et +2°C respectivement) responsable de la diminution de la teneur en huile.

Concernant la teneur en protéines, elle varie inversement à la teneur en huile dans les différentes conditions culturales, à l'exception de l'année 1999 pour laquelle la teneur en protéines augmente significativement lorsque le semis est décalé quel que soit le génotype (+4.4 et 6.8% pour Santiago II et Proléic 204 respectivement) alors que la teneur en huile ne varie pas. Durant la séquence climatique de 1999, les températures moyennes entre la levée et la floraison (F1) sont relativement plus élevées (+2°C). Les protéines sont les premiers composés à s'accumuler dans la graine (Goffner, 1989). Les conditions de températures de l'année 1999 ont pu influencer le développement précoce de la culture et modifier l'établissement du potentiel d'élaboration des protéines.

Il existe une forte interaction *génotype*date de semis* sur la teneur en huile et en protéines principalement portés par les génotypes populations pour lesquels l'effet de la date de semis est hautement significatif.

1.2.1.2. Impact de la disponibilité hydrique

Le facteur régime hydrique a un effet significatif sur la teneur en huile et en protéines (Tableau 22 a). Généralement, la teneur en huile augmente pour tous les génotypes en condition irriguée (70% de l'ETM) (+8.4%), à l'exception des génotypes populations en 2002 (Figure 31 a). A l'inverse, l'apport d'irrigation entraîne une réduction de la teneur en protéines des graines de la majorité des génotypes (-8.3%), à l'exception de Santiago II qui présente un comportement relativement stable vis-à-vis de la contrainte hydrique. Le génotype oléique présente une variabilité de teneur en protéines particulièrement forte (jusqu'à -14%) par rapport aux autres génotypes en réponse au régime hydrique.

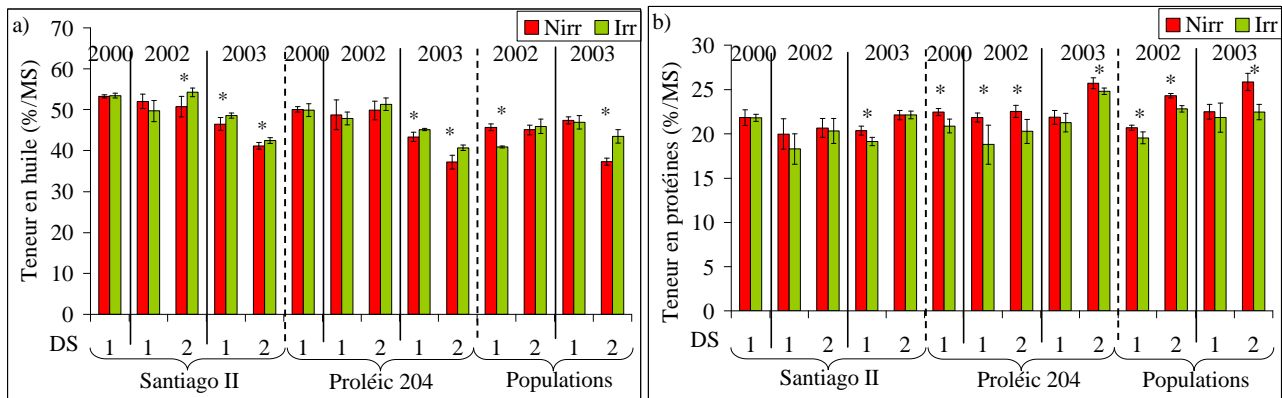


Figure 31 : Effet du régime hydrique sur la teneur en huile (a) et en protéines (b) (g/100g de matière sèche (MS) dans le cas des génotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichraq en 2003) selon l'année

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$.

Les régimes hydriques mis en œuvre ont généré différents niveaux de stress hydrique caractérisables au niveau du sol (déficit hydrique par rapport à 70% de l'ETM) et au niveau de la plante (potentiel hydrique foliaire) (cf Tableau 18). Les déficits hydriques varient de -2 à -90mm entre la floraison (F1) et le début de maturation des graines (M0) et de -17 à -88mm entre ce stade et la fin de maturation des graines (M2). La séquence climatique de l'année 2003 présente les déficits hydriques les plus marqués (niveau 5 en conditions non irriguées). Les potentiels hydriques foliaires mesurés au cours des expérimentations 2002 et 2003 suivent les mêmes tendances (-1.64 à -0.47MPa et -0.56 à -2.83MPa pendant les phases F1-M0 et M0-M2 respectivement). L'intensité des niveaux de stress observés dans l'expérimentation 2003 explique que l'effet d'un apport d'irrigation en phase post-florale sur la composition de la graine soit significatif dans ces conditions climatiques. Il existe également une forte interaction date de semis*régime hydrique sur la teneur en huile car ces facteurs conditionnent la phase de remplissage lipidique de la graine (F1-M0) alors qu'aucune interaction n'est notée pour la teneur en protéines qui ne varie pratiquement pas durant cette même phase.

1.2.2. Acides gras

La composition en acides gras représente un critère de classification des huiles végétales (saturées, mono ou poly-insaturées) déterminée selon la dominance d'un acide gras donné. La teneur en acides gras, exprimée en pourcentage de l'un par rapport aux autres est un indicateur de qualité largement utilisé dans l'industrie pour définir la composition et les seuils de teneurs en acides gras spécifique à l'utilisation de certaines huiles dans un secteur donné. Seuls les acides gras majoritaires

saturés (acides stéarique (C18:0) et palmitique (C16:0)) et insaturés (acides oléique (C18:1) et linoléique (C18:2)) ont fait l'objet de l'analyse de l'interaction génotype*conduites de culture; les acides myristique (C14:0), arachidique (C20:0), béhénique (C22:0) n'excédant pas 2%.

1.2.2.1. Impact de la date de semis

L'analyse de variance montre un effet hautement significatif de la date de semis sur la teneur acides gras insaturés et saturés de la graine de tournesol pour toutes les séquences climatiques étudiées (Tableau 22 b). Il apparaît cependant des variations différentes selon les génotypes et les séquences climatiques.

Concernant les acides gras insaturés, il ressort une forte interaction génotype*date de semis. Chez les hybrides standard, le décalage de la date de semis a engendré une augmentation de la teneur en C18:1 (+ 20.6% en moyenne), alors que la teneur en cet acide gras reste relativement stable dans les graines des génotypes oléiques (Proléc 204) (Figure 32 a).

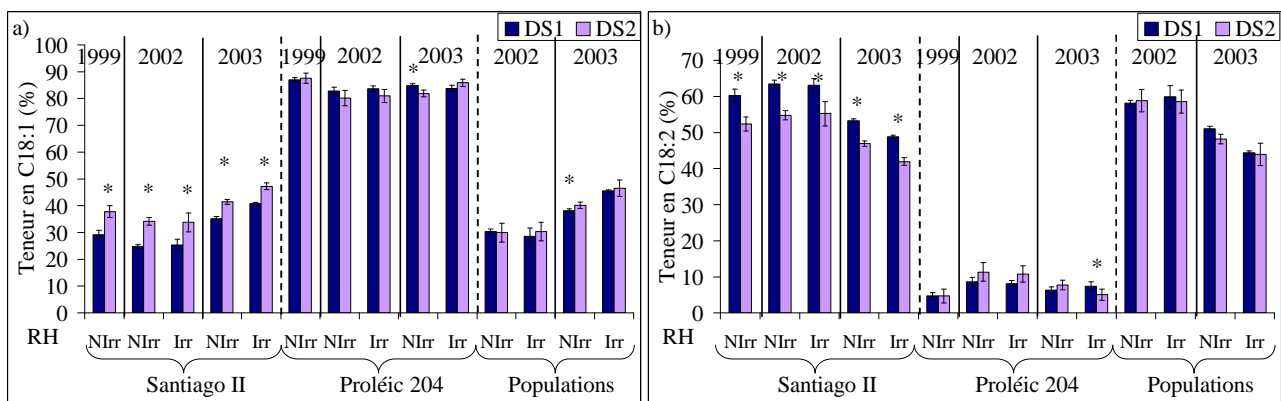


Figure 32 : Effet de la date de semis sur la teneur en acides oléique (C18:1) (a) et linoléique (C18:2) (b) (%/aux acides gras totaux) dans le cas des génotypes Santiago II, Proléc 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichra en 2003) selon l'année

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$.

Le retard de semis entraîne une réduction concomitante de la teneur en C18:2 des graines des génotypes standard tandis que celle des génotypes oléiques ne varie pas. Les teneurs en C18:1 des populations testées lors de la campagne 2002 ne sont pas affectées (Figure 32 b).

Pour tous les génotypes, le semis tardif pratiqué durant la campagne 2003 a conduit à l'augmentation de la proportion d'acides gras saturés accumulés dans la graine (C18:0 et C16:0) (Tableau 24). En revanche, ces pourcentages varient selon les séquences climatiques des autres années expérimentales (1999 et 2002) et les génotypes. Le décalage de la date de semis induit une diminution de la teneur en C16:0 des graines des génotypes standard alors que cette proportion n'est

pas affectée dans les graines des génotypes oléiques. Concernant la teneur en C18:0, les génotypes oléiques présentent le même comportement que les génotypes populations pour lesquelles le pourcentage en cet acide gras diminue sous l'effet du décalage de la date de semis. La teneur en C18:0 des graines hybrides standard ne varie pas.

Tableau 24 : Effets des facteurs régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leur interaction (DS*RH) sur les teneurs en acides palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) selon l'année

	Génotypes	Santiago II		Proléic 204		populations					
		DS/RH	Nirr	Irr	moyenne	Nirr	Irr	moyenne	Nirr	Irr	moyenne
C18:0 (%/aux acides gras totaux)	1999	DS1	3.80 a		2.90 a						
		DS2	3.63 a		2.70 b						
	2000	DS1	5.01 a	4.84 b	3.37 a		3.26 b				
		DS2	4.50 a	4.36 a	4.43 a	3.18 a	2.86 a	3.02 a	4.52 a	4.24 b	4.38 a
	2002	DS1	4.35 a	4.29 a	4.32 a	2.98 a	2.71 a	2.85 b	4.13 c	3.91 d	3.99 b
		moyenne	4.42 a	4.32 a		3.08 a	2.79 b		4.32 a	4.05 b	
	2003	DS1	4.06 a	3.62 b	3.84 b	3.03 bc	3.07 c	3.05 b	3.46 b	3.30 b	3.38 b
		DS2	4.21 a	4.02 a	4.11 a	3.89 a	3.45 b	3.67 a	4.10 a	3.33 b	3.71 a
	moyenne		4.13 a	3.88 b		3.46 a	3.26 b		3.78 a	3.31 b	
	C16:0 (%/aux acides gras totaux)	1999	DS1	5.37 a		3.47 a					
			DS2	4.70 b		3.27 a					
		2000	DS1	5.37 a	5.36 a	3.27 a		3.18 a			
DS2			5.54 a	5.55 a	5.55 a	3.35 a	3.33 a	3.34 a	5.21 a	5.41 b	5.31 a
2002		DS1	4.93 a	4.86 a	4.90 b	3.40 a	3.34 a	3.37 a	5.07 a	5.22 ab	5.18 b
		moyenne	5.23 a	5.22 a		3.37 a	3.33 a		5.14 a	5.31 a	
2003		DS1	5.77 b	5.31 c	5.54 b	3.88 b	3.84 b	3.86 b	5.52 b	5.13 dc	5.32 b
		DS2	6.03 a	5.38 c	5.70 a	4.56 a	3.91 b	4.24 a	6.20 a	5.01 d	5.61 a
moyenne			5.90 a	5.34 b		4.22 a	3.87 b		5.86 a	5.07 b	

Pour chaque année, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$. En gras et horizontalement: valeurs moyennes des conditions non irriguées (Nirr) et irriguées (Irr) pour chaque génotype; en gras et verticalement: valeurs moyennes des dates de semis classique (DS1) et tardive (DS2) pour chaque génotype.

1.2.2.2. Impact de la disponibilité hydrique

Le facteur régime hydrique présente un effet significatif sur la teneur en acides gras saturés de la graine quelle que soit l'année, et sur la teneur en acides gras insaturés uniquement dans le cas d'année à forts déficits hydriques (2003) (niveau 5 de stress hydrique) (Tableau 22 b).

Concernant la teneurs en acides gras saturés, l'apport d'irrigation conduit à diminuer la proportion en C18:0 dans toutes les séquences climatiques et quel que soit le génotype (-7.8%), à l'exception des génotypes standard en 2002 pour lesquels la teneur reste stable (Tableau 24). Concernant la teneur en C16:0, seuls des déficits hydriques intenses (2003) ont conduit à différencier l'effet de la conduite d'irrigation, avec une diminution significative en conditions non irriguées (-10.4%).

L'effet significatif de la conduite hydrique sur le pourcentage d'acides gras insaturés (2003) se traduit par une augmentation de la teneur en C18:1 des graines de géotypes standard (+14.1%) et du géotype oléique dans le cas du semis tardif (+4.6%) (Figure 33 a) associée à une diminution de C18:2 (Figure 33 b).

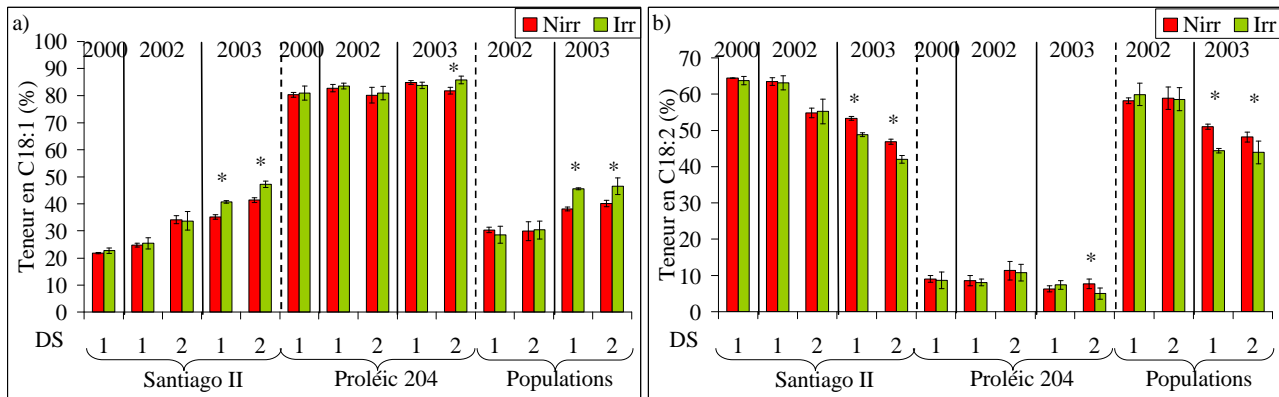


Figure 33 : Effet du régime hydrique sur la teneur en acides oléique (C18:1) (a) et linoléique (C18:2) (b) (%/aux acides gras totaux) dans le cas des géotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichra en 2003) selon l'année

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$.

1.2.3. Phytostérols

Les phytostérols, dont les propriétés hypocholestérolémiantes ont été mises en évidence par de nombreuses études, sont extraits de la fraction insaponifiable de l'huile. Ces molécules encore peu exploitées il y a 5 ans, connaissent à l'heure actuelle un essor important sur le marché des aliments fonctionnels appelés aussi aliments-santé, notamment les margarines enrichies en phytostérols; ainsi que dans le domaine pharmaceutique pour la fabrication de stéroïdes, et plus récemment pour des utilisations cosmétiques. Avec une teneur d'environ 1% dans l'huile, le tournesol pourrait s'avérer être une source intéressante de phytostérols dans l'avenir, jusqu'à devenir l'objet de recherche visant à améliorer sa teneur en phytostérols.

Toutefois, la variabilité de composition en phytostérols en réponse aux contraintes environnementales reste mal connue. Lors de ce travail, l'effet des conduites de culture a été étudié de manière à évaluer les seuils de teneurs accessibles par le jeu des itinéraires techniques et susceptibles d'alimenter de nouvelles filières.

Avec l'introduction de géotypes présentant des teneurs spécifiques en phytostérols particulière au cours de la campagne 2003 (cf Tableau 11), la variabilité d'accumulation des phytostérols dans la graine de tournesol a été étudiée en réponse aux contraintes agri-environnementales. Les

phytostérols sont regroupés en trois catégories se différenciant par le degré de méthylation de ceux-ci correspondant à leur position dans la voie de biosynthèse (cf chapitre I): les diméthylphytostérols (DiMS) et les méthylphytostérols (MS) (premiers intermédiaires de synthèse) et les déméthylphytostérols (DMS) (produits finaux s'accumulant majoritairement dans la graine).

L'analyse de la variance révèle un effet hautement significatif du facteur génotype sur le taux des différentes catégories de phytostérols ainsi que sur celui du phytostérol majoritaire (β sitostérol) (Tableau 25). Le facteur régime hydrique influe sur les phytostérols totaux et toutes les catégories de phytostérols, à l'exception des diméthylstérols. Les teneurs en phytostérols totaux et seule la catégorie des déméthylstérols sont influencés en réponse à la date de semis.

Tableau 25 : Effets des facteurs génotype (G), régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leurs interactions (G*DS, G*RH, DS*RH, G*DS*RH) sur la teneur en β sitostérol, des trois groupes de phytostérols, et de phytostérols totaux lors de la campagne 2003

(mg/100g d'huile)		G	DS	RH	G*DS	G*RH	DS*RH	G*DS*RH	Résidus
β sitostérol	MS	10424.23	1028.69	2288.15	1451.84	768.78	4918.83	832.24	116.04
	P	***	**	***	***	***	***	***	
Déméthylstérols	MS	33618.10	11273.26	15544.67	3795.37	1981.00	11059.07	2013.16	412.97
	P	***	***	***	***	***	***	***	
Méthylstérols	MS	1258.53	6.25	739.07	56.42	42.17	77.25	40.36	19.61
	P	***	NS	***	*	NS	NS	NS	
Diméthylstérols	MS	824.34	1.04	9.55	24.44	27.76	101.67	23.82	13.78
	P	***	NS	NS	**	NS	NS	NS	
Phytostérols totaux	MS	49668.51	11590.29	24010.81	4654.34	2233.04	11332.90	2494.41	531.06
	P	***	***	***	***	**	***	***	

MS: Mean Square, p: probability value. *: significatif pour $p < 0.05$, **: significatif pour $p < 0.01$, ***: significatif pour $p < 0.001$, NS: non significatif

1.2.3.1. Facteur génotype

Globalement, il apparaît une classification selon les génotypes: le génotype 2603 possède les graines renfermant le plus fort taux de phytostérols totaux (près de 600mg/100g d'huile) (Tableau 26).

Tableau 26 : Effet du facteur génotype sur la teneurs en β sitostérol, des trois groupes de phytostérols et de phytostérols totaux pour les différents génotypes testés lors de la campagne 2003

Phytostérols (mg/100g d'huile)	Génotypes					
	All Star	Santiago II	Proléic 204	Ichraq	2603	HA300b
β sitostérol	249.20 b	248.21 b	219.10 c	207.06 c	290.82 a	230.44 bc
Déméthylstérols	401.46 b	398.93 b	351.40 c	339.00 c	489.40 a	392.68 b
Méthylstérols	53.69 b	44.94 c	35.93 d	33.29 d	52.48 b	58.67 a
Diméthylstérols	58.46 a	39.81 c	34.74 d	39.55 c	45.69 b	40.34 c
Phytostérols totaux	513.61 b	483.69 c	422.07 c	411.84 c	587.56 a	491.69 b

Pour chaque phytostérols ou catégories, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$.

Les DMS présentent le taux le plus élevé dans les graines du génotype 2603. Le β sitostérol, majoritaire dans la fraction DMS, varie de la même façon suivant les génotypes. Les graines des génotypes All Star et HA300b possèdent une concentration en phytostérols totaux 15% plus faible que celle des graines du génotype 2603 (502.7 mg/100g d'huile), tandis que celles des génotypes Santiago II, Proléc 204 et Ichraq s'élèvent à 432.2 mg/100g d'huile, soit 26% de moins que dans le cas du génotype 2603. Au contraire, les concentrations les plus élevées de MS et de DiMS sont enregistrées dans les génotypes HA300b et All Star respectivement, alors que les graines de Proléc 204 renferment la plus faible concentration.

1.2.3.2. Impact de la date de semis

Le facteur date de semis a un effet hautement significatif sur les taux de phytostérols totaux, de DMS et β sitostérol (Tableau 25). Globalement, les quantités de phytostérols totaux expriment une nette supériorité dans le cas du semis tardif en conditions non irriguées quel que soit le génotype (Figure 34).

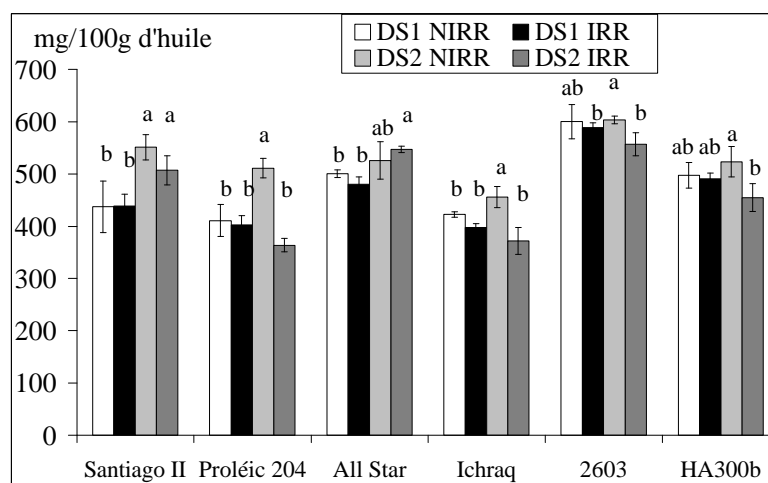


Figure 34 : Effet des facteurs régime hydrique, date de semis et leur interaction sur la teneur en phytostérols totaux pour les génotypes testés lors de la campagne 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. Pour chaque génotype, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$.

Les effets du décalage de la date de semis sont plus variables concernant les catégories de phytostérols et le type de phytostérol. Le Tableau 27 a et b présentent les variations des DMS sous l'effet des facteurs agri-environnementaux testés.

Tableau 27 : Effet de la date de semis, du régime hydrique et leurs interactions avec les géotypes hybrides (a), populations et lignées (b) sur les teneurs en déméthylphytostéroïls majeurs lors de la campagne 2003

a)	Géotypes	Santiago II		moyenn e	Proléic 204		moyenne	All Star		moyenne
		Dates de semis	Nirr		Irr	Nirr		Irr	Nirr	
βsitostérol	DS1	222.00 b	233.55 ab	227.78 b	209.51 b	214.55 b	212.03 b	242.64 b	236.48 b	239.56 b
	DS2	279.20 a	258.07 a	268.64 a	262.81 a	189.54 c	226.18 a	250.66 ab	267.03 a	258.84 a
Moyenne		250.60 a	245.81 a		236.16 a	202.05 b		246.65 a	251.75 a	
Campestérol	DS1	25.41 d	32.03 c	28.72 b	23.30 b	26.33 b	24.81 b	39.73 a	39.07 a	39.40 a
	DS2	39.30 a	34.73 b	37.02 a	37.60 a	23.99 b	30.80 a	37.50 a	40.92 a	39.21 a
Moyenne		32.36 a	33.38 a		30.45 a	25.16 b		38.62 a	40.00 a	
Stigmastérol	DS1	27.67 b	29.20 b	28.45 b	34.93 b	34.41 b	34.67 a	32.92 b	32.21 b	32.57 b
	DS2	41.49 a	36.43 a	38.96 a	45.03 a	28.81 b	36.92 a	39.33 a	39.84 a	39.59 a
Moyenne		34.59 a	32.82 a		39.98 a	31.61 b		36.13 a	36.03 a	
? 5avénastérol	DS1	9.47 b	9.95 b	9.71 b	6.48 a	7.33 a	6.91 a	10.62 a	7.04 a	8.83 a
	DS2	12.40 a	13.29 a	12.85 a	10.07 a	7.36 a	8.72 a	9.09 a	10.66 a	9.87 a
Moyenne		10.94 a	11.62 a		8.27 a	7.35 a		9.85 a	8.85 a	
? 7stigmastérol	DS1	53.83 b	39.43 c	46.63 b	45.53 b	37.30 b	41.42 b	48.49 b	48.09 b	48.29 b
	DS2	68.59 a	58.81 a	63.70 a	64.72 a	41.63 b	53.18 a	60.76 a	56.99 a	58.87 a
Moyenne		61.21 a	49.12 b		55.14 a	39.45 b		54.62 a	52.54 a	
? 7avénastérol	DS1	16.42 b	14.95 b	15.68 b	13.58 b	12.48 b	13.03 a	14.45 a	12.57 b	13.50 a
	DS2	20.42 a	19.09 a	19.76 a	16.28 a	12.01 b	14.14 a	14.78 a	13.97 a	14.38 a
Moyenne		18.42 a	17.02 a		14.93 a	12.24 b		14.61 a	13.27 b	

Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différents au seuil de $\alpha=5\%$. NIRr: régime hydrique non irrigué, Irr: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. En gras et horizontalement: moyennes de l'effet du régime hydrique; En gras et verticalement: moyennes de l'effet de la date de semis.

b)	Génotypes	Ichraq			2603			HA300b		
		Dates de semis	Nirr	Irr	moyenne	Nirr	Irr	moyenne	Nirr	Irr
βsitostérol	DS1	214.22 b	197.36 c	205.79 a	285.51 b	308.76 a	297.14 a	232.50 a	247.21 a	239.86 a
	DS2	228.49 a	188.18 c	208.34 a	298.19 b	270.80 c	284.50 a	231.57 a	210.47 b	221.02 a
Moyenne		221.35 a	192.77 b		291.95 a	289.78 a		232.04 a	228.84 a	
Campestérol	DS1	30.12 a	31.04 a	30.58 a	39.83 b	54.91 a	47.37 a	24.27 a	29.16 a	26.72 a
	DS2	33.11 a	27.15 b	30.13 a	46.98 b	42.80 b	44.89 a	28.35 a	24.82 a	26.59 a
Moyenne		31.62 a	29.09 b		43.41 a	48.85 a		26.31 a	26.99 a	
Stigmastérol	DS1	35.19 a	30.36 b	32.78 a	36.49 a	37.90 a	37.20 a	41.00 b	41.46 b	41.23 a
	DS2	36.27 a	27.62 b	31.94 a	35.24 a	33.15 a	34.20 a	43.22 a	37.48 b	40.35 a
Moyenne		35.73 a	28.99 b		35.87 a	35.52 a		42.11 a	39.47 a	
? 5avénastérol	DS1	12.10 a	12.66 a	12.38 a	18.40 a	13.90 a	16.15 a	3.90 a	6.06 a	4.98 a
	DS2	10.18 a	13.27 a	11.73 a	13.42 a	13.48 a	13.45 a	6.15 a	6.93 a	6.54 a
Moyenne		11.14 a	12.97 a		15.91 a	13.69 a		5.03 a	6.50 a	
? 7stigmastérol	DS1	43.80 b	33.77 c	38.78 b	79.78 a	60.39 b	70.08 b	71.78 b	58.95 b	65.37 b
	DS2	53.52 a	35.25 c	44.39 a	81.39 a	74.84 a	78.11 a	86.63 a	68.34 b	77.49 a
Moyenne		48.66 a	34.51 b		80.58 a	67.51 b		79.21 a	83.65 b	
? 7avénastérol	DS1	16.69 a	14.77 ab	15.73 a	31.52 a	22.07 b	26.79 b	17.49 a	16.31 a	16.90 a
	DS2	17.84 a	13.05 b	15.45 a	29.91 a	27.92 a	28.92 a	19.96 a	16.71 a	18.34 a
Moyenne		17.26 a	13.91 b		30.71 a	25.00 b		18.73 a	16.51 a	

Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différents au seuil de $\alpha=5\%$. NIRr: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. En gras et horizontalement: moyennes de l'effet du régime hydrique; En gras et verticalement: moyennes de l'effet de la date de semis.

Généralement, l'interaction positive et significative entre les facteurs date de semis et génotype concerne principalement les génotypes hybrides. En effet, les graines des génotypes hybrides renferment un taux maximum de βsitostérol dans le cas du semis tardif, tandis que les génotypes population et lignées n'enregistrent pas d'effet de ce facteur. L'écart entre un semis classique et un semis tardif peut atteindre 40.9 mg/100g, soit une augmentation de 15% dans le cas du génotype Santiago II. Les mêmes tendances s'observent concernant la teneur en campestérol et stigmastérol, à l'exception du génotype All Star et du génotype Proléic 204 pour lesquels les taux respectif de campestérol et de stigmastérol ne varient pas sous l'effet du décalage de la date de semis. Enfin, les graines de tournesol présentent une teneur en Δ7stigmastérol supérieure dans le cas du semis tardif quel que soit le génotype, avec un écart maximum de 27% pour le génotype Santiago II.

1.2.3.3. Impact de la disponibilité hydrique

Le facteur régime hydrique présente un effet hautement significatif sur les teneurs en phytostérols totaux, en DMS, MS et β sitostérol (Tableau 25). Généralement, le régime hydrique conduit à 70% ETM (conduite irriguée) réprime les teneurs en phytostérols totaux des graines de tous les génotypes, à l'exception de Santiago II et All Star pour lesquels la teneur est relativement stable (Figure 34). Concernant les teneurs en β sitostérol, campestérol, stigmastérol et Δ 7stigmasténol, appartenant aux DMS, il apparaît des tendances plus variables (Tableau 27). Un apport d'irrigation en phase post-florale n'influence pas globalement la teneur des graines en ces constituants pour la majorité des génotypes, à l'exception des génotypes Proléic 204 et Ichraq. Seule la teneur en Δ 7stigmasténol est maximale en condition non irriguée pour la plupart des génotypes, excepté dans le cas du génotype All Star pour lequel la teneur en ce constituant apparaît relativement stable.

Concernant l'interaction de l'effet date de semis*régime hydrique sur la teneur en phytostérols totaux des graines de tournesol, il apparaît que la situation date de semis tardive associée au régime hydrique conduit sans apport d'irrigation, favorise l'accumulation de ces composés dans les graines. Globalement, les teneurs en phytostérols des graines des génotypes hybrides Santiago II et All Star semblent affectés majoritairement par le facteur date de semis, tandis que le facteur régime hydrique apparaît davantage discriminant dans le cas des génotypes population et lignées (Ichraq, 2603 et HA300b). Seul le génotype oléique Proléic 204 présente une variabilité de la teneur en phytostérols de ses graines reflétant l'effet de l'interaction date de semis*régime hydrique. Les teneurs en β sitostérol, campestérol, stigmastérol et Δ 7stigmasténol montrent des variations liées au génotype concerné, à l'exception du Δ 7stigmasténol dont la teneur maximale est enregistrée dans le cas d'un semis tardif en condition non irriguée quel que soit le génotype. Seul le génotype All Star apparaît relativement stable en toutes circonstances.



(Bouton floral, génotype phytostérolique, J. Roche)

2. Modification de la relation production/qualité en réponse aux conduites de culture

Les teneurs en huile et en protéines des graines sont actuellement les seuls critères de qualité rémunérés par la filière oléoprotéagineuse. La richesse en huile des graines de tournesol permet à celui-ci de se positionner parmi les huiles les plus consommées dans le monde et la teneur en protéines de son tourteau garantit son utilisation pour l'alimentation animale. La diversité de composition en acides gras ouvre également de nombreuses voies de valorisation industrielle du tournesol. Ainsi, le pourcentage de ces constituants constitue un critère essentiel dans la détermination de la qualité de composition de la graine de tournesol.

Toutefois, dans un objectif de valorisation, il convient de s'interroger sur la rentabilité de production des composés recherchés par l'industrie. Le rendement en ces constituants pourrait être déterminant pour certaines applications qui requièrent des quantités importantes en certains composés. Ces rendements dépendent de l'établissement de leurs proportions dans la graine, ainsi que du nombre de graines produites qui varient selon les conduites de culture. C'est pourquoi, cette partie se propose de faire le point sur la variabilité de rendement en huile et en protéines. Afin de rendre compte de l'accumulation des composés en fonction du développement de la graine, les résultats seront également exprimés en terme de quantités accumulées par graine. Ce calcul tient compte de la variabilité de composition et d'accumulation de matière sèche dans la graine. Il reflète le taux de remplissage des constituants d'intérêt accumulés à maturité qui est modifié en réponse aux conduites de culture et selon les géotypes. L'intérêt de cette partie est de mettre en évidence des liens éventuels entre rendement et composition de la graine à maturité.

2.1. Relation composantes du rendement/composés de la graine

Les relations globales entre composantes de productivité et composantes de qualité ont été traitées par une analyse multivariée en composantes principales (ACP). Cette analyse révèle l'existence de corrélations significatives entre variables quantitatives et qualitatives. La projection de ces objets sur un plan permet d'identifier l'importance des variables mis en jeu. L'axe 1 (f1) est principalement expliqué par la variable « teneur en C18:1 » (TC181), « teneur en C16:0 » (TC160) et « teneur en C18:0 » (TC180) d'une part et par la variable « teneur en C18:2 » (TC182) d'autre part. Les variables « teneur en huile » (TH), « rendement en graines » (RDT) et « teneur en protéines » (TP) permettent d'expliquer le second axe (f2). Le dernier axe est expliqué par la

variable « poids des graines » (P1000). L'inertie de trois axes (f1, f2, f3) explique 78% de la variabilité observée (Figure 35).

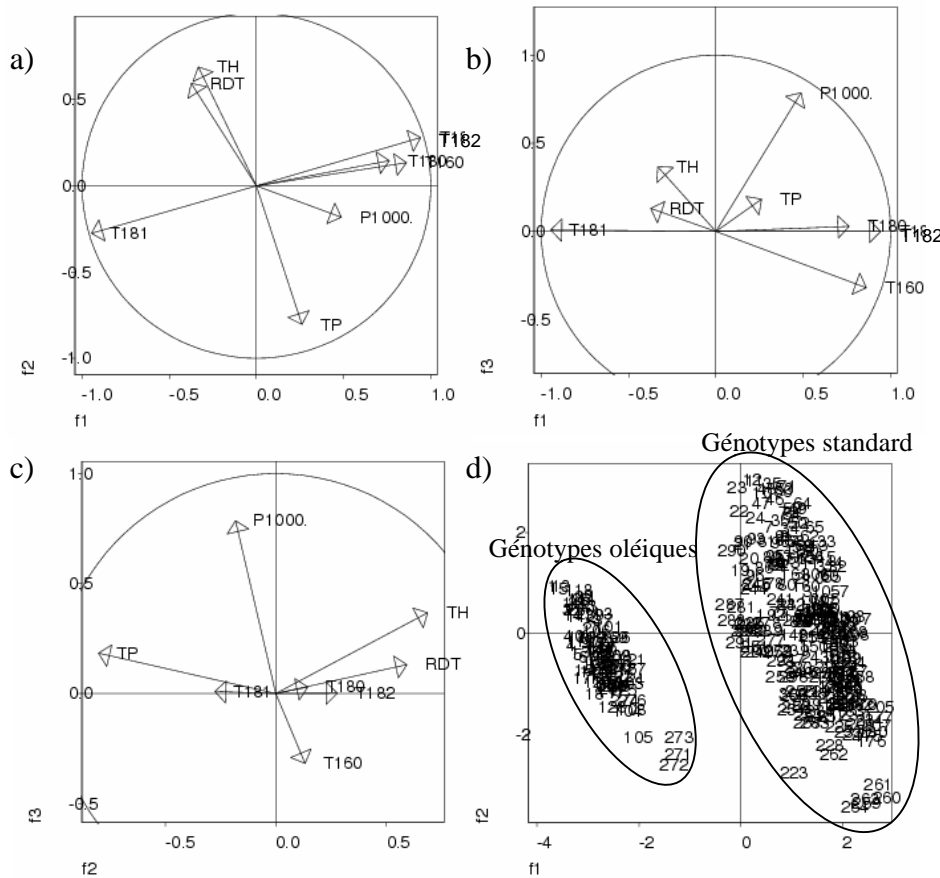


Figure 35 : Analyse en composantes principales (ACP) pour les variables teneur en huile (TH), teneur en protéines (TP), teneur en acides oléique (T181), linoléique (T182), palmitique (T160), stéarique (T180), sur le rendement-grain (RDT) et le poids d'une graine (P1000) toutes années culturales confondues

En a, b et c: cercles de corrélations selon l'axe; en d: répartition des individus

Les résultats soulignent une corrélation négative entre le pourcentage de C18:1 et le pourcentage de C18:2, de C16:0 et de C18:0. Les teneurs en C16:0 et en C18:0 sont donc corrélées positivement. Le second axe met en évidence une corrélation négative entre teneur en huile et teneur en protéines d'une part, ainsi qu'une corrélation entre teneur en huile et rendement en grains. Le poids d'une graine n'est corrélé avec aucune des variables étudiées. Les individus se répartissent selon deux populations: la teneur en C18:1 et la teneur en C18:2, C16:0 et C18:0 expliquant la variabilité de répartition des individus selon l'axe 1 crée une première sous-population correspondant aux génotypes standard et aux génotypes oléiques; la variabilité de teneur en huile, rendement en grains associé à celle de la teneur en protéines est responsable de la seconde sous-population contribuant à créer l'axe 2.

La relation productivité/qualité peut se décliner selon des caractéristiques de production en composés d'intérêt qui seront exposés par la suite. Néanmoins, la corrélation rendement en graines/teneur en huile illustre le lien pouvant exister entre un critère quantitatif et un critère qualitatif de la graine. La Figure 36 montre une corrélation positive entre ces deux variables qui ne concerne cependant pas toutes les séquences climatiques.

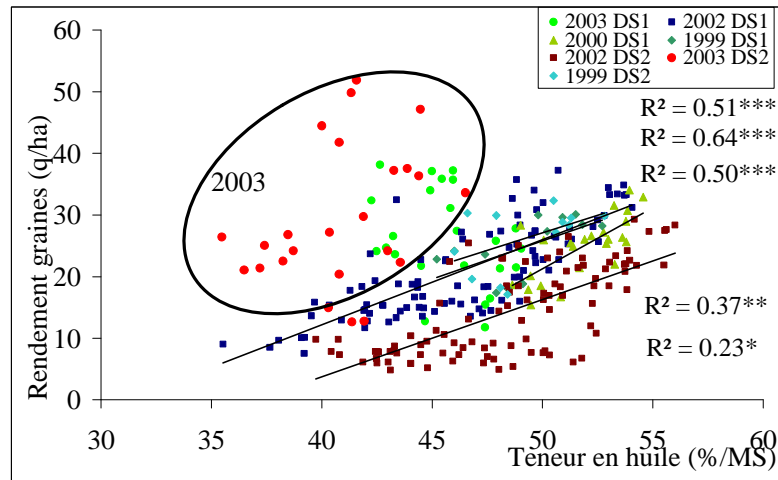


Figure 36 : Corrélation entre rendement en graines et teneur en huile pour tous les génotypes selon l'année

* significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$. q/ha: quintaux/hectare, %/MS: pourcentage par rapport à la matière sèche.

En effet, de très faibles ressources hydriques associées à des températures élevées (année 2003) illustre le découplage de ces deux paramètres.

2.2. Rendement et quantité d'huile et de protéines

Les quantités d'huile et de protéines correspondent au produit du poids d'une graine et de la teneur en huile ou en protéines. Le rendement en huile ou en protéines à l'hectare résulte du produit du rendement en graines et de la teneur en huile ou en protéines des graines. La variabilité de ces paramètres est donc conditionnée à la fois par des critères de production et des critères de composition. Les quantités d'huile et de protéines permettent de différencier la productivité de chacun des génotypes testés vis-à-vis de l'huile et des protéines.

Les hybrides standard présentent globalement les rendements et quantités d'huile et de protéines les plus élevés (Tableau 28). Les génotypes populations présentent des quantités d'huile et de protéines élevées comparativement aux génotypes oléiques. En revanche, ces derniers apparaissent plus stables si on considère toutes les séquences climatiques par rapport aux génotypes standard (Proléic 204 par rapport à Santiago II).

Tableau 28 : Effet du facteur génotype sur la quantité d'huile et de protéines accumulée par graine et sur le rendement en huile et en protéines par hectare selon l'année

Année expérimentale	1999				2000				
	Génotypes	Santiago II	Aranda	Proléic 204	Trisun 870	Santiago II	Aranda	Proléic 204	Trisun 870
Quantité d'huile (mg/graine)		31.47 a	25.62 b	22.95 c	21.09 c	28.20 a	22.86 b	20.40 c	22.16 b
Rendement en huile (q/ha)		14.51 a	15.32 a	8.75 c	12.02 b	13.82 b	16.16 a	9.04 c	12.74 b
Quantité de protéines (mg/graine)		11.03 a	7.62 c	9.57 b	6.93 c	11.52 a	7.82 c	8.83 b	8.30 bc
Rendement en protéines (q/ha)		5.08 a	4.55 b	3.64 c	3.95 c	5.64 a	5.52 a	3.90 c	4.78 b

Année expérimentale	2002				2003						
	Génotypes	Santiago II	Proléic 204	Karima	Salima	Santiago II	Proléic 204	All Star	Ichraq	2603	HA300b
Quantité d'huile (mg/graine)		28.56 a	24.99 c	25.78 b	28.69 a	21.24 b	20.39 b	26.55 a	24.57 ab	19.90 b	19.13 b
Rendement en huile (q/ha)		13.37 a	10.95 b	5.25 c	4.93 c	8.20 b	13.78 a	13.67 a	12.63 a	3.83 c	3.99 c
Quantité de protéines (mg/graine)		10.95 c	10.52 d	12.70 b	14.26 a	9.87 bc	11.36 b	12.78 a	12.82 ab	13.88 a	9.17 c
Rendement en protéines (q/ha)		5.07 a	4.61 b	2.49 c	2.37 c	3.79 b	7.74 a	6.55 a	6.62 a	2.60 bc	1.82c

Pour chaque année, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$. En gras: moyennes des génotypes présentant les valeurs les plus élevées.

L'effet de la date de semis, du facteur régime hydrique ainsi que de leur interaction sur les rendements et quantités en huile et en protéines sont représentés Tableau 29 pour un génotype standard, un génotype oléique et les génotypes population testés lors des différentes campagnes.

Tableau 29 : Effet de la date de semis (DS), du régime hydrique (RH) et de leur interaction sur le rendement à l'hectare et les quantités d'huile et de protéines par graine pour trois génotypes selon l'année

	Année	Génotypes	Santiago II		moyenne		Proléic 204		moyenne		populations		moyenne	
		DS/RH	NIRR	IRR			NIRR	IRR			NIRR	IRR		
Rendement huile (q/ha)	1999	DS1	14.55 a				8.77 a							
		DS2	14.47 a				8.73 a							
	2000	DS1	13.09 a	14.56 a			8.43 a	9.65 a						
		DS2	14.64 a	15.63 a	15.14 a	12.65 a	11.81 a	12.23 a	7.27 a	5.57 c	6.42 a			
	2002	DS1	9.83 c	13.38 b	11.61 b	9.45 b	9.89 b	9.67 b	3.29 d	4.22 b	3.76 b			
		DS2	6.18 b	11.62 a	8.90 a	11.19 b	16.08 a	13.63 a	9.39 c	13.49 b	11.44 b			
	2003	DS1	5.52 ab	9.47 b	7.49 b	9.37 b	18.47 a	13.92 a	8.06 c	19.56 a	13.81 a			
		DS2	5.85 b	10.55 a			10.28 b	17.28 a	8.73 b	16.52 a				
	moyenne	DS1	12.24 b	14.50 a			11.05 a	10.85 a	5.28 a	4.90 a				
		DS2	4.98 a			3.48 a								
Rendement protéines (q/ha)	1999	DS1	4.98 a				3.48 a							
		DS2	5.19 a				3.78 a							
	2000	DS1	5.36 a	5.93 a			3.77 a	4.03 a						
		DS2	5.52 a	5.78 a	5.65 a	5.59 a	4.60 b	5.09 a	3.28 a	2.59 b	2.94 a			
	2002	DS1	3.97 c	5.00 b	4.49 b	4.30 b	3.93 b	4.12 b	1.78 d	2.07 c	1.9 b			
		DS2	2.70 b	4.58 a	3.64 a	5.69 c	7.56 b	6.63 b	4.46 b	6.30 b	5.38 b			
	2003	DS1	2.97 b	4.93 a	3.95 a	6.48 c	11.24 a	8.86 a	5.59 b	10.14 a	7.86 a			
		DS2	2.83 b	4.75 a			6.09 b	9.40 a	5.02 b	8.22 a				
	moyenne	DS1	4.75 b	5.39 a			4.94 a	4.27 b	2.53 a	2.33 b				
		DS2	31.84 a			21.27 a								
Quantité d'huile (mg/graine)	1999	DS1	31.84 a				21.27 a							
		DS2	31.09 a				24.63 a							
	2000	DS1	27.18 a	29.22 a			20.79 a	20.00 a						
		DS2	27.87 b	26.61 b	27.24 b	25.23 a	24.80 a	25.01 a	26.22 b	24.12 b	25.17 b			
	2002	DS1	28.95 ab	30.81 a	29.88 a	24.87 a	25.04 a	25.00 a	29.53 a	29.09 a	29.31 a			
		DS2	20.90 b	26.29 a	23.60 a	19.56 c	24.91 a	22.24 a	24.15 c	29.50 a	26.83 a			
	2003	DS1	16.29 b	21.47 a	18.88 b	15.75 d	21.34 b	18.54 b	17.20 d	27.43 b	22.31 b			
		DS2	18.60 b	23.88 a			17.65 b	23.12 a	20.67 b	28.47 a				
	moyenne	DS1	28.41 a	28.71 a			25.05 a	24.92 a	27.88 a	26.60 a				
		DS2	10.89 a			8.46 a								
Quantité de protéines (mg/graine)	1999	DS1	10.89 a				8.46 a							
		DS2	11.17 a				10.67 a							
	2000	DS1	11.12 a	11.92 a			9.31 a	8.36 b						
		DS2	10.66 b	9.84 b	10.25 b	11.20 a	9.70 b	10.45 a	11.85 b	11.64 b	11.75 b			
	2002	DS1	11.77 a	11.55 a	11.66 a	11.25 a	9.92 b	10.58 a	15.96 a	14.48 a	15.22 a			
		DS2	9.17 ab	10.35 a	9.76 a	9.86 d	11.72 b	10.79 b	11.47 b	13.73 a	12.60 a			
	2003	DS1	8.74 b	11.20 a	9.97 a	10.88 c	13.00 a	11.94 a	11.90 b	14.15 a	13.03 a			
		DS2	8.96 b	10.78 a			10.37 b	12.36 a	11.69 b	13.95 a				
	moyenne	DS1	11.21 a	10.70 a			11.23 a	9.81 b	13.91 a	13.06 a				
		DS2	9.17 ab	10.35 a			9.76 a	9.86 d	10.79 b	11.47 b	12.60 a			

Pour chaque année, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$. NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. En gras et horizontalement: valeurs moyennes de l'effet du régime hydrique pour chaque génotype; en gras et verticalement: valeurs moyennes de l'effet date de semis pour chaque génotype.

Les rendements et quantités en huile et en protéines présentent une stabilité quel que soit le génotype lors des années expérimentales 1999 et 2000. Seules les conditions climatiques des années les plus contrastées en terme de température et de déficit hydrique (2002 et 2003) ont conduit à introduire un effet de la date de semis et du régime hydrique.

2.2.1. Effet date de semis

Le décalage de la date de semis a globalement entraîné une réduction du rendement en huile. Cette diminution s'observe quelles que soient les conditions de températures (-19.6%) chez l'hybride standard (Santiago II), alors que le génotype oléique (Proléic 204) demeure stable pour de fortes températures (année 2003) et le génotype Ichraq enregistre une augmentation au cours de la même séquence climatique. Concernant le rendement en protéines, le maximum est enregistré pour des températures moyennes plus élevées entre F1 et M2 (semis classique en 2002, semis tardif en 2003), à l'exception du génotype Santiago II pour lequel aucune variation n'est notée. Les quantités en huile et en protéines augmentent en réponse à des températures moyennes relativement plus fraîches entre M0 et M2 (+1.2°C entre le semis tardif et semis classique en 2002) dans le cas des génotypes standard (Santiago II et populations) (protéines: +17.4%, huile: +11.5%); alors que le génotype oléique reste stable. Dans les conditions les plus extrêmes de température et de déficit hydrique (2003), les quantités d'huile par graine diminuent sous l'effet d'un semis tardif quel que soit le génotype (-17.8%) tandis que les quantités de protéines restantes stables.

2.2.2. Effet régime hydrique

Globalement, la conduite irriguée a favorisé l'accumulation d'huile conduisant à une augmentation des critères quantitatifs calculés (rendements et quantités); avec cependant un effet significatif plus marqué pour des déficits hydriques plus sévères (année 2003). Dans ces conditions, l'apport d'irrigation a permis d'augmenter le rendement et la quantités d'huile de 44.1% et 24.4% respectivement, quel que soit le génotype. En revanche, à l'exception de l'hybride standard, les faibles écarts de déficits hydriques générés résultant des conditions climatiques de l'année 2002 ont conduit à une stabilité de ces critères sous l'effet du régime hydrique. En ce qui concerne les protéines, une augmentation des rendement et quantité a été enregistrée sous l'effet d'un apport d'irrigation lors de la campagne 2003, tandis que dans la séquence climatique de 2002, la conduite irriguée a entraîné une diminution du rendement et de la quantité de protéines pour les génotypes oléique et populations.

2.3. Rendement et quantité d'acides gras

La détermination du rendement à l'hectare et des quantités d'acides gras accumulés par graine permet d'évaluer la productivité en acides gras à l'échelle du champ selon le type de génotypes en interaction avec les itinéraires techniques pratiqués. L'objectif est de répondre concrètement à la question: quelle est la situation correspondant au meilleur compromis entre productivité et qualité? Globalement, les conditions climatiques des années 1999 et 2000 n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des pratiques culturales sur le rendement et la quantité en acides gras quel que soit le génotype. Au contraire, l'année 2003 caractérisée par des différences tant sur le plan des températures que sur celui des déficits hydriques, permet de mettre en évidence de fortes interactions génotype*conduites de culture (date de semis ou régime hydrique) d'une part; et date de semis*régime hydrique, d'autre part.



(Floraison, J. Roche)

2.3.1. Effet date de semis

La date de semis a un effet significatif sur la quantité (Tableau 30 a) et le rendement en acides gras saturés et insaturés (Tableau 30 b).

Tableau 30 : Effets des facteurs régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leur interaction (DS*RH) sur les quantités (a) et les rendements (b) en acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) selon l'année

a)	Génotypes	Santiago II			Proléic 204			populations					
		DS/RH	NIRR	IRR	moyenne	NIRR	IRR	moyenne	NIRR	IRR	moyenne		
Quantité de C16:0 (mg/graine)	1999	DS1	1.69 a			0.73 a							
		DS2	1.45 a			0.79 a							
	2000	DS1	1.35 a	1.40 a		0.69 a	0.64 a						
		DS2	1.53 a	1.46 ab	1.50 a	0.84 a	0.82 a	0.83 a	1.35 ab	1.29 b	1.31 a		
	2002	DS1	1.41 b	1.48 b	1.45 a	0.83 a	0.83 a	0.83 a	1.48 a	1.50 a	1.49 a		
		DS2											
	2003	DS1	1.19 b	1.38 a	1.29 a	0.75 c	0.95 a	0.85 a	1.32 c	1.50 a	1.41 a		
		DS2	0.97 d	1.14 c	1.06 b	0.71 c	0.83 b	0.77 b	1.06 d	1.36 b	1.21 b		
	moyenne		1.47 a	1.47 a		0.84 a	0.82 a		1.42 a	1.39 a			
	Quantité de C18:0 (mg/graine)	1999	DS1	1.20 a			0.61 a						
			DS2	1.12 a			0.66 a						
		2000	DS1	1.44 a	1.55 a		0.67 a	0.63 a					
DS2			1.24 a	1.15 b	1.19 b	0.79 a	0.70 c	0.74 a	1.17 a	1.02 b	1.10 a		
2002		DS1	1.24 a	1.31 a	1.28 a	0.73 b	0.67 c	0.70 b	1.20 a	1.11 ab	1.15 a		
		DS2											
2003		DS1	0.84 c	0.94 a	0.89 a	0.59 b	0.75 a	0.67 a	0.83 b	0.96 a	0.90 a		
		DS2	0.68 d	0.85 b	0.77 b	0.60 b	0.73 a	0.67 a	0.70 c	0.90 a	0.80 b		
moyenne		0.76 b	0.90 a		0.60 b	0.74 a		0.77 b	0.93 a				
Quantité de C18:1 (mg/graine)		1999	DS1	9.19 b			18.33 a						
			DS2	11.65 a			21.38 a						
		2000	DS1	5.87 b	6.58 a		16.54 a	16.04 a					
	DS2		6.82 b	6.71 b	6.77 b	20.68 a	20.52 a	20.60 a	7.91 ab	6.92 b	7.42 b		
	2002	DS1	9.79 a	10.29 a	10.04 a	19.76 a	20.07 a	19.92 a	8.80 a	8.81 a	8.80 a		
		DS2											
	2003	DS1	7.29 c	10.60 a	8.94 a	16.42 c	20.66 a	18.54 a	9.13 b	13.30 a	11.21 a		
		DS2	6.68 d	10.03 b	8.36 b	12.76 d	18.12 b	15.44 b	6.84 c	12.65 a	9.74 b		
	moyenne		8.31 a	8.50 a		20.22 a	20.22 a		8.35 a	7.87 a			
	Quantité de C18:2 (mg/graine)	1999	DS1	19.00 a			0.99 a						
			DS2	16.12 b			1.11 a						
		2000	DS1	17.32 a	18.42 a		1.87 a	1.70 a					
DS2			17.52 a	16.60 ab	17.06 a	2.15 b	1.98 b	2.07 b	15.06 b	14.19 b	14.63 b		
2002		DS1	15.71 b	16.85 b	16.28 a	2.78 a	2.67 a	2.73 a	17.17 a	16.80 a	16.98 a		
		DS2											
2003		DS1	11.02 b	12.70 a	11.86 a	1.24 b	1.82 a	1.53 a	12.20 a	12.96 a	12.58 a		
		DS2	7.56 d	8.92 c	8.24 b	1.21 ab	1.07 b	1.14 b	8.20 b	11.92 a	10.06 b		
moyenne		9.29 b	10.81 a		1.22 a	1.45 a		10.20 b	12.44 a				

b)	Génotypes	Santiago II			Proléic 204			populations			
		DS/RH	NIRR	IRR	moyenne	NIRR	IRR	moyenne	NIRR	IRR	moyenne
Rendement en C16:0 (q/ha)	1999	DS1	0.77 a			0.30 a					
		DS2	0.68 a			0.28 a					
	2000	DS1	0.65 a	0.70 a		0.28 a	0.31 a				
		DS2	0.80 a	0.86 a	0.83 a	0.42 a	0.39 a	0.40 a	0.37 a	0.30 b	0.34 a
	2002	DS1	0.48 c	0.64 b	0.56 b	0.32 b	0.33 b	0.32 b	0.17 d	0.22 c	0.19 b
		DS2									
	moyenne		0.64 b	0.75 a		0.37 a	0.36 a		0.27 a	0.26 a	
	2003	DS1	0.35 c	0.61 a	0.48 a	0.43 a	0.61 b	0.52 a	0.52 c	0.69 b	0.60 b
		DS2	0.33 c	0.51 b	0.42 b	0.42 a	0.71 b	0.57 a	0.49 c	0.97 a	0.73 a
	moyenne		0.34 b	0.56 a		0.43 b	0.66 a		0.56 b	0.83 a	
Rendement en C18:0 (q/ha)	1999	DS1	0.55 a			0.25 a					
		DS2	0.52 a			0.23 a					
	2000	DS1	0.70 a	0.77 a		0.27 a	0.30 a				
		DS2	0.65 a	0.67 a	0.66 a	0.40 a	0.33 b	0.36 a	0.33 a	0.23 b	0.28 a
	2002	DS1	0.42 c	0.57 b	0.50 b	0.28 c	0.27 c	0.27 b	0.13 c	0.16 c	0.15 b
		DS2									
	moyenne		0.54 b	0.62 a		0.34 a	0.30 a		0.23 a	0.20 a	
	2003	DS1	0.25 b	0.42 a	0.33 a	0.34 c	0.49 b	0.41 b	0.32 c	0.44 b	0.38 b
		DS2	0.23 b	0.38 a	0.31 a	0.36 c	0.63 a	0.50 a	0.33 c	0.65 a	0.49 a
	moyenne		0.24 b	0.40 a		0.35 b	0.56 a		0.33 b	0.54 a	
Rendement en C18:1 (q/ha)	1999	DS1	4.19 b			7.56 a					
		DS2	5.41 a			7.57 a					
	2000	DS1	2.83 a	3.28 a		6.70 a	7.75 a				
		DS2	3.58 b	3.95 b	3.76 a	10.37 a	9.78 a	10.08 a	2.18 a	1.57 b	1.88 a
	2002	DS1	3.33 b	4.48 a	3.91 a	7.51 b	7.92 b	7.72 b	0.97 d	1.28 c	1.13 b
		DS2									
	moyenne		3.46 b	4.22 a		8.94 a	8.85 a		1.58 a	1.43 a	
	2003	DS1	2.18 a	1.45 b	1.82 a	9.39 b	13.33 a	11.36 a	3.55 c	6.08 b	4.82 b
		DS2	1.15 c	0.96 c	1.05 b	7.59 b	15.70 a	11.64 a	3.21 c	9.05 a	6.13 a
	moyenne		1.67 b	1.20 a		8.49 b	14.51 a		3.38 b	7.57 a	
Rendement en C18:2 (q/ha)	1999	DS1	8.69 a			0.41 a					
		DS2	7.51 a			0.40 a					
	2000	DS1	8.34 a	9.17 a		0.76 a	0.81 a				
		DS2	9.22 a	9.75 a	9.48 a	1.07 a	0.94 a	1.01 a	4.18 a	3.31 b	3.75 a
	2002	DS1	5.33 c	7.31 b	6.32 b	1.06 a	1.07 a	1.06 a	1.93 d	2.43 c	2.18 b
		DS2									
	moyenne		7.27 b	8.53 a		1.06 a	1.01 a		3.06 a	2.87 a	
	2003	DS1	3.26 c	5.61 a	4.44 a	0.70 b	1.18 a	0.94 a	4.74 b	5.93 b	5.33 a
		DS2	2.56 c	3.93 b	3.25 b	0.72 ab	0.92 a	0.82 a	3.85 b	8.46 a	6.15 a
	moyenne		2.91 b	4.77 a		0.71 b	1.05 a		4.30 b	7.19 a	

Pour chaque année, les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$. NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. En gras et horizontalement: valeurs moyennes de l'effet du régime hydrique pour chaque génotype; en gras et verticalement: valeurs moyennes de l'effet de la date de semis pour chaque génotype.

Les variations induites par la date de semis dépendent du génotype concerné, du type d'acide gras et de l'interaction des températures avec la disponibilité hydrique. Les fortes températures (24.2-27.3°C entre F1 et M2) (semis tardif 2003) a entraîné une réduction généralisée de la quantité d'acides gras saturés (C16:0 et C18:0) et insaturés (C18:1 et C18:2) quel que soit le génotype. Cependant, les variations de ces quantités diffèrent selon le génotype lorsque les conditions de

température s'avèrent moins contrastées (2002). Ainsi, dans le cas de l'hybride standard Santiago II, les températures relativement plus élevées enregistrées dans le cas du semis classique (20.3-20.2°C C entre F1 et M2) par rapport au semis tardif (20.5-19.1°C) (année 2002) ont entraîné une réduction des quantités de C18:0 et de C18:1 accumulées dans les graines récoltées. Ces mêmes conditions de températures ont eu un effet dépressif sur la quantité de C18:2 des graines du génotype oléique (Proléic 204) et des populations.

Les rendements en acides gras saturés sont globalement maximum dans le cas du semis classique, à l'exception du génotype population Ichraq (année 2003) et du génotype oléique dans le cas du C18:0 dont le rendement varie inversement du fait de la forte interaction avec le facteur régime hydrique. Le rendement en acides gras insaturés présente des interactions spécifiques à chaque génotype (standard, oléique, population) selon les séquences climatiques. Globalement, le rendement en C18:1 chez les génotypes standard diminue lorsque les températures moyennes entre F1 et M0 sont les plus chaudes (semis classique en 2002 et semis tardif en 2003). La stabilité des températures enregistrées associées à de plus faibles déficits hydriques (semis tardif par rapport au semis classique en 1999), conduit au rendement maximum en C18:1 dans le cas de l'hybride standard. Seul le génotype Ichraq affiche une augmentation de ce rendement pour les températures les plus fortes (semis tardif en 2003) principalement du à la forte interaction date de semis*régime hydrique irrigué. Contrairement aux génotypes standard, le génotype oléique est relativement stable vis-à-vis du décalage de la date de semis, produisant un maximum de rendement en semis classique dans le cas de températures constantes entre date de semis (20.3°C entre F1 et M0 en moyenne), voire légèrement plus chaudes (20.2°C à 19.1°C en semis tardif entre M0 et M2). Mais globalement, c'est dans le cas de la plus forte hausse de températures (semis tardif année 2003) que Proléic 204 présente les meilleurs niveaux de rendement en C18:1 (14.5q/ha), en raison de l'augmentation du pourcentage en C18:1 sous l'effet des fortes températures enregistrées au cours de cette année. Concernant le rendement en C18:2, le génotype oléique se caractérise par une forte stabilité alors que globalement, pour les autres génotypes standard, le semis classique favorise sa production.

2.3.2. Effet régime hydrique

Le facteur régime hydrique a également influé sur la variabilité de quantités et rendement en acides gras. L'effet de déficits hydriques sévères (niveau 5, < à -70mm entre F1-M0 en 2003) caractéristiques de l'année 2003 a pour conséquence la réduction des quantités et des rendements en acides gras chez l'hybride standard. Une diminution de rendement intervient également à de plus

faibles déficits (-50 mm entre F1-M0, en 2002) pour tous les acides gras, alors que des déficits hydriques quasi nuls (-2mm en 2000 entre F1-M0) ne modifient pas ses potentialités. Ceci reflète une forte sensibilité du potentiel de production en acides gras de ce génotype (Santiago II) vis-à-vis de la disponibilité hydrique. Il en est de même pour le génotype Ichraq en 2003 dont les rendements et quantités sont largement déprimées lorsque celui est soumis à de forts déficits. Des rendements et quantités accumulées constants, à l'exception de la quantité de C18:0, caractérisent le génotype oléique pour des déficits hydriques < à -70mm entre F1 et M0, seuil au-delà duquel ce génotype se comporte comme les génotypes standard et observe une réduction en condition non irriguée.



(Régime hydrique irrigué (à gauche) et non irrigué (à droite), J. Roche)

3. Modifications des équilibres biochimiques entre composés de la graine en réponse aux conduites de culture

3.1. Relation fraction lipidique/fraction protéique

Globalement, la relation huile/protéines (teneur en %/MS ou quantité en mg/graine) se caractérise par une corrélation négative significative toutes conduites culturales et génotypes confondus (Figure 37).

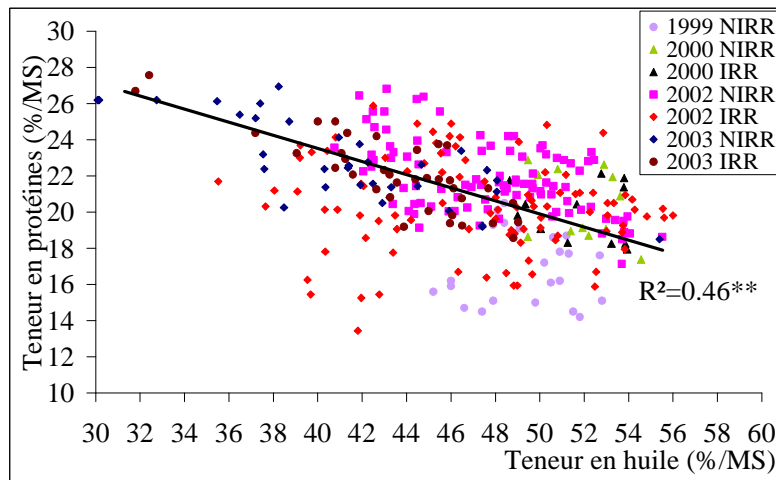


Figure 37 : Corrélation entre teneur en protéines et teneur en huile (%/matière sèche) selon l'année tous génotypes confondus

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$.

Néanmoins, dans le cas particulier des hybrides standard (Santiago II) et oléique (Proléic 204), cette corrélation varie selon le génotype et apparaît significative dans le cas du génotype oléique (Figure 38).

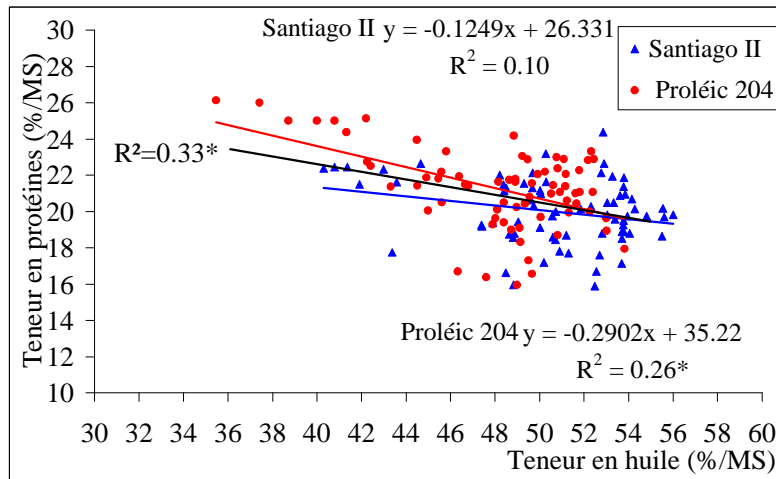


Figure 38 : Corrélation entre teneur en protéines et teneur en huile (%/matière sèche) selon l'année culturale pour l'hybride standard (Santiago II) et l'hybride oléique (Proléic 204) pour toutes les années

* significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$.

Ainsi, celui-ci présente la plus forte teneur en protéines (26%) tandis que le génotype standard possède la teneur en huile la plus élevée (56%). Les niveaux respectifs de teneurs en protéines et en huile pouvant être atteints se distinguent donc selon le potentiel génétique et la relation établie entre la teneur en huile et en protéines n'est pas généralisable si on considère l'effet génotype. Les conduites de culture ne modifient pas la corrélation mais permettent d'élargir l'amplitude de variation. L'effet date de semis sur l'établissement de l'équilibre huile/protéines est représentée Figure 39 a et b et révèle l'impact de la température et du déficit hydrique sur la mise en place de cet équilibre.

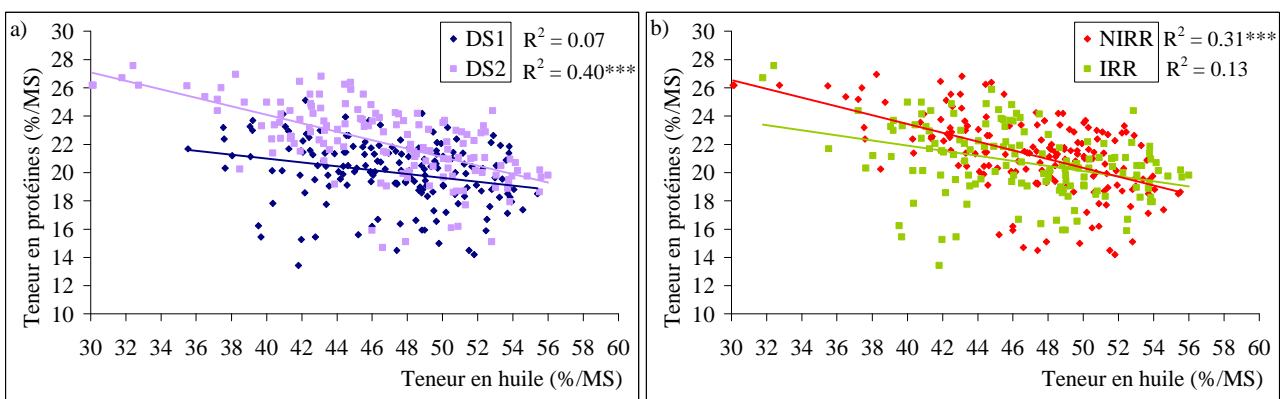


Figure 39 : Corrélation entre teneur en protéines et teneur en huile (%/matière sèche) pour tous les génotypes testés en 1999, 2000, 2002 et 2003 en fonction de la date de semis (a) et du régime hydrique (b)

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$.

Il apparaît que les conduites de culture « date de semis tardive et régime non irrigué » permettent de conserver la corrélation positive observée entre huile et protéines contrairement aux cas du semis

classique et du régime irrigué. Les génotypes standard hybrides (Santiago II) et population (Ichraq) et le génotype oléique (Proléc 204) testés lors de la campagne 2003, se comportent même de façon distincte selon les itinéraires techniques. Ceci se traduit par une diminution de la teneur en huile et une augmentation de la teneur en protéines en conditions de forts déficits hydriques associées à l'élévation de la température moyenne entre la floraison et la fin du remplissage de la graine (F1-M0 et M0-M2) (Figure 40).

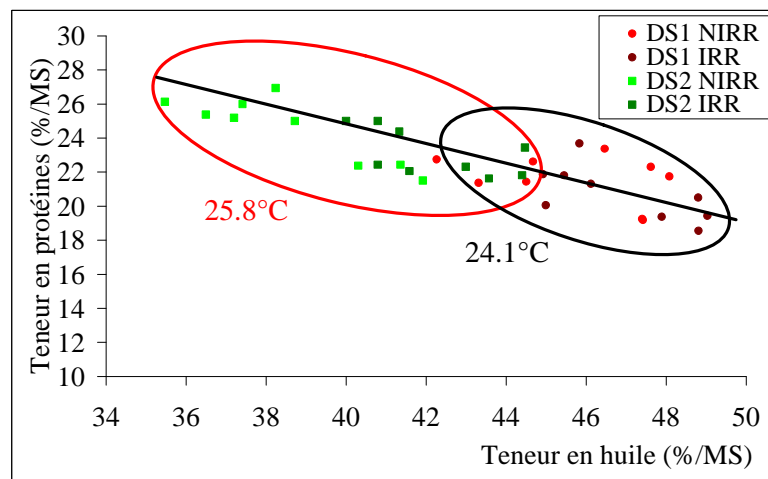


Figure 40 : Corrélation entre teneur en huile et teneur en protéines (%/matière sèche) en fonction des conduites de culture lors de la campagne 2003 chez les génotypes standard (Santiago II), oléique (Proléc 204) et population (Ichraq)

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. 25.8°C et 24.1°C: températures moyennes enregistrées entre le début de la floraison et la fin de remplissage des graines (entre les stades F1 et M2) pour les deux dates de semis en 2003.

Les modes d'accumulation d'huile et de protéines sont distincts. La majeure partie des protéines est accumulée durant les premiers stades de remplissage de la graine. Alors que l'accumulation rapide de l'huile commence 7 ou 14 jours après la floraison pour atteindre un maximum quelques jours avant la maturité physiologique (Goffner *et al.*, 1988). Il est donc possible que l'accumulation continue de l'huile ait un effet de dilution des protéines. Cette asynchronie d'accumulation pourrait expliquer la relation inverse observée entre les teneurs en huile et en protéines dans la graine. De plus, le rapport huile/protéines est sous contrôle hormonal en situation de stress intense. Sur un autre oléagineux, le soja, le taux d'ABA produit naturellement dans les cellules est maximum au moment de la synthèse des protéines et diminue pendant la synthèse des lipides. Des études menées sur cotylédons isolés de soja (Ackerson, 1984) et de tournesol (Goffner *et al.*, 1988) montre que l'apport exogène d'ABA induit une réorientation du saccharose marqué radioactivement destinés à la synthèse des lipides vers celle des protéines. Cette hormone synthétisée au niveau des feuilles des plantes stressées, serait transférée à la graine, contribuant à modifier l'équilibre final en diminuant le rapport huile/protéine.

3.2. Relation entre acides gras

Le ratio entre les différents teneurs en acides gras caractérise les équilibres biochimiques établis lors de l'élaboration de la qualité finale de la graine. D'une part, le ratio entre acides gras insaturés majoritaires (C18:1/C18:2) traduit l'activité de l'enzyme responsable de l'introduction de l'insaturation caractéristique du C18:2 (?12 désaturase). Nos résultats montrent que cette corrélation négative est très hautement significative et constante quelles que soient les conduites de culture (Figure 41). Néanmoins, ce ratio est déplacé selon les variables culturales et les génotypes.

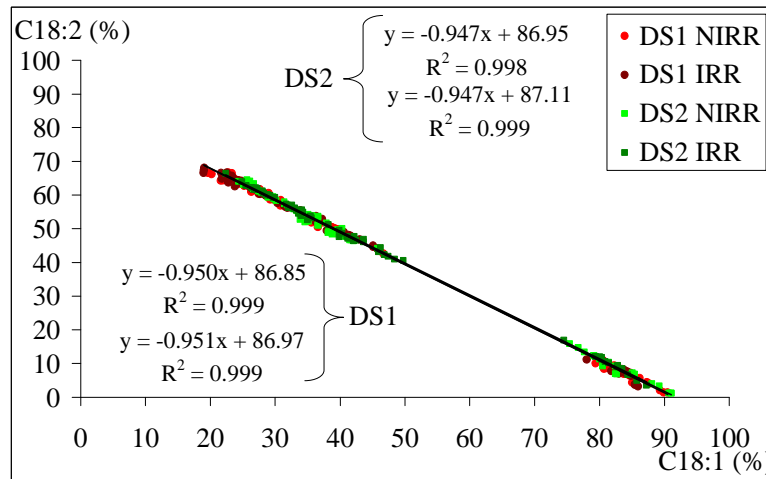


Figure 41 : Corrélation entre teneurs en acides oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) en fonction des conduites de culture tous génotypes confondus testés en 1999, 2000, 2002 et 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$.

D'autre part, la relation entre acides gras saturés et insaturés illustre le lien de biosynthèse qui existe entre ces composés et détermine les équilibres entre acides gras à maturité résultant de l'effet des conditions de culture sur la physiologie de la plante. Il n'apparaît aucune corrélation significative entre C18:0 et C18:1 et entre C18:0 et C18:2. La conduite de culture ne permet pas de différencier cet équilibre et il reste inchangé quelle que soit l'année culturale. En revanche, la corrélation significative et négative entre C16:0 et C18:1 diffère selon l'année culturale reflétant l'effet de fortes températures sur l'établissement de cet équilibre final. Des températures moyennes supérieures à 23°C entre la floraison et la fin de remplissage des graines (F1 et M2), modifient le ratio C16:0/acides gras insaturés (Figure 42).

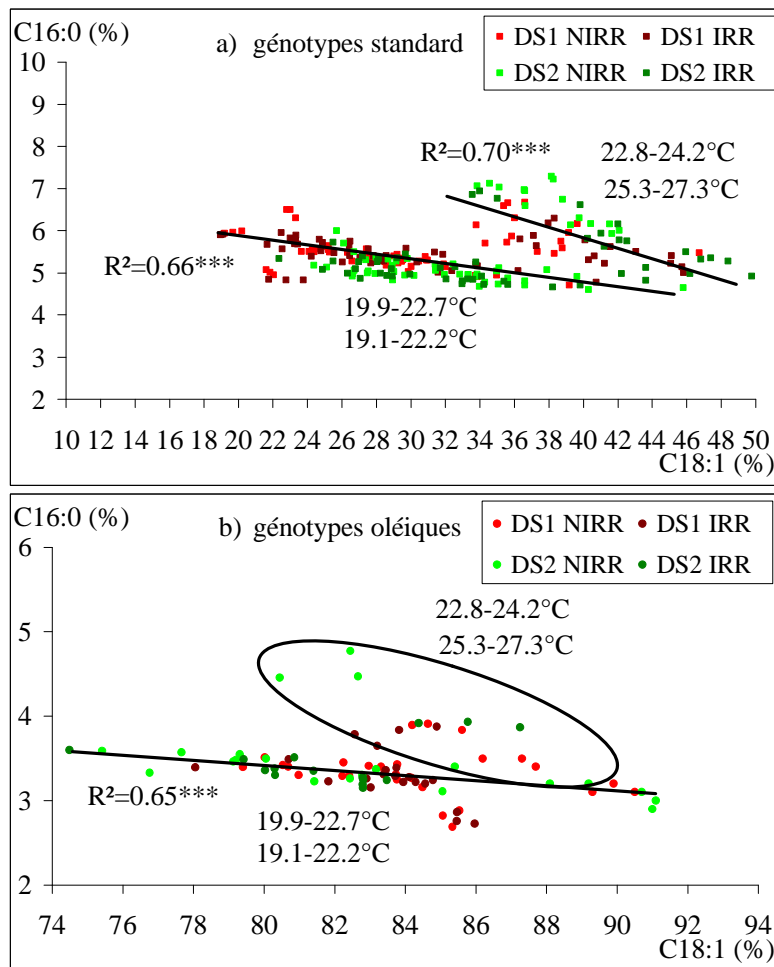


Figure 42 : Corrélation entre teneurs en acides oléique (C18:1) et palmitique (C16:0) en fonction des conduites de culture pour les génotypes standard (a) et oléiques (b) testés en 1999, 2000, 2002 et 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$. 22.8-24.2°C: températures entre F1 et M0 en 2003 quelle que soit la date de semis; 25.3-27.3°C: températures entre M0 et M2 en 2003 quelle que soit la date de semis; 19.9-22.7°C: écart de températures le plus large entre F1 et M0 pour les années 1999, 2000 et 2002 quelle que soit la date de semis; 19.1-22.2°C: écart de températures le plus large entre M0 et M2 pour les années 1999, 2000 et 2002 quelle que soit la date de semis.

Concernant l'équilibre entre acides gras saturés, seules les conditions de l'année 2003 permet d'établir une corrélation positive entre le C16:0 et le C18:0 ($R^2=0.83$ et 0.55 pour les génotypes oléiques et standard respectivement). Le C16:0 et le C18:0 constituent les seuls précurseurs de biosynthèse des acides gras conduisant aux acides gras insaturés, qui entrent dans la composition finale de la graine. La corrélation négative mise en évidence entre le C16:0 et les acides gras insaturés démontre sa position déterminante dans la fourniture des assimilats carbonés destinés à la synthèse des acides gras insaturés. En outre, nos résultats mettent en évidence une modification de l'équilibre C16:0/C18:1 sous l'effet de fortes températures (année 2003) (pente de la droite plus forte). La transformation de C16:0 en C18:1 est accentuée dans ces conditions et ceci se traduit par une amplitude de variation des teneurs en C16:0 plus importante pour un même niveau de C18:1.

3.3. Relation huile/phytostérols

Dans l'objectif de valoriser les composés de la fraction insaponifiable de l'huile, l'impact des conduites de culture sur le rapport huile/phytostérols constitue un paramètre important à déterminer. Une corrélation négative et significative entre teneur en huile et teneur en phytostérols est mise en évidence dans le cas du semis classique de la campagne 2003 (Figure 43).

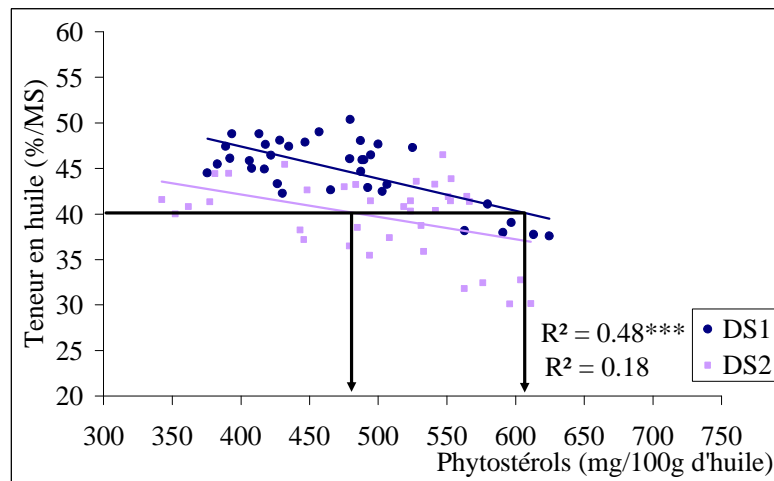


Figure 43 : Corrélation entre la teneur en huile (%/matière sèche) et la teneur en phytostérols totaux en fonction de la date de semis pour tous les génotypes testés en 2003

DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$.

Bien que non significatif, une tendance semblable s'observe dans le cas du semis tardif. Cette corrélation montre que pour un même niveau d'huile (par exemple, 40%), le décalage de la date de semis permet de modifier la concentration en phytostérols en (610 et 480 mg/100g d'huile pour la date de semis classique et la date de semis tardive respectivement); et inversement, pour un même niveau de phytostérols (600mg de phytostérols/100g d'huile par exemple), la date de semis classique permet d'obtenir 3 points d'huile en plus par rapport à la date de semis tardive (40 et 37% pour la date de semis classique et la date de semis tardive respectivement).

3.4. Relations entre phytostérols

Plusieurs corrélations positives existent entre types de phytostérols selon les variables culturales. De fortes corrélations ($r=0.7$) apparaissent quelle que soit la situation (Tableau 31) entre:

- DMS ($\Delta 7$ stigmastérol et $\Delta 7$ avénastérol, $\Delta 7$ avénastérol et β sitostérol, campestérol et β sitostérol),
- DiMS (méthylèncycloartanol et cycloarténo),
- MS (citrostadiéno et gramistérol),
- MS et DMS (citrostadiéno et $\Delta 7$ stigmastérol).

Tableau 31 : Coefficients de corrélations significatives et positives entre phytostérols au cours de la campagne 2003

	β sitostérol	$\Delta 7$ stigmastérol	Stigmastérol	Citrostadiéno	Méthylèncycloartanol
Campestérol	0.81***				0.61***
$\Delta 7$ stigmastérol	<i>0.77***</i>		<u>0.65***</u>	0.79***	
$\Delta 7$ avénastérol	<i>0.67***</i>	0.77***			
Cycloarténo					0.72***
Citrostadiéno	<i>0.71***</i>				0.53***
Gramistérol		<i>0.67***</i>		0.80***	

En gras: corrélations supérieures à $r=0.7$ quelle que soit la condition culturale; en souligné: corrélations significatives uniquement en DS2; en italique: corrélations significatives dans toutes les situations à l'exception de DS2 NIR

* significatif pour $p<0.05$, ** significatif pour $p<0.01$, *** significatif pour $p<0.001$.

Ces corrélations hautement significatives représentent les équilibres s'établissant entre phytostérols dont certains sont les produits de transformation des autres. Ces réactions de transformation sont catalysées par des enzymes spécifiques du métabolisme des stérols, les stérols méthyl transférases (SMT), permettant la méthylation des stérols tout au long de la chaîne de biosynthèse (Figure 44).

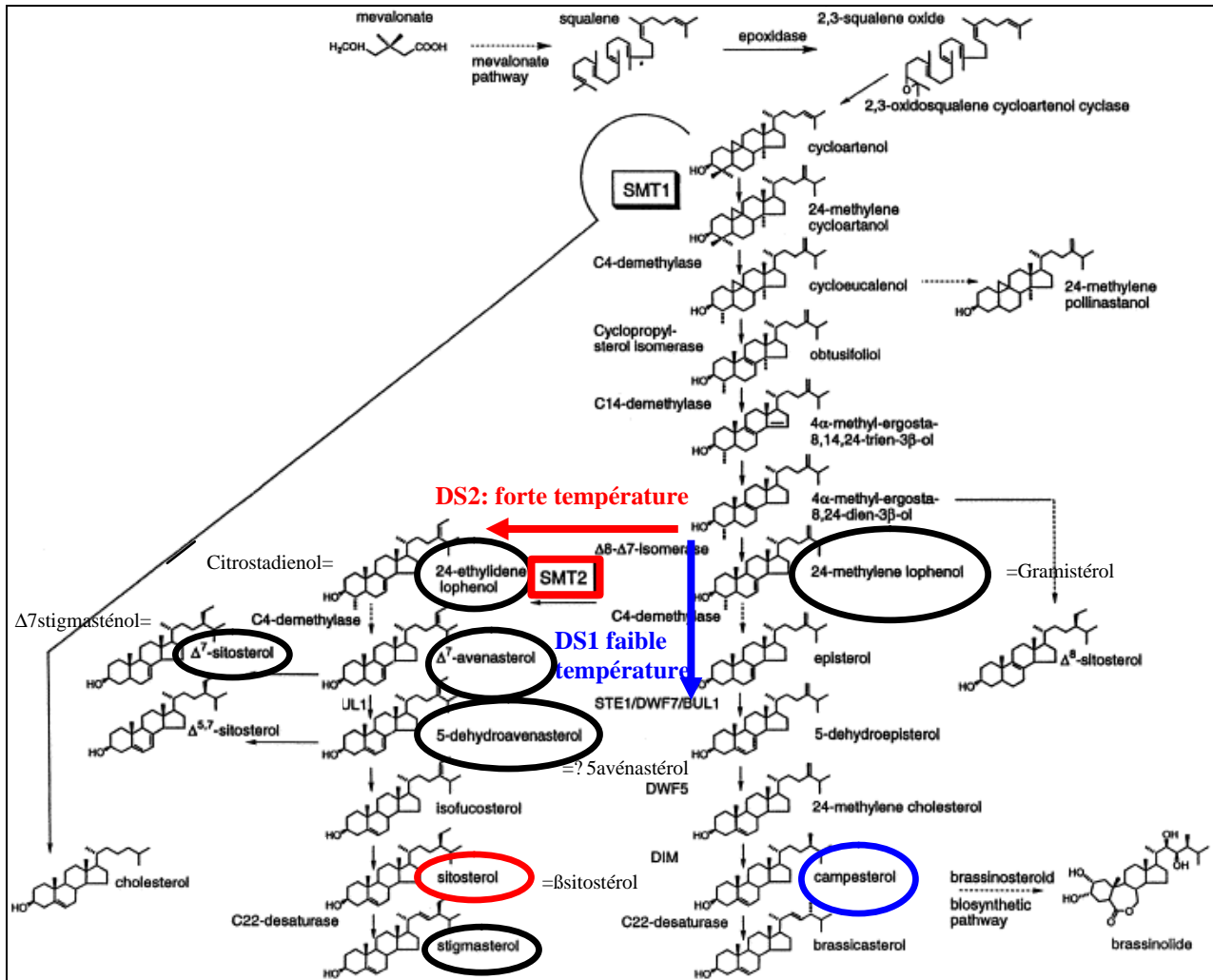


Figure 44 : Voie de biosynthèse des stérols des plantes supérieures (Source: Schaller, 2003)

D'autres corrélations positives apparaissent significatives uniquement dans certaines conditions culturales: en condition irriguée (stigmastérol et $\Delta 7$ stigmasténole), dans le cas de semis tardif (citrastadiénole et méthylène cycloartanol, 0.53^{***}) ou encore en semis tardif associé à la condition non irriguée (gramistérol et $\Delta 7$ stigmasténole, citrostadiénole et β sitostérol, $\Delta 7$ stigmasténole et β sitostérol). Ces corrélations reflètent également les équilibres biochimiques qui se mettent en place tout au long de la chaîne de biosynthèse, mais pour lesquels les conduites de culture ont modifié l'accumulation des phytostérols dans la graine mature. En effet, une étude menée sur des mutants d'*Arabidopsis Thaliana* dont le profil stérolique a été modifié, suggère que l'activité de l'enzyme stérol méthyl transférase 2 (SMT2) responsable de la méthylation du gramistérol, régit le ratio β sitostérol/campestérol, correspondant aux produits finaux de la voie de biosynthèse des stérols majoritairement accumulés en fin de remplissage de la graine (Shaller *et al.*, 2003). La Figure 45 a et b représentent la relation existant entre β sitostérol/campestérol en fonction des conduites de culture.

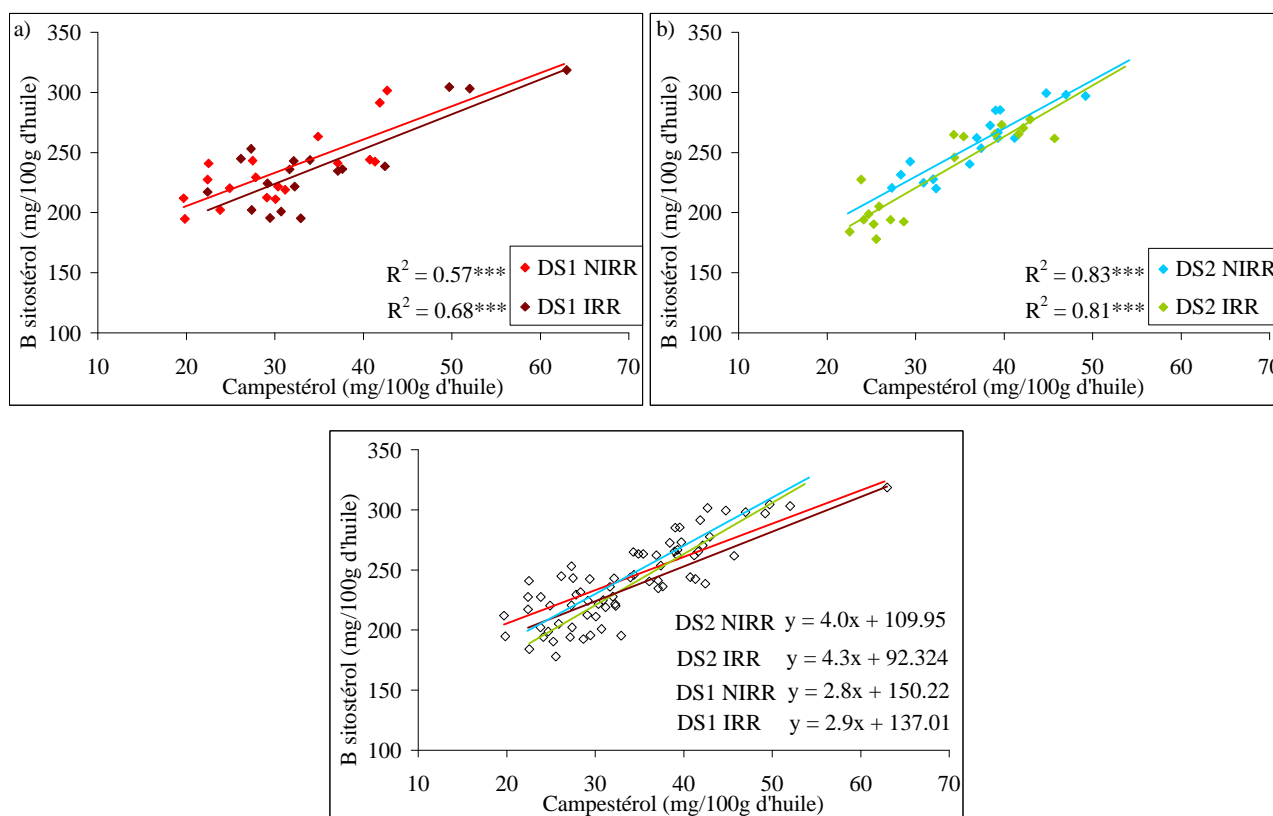


Figure 45 : Corrélation entre teneur en β sitostérol et campestérol a) dans les cas de la date de semis classique (a) et dans le cas de la date de semis tardive (b) et comparaison des pentes des droites de régression entre DS1 et DS2 (c)

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$.

Il en ressort une corrélation positive hautement significative entre ces constituants quelle que soit la situation. De plus, la corrélation est plus forte en semis tardif ($r^2=0.82$) par rapport au semis classique ($r^2=0.63$). Il apparaît également un parallélisme des droites de régression (Figure 45 c) mettant en évidence des variations similaires entre régimes hydriques pour les deux dates de semis. Cependant, la pente de la droite de régression de DS2 (~ 4) atteint une valeur presque 2 fois plus forte que celle de DS1 (~ 2.5), correspondant à un accroissement plus important du ratio β sitostérol/campestérol dans le cas du semis tardif. Il est donc possible que l'activité de la SMT2, responsable de ces variations, soit modifiée sous l'effet de fortes températures et expliquent l'augmentation de β sitostérol et de campestérol observée dans nos conditions expérimentales (semis tardif). En conséquence, il semble que des conditions de fortes températures pendant la phase de formation et maturation des graines permettent de favoriser la production de β sitostérol, bien que la corrélation positive entre ce dernier et le campestérol implique également que ces conditions soient aussi favorables à l'accumulation de campestérol.

4. Synthèse et discussion sur le rôle des facteurs agri-environnementaux sur la composition de la graine

4.1. Huile et protéines

4.1.1. Influence des températures en phase post-florale

L'influence des températures en phase post-florale a été étudiée par le biais du décalage de la date de semis. Cette pratique a permis d'obtenir une large gamme de températures différant de 5.1°C entre le début de floraison (F1) et le début de maturation des graines (M0) et 8.2°C entre M0 et fin de maturation des graines (M2). Dans nos conditions expérimentales, au delà de 20°C, l'élévation de température pénalise la teneur (Figure 46 a et b) et le rendement en huile.

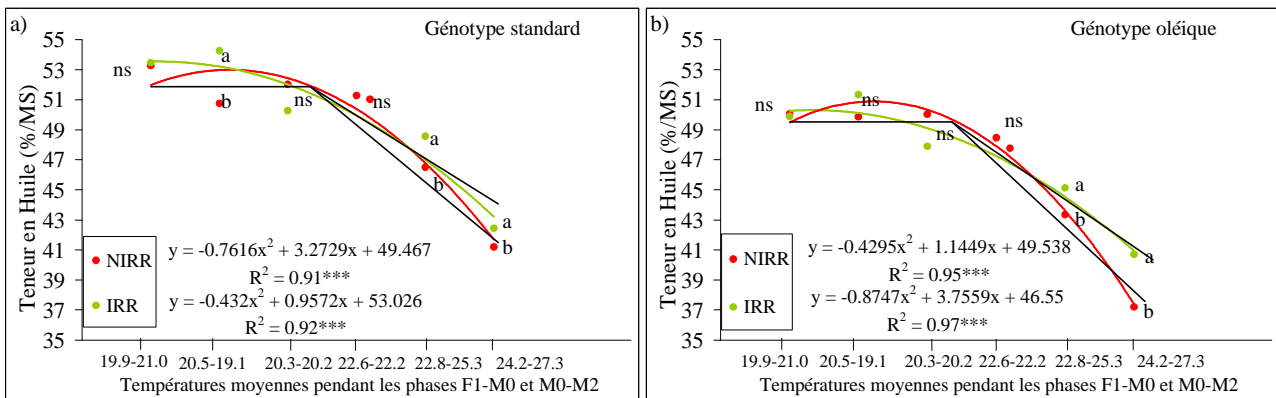


Figure 46 : Teneur en huile en fonction des températures moyennes entre F1-M0 et M0-M2 pour le génotype standard (a) (Santiago II) et le génotype oléique (Proléic 204) (b)

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. F1: début floraison, M0: début de maturation des graines, M2: fin de maturation des graines. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$. Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha = 5\%$, ns: non significatif.

Ces données sont en accord avec celles d'autres études (Gimeno *et al.*, 1989; D'Amato et Giordano, 1992; Sarno *et al.*, 1992; Flagella *et al.*, 2002), qui précisent que la teneur en huile, comme le rendement en graines, est améliorée dans le cas de semis précoces. Ce bénéfice peut s'expliquer par la durée du cycle qui augmente quelle que soit l'année culturale en réponse à une baisse de températures le plus souvent caractéristique de la date de semis précoce. Ainsi dans le cas de semis tardifs et des températures plus élevées, la teneur en huile diminue en raison d'une diminution de la phase consacrée à la synthèse lipidique. Cependant, dans nos conditions expérimentales, les mêmes réductions dans la durée du cycle s'observent sous l'effet du décalage de la date de semis alors que le rendement en huile et la teneur en huile ne varient pas (1999). Dans ce cas, la stabilité des températures durant la phase d'accumulation de la fraction lipidique (22°C) suffit à accumuler une

teneur en huile maximum. Certains auteurs suggèrent que le rapport coque/amande pourrait être à l'origine des variations de teneur en huile engendrées par de fortes températures (De la Vega *et al.*, 2002b). Ainsi, la réduction de la durée de remplissage des graines observée lorsque le semis est retardé, conduirait à diminuer le taux d'accumulation d'huile dans l'amande en raison d'une augmentation de la proportion de coque. Les conditions très contrastées de températures caractéristiques de l'année 2003 ont permis de tester cette hypothèse. Il en ressort que le facteur date de semis n'a pas d'impact sur la proportion de coque, à l'exception du génotype oléique du fait de la forte interaction date de semis*régime hydrique caractéristique de ce génotype (Tableau 32).

Tableau 32 : Effets du facteur régime hydrique (RH), de la date de semis (DS) et de leur interaction (DS*RH) sur la proportion de coque (%) dans les graines des génotypes testés lors de la campagne 2003

Génotypes DS/RH	Santiago II			Proléic 204			Ichraq		
	NIRR	IRR	moyenne	NIRR	IRR	moyenne	NIRR	IRR	moyenne
DS1	27.32 a	27.00 a	27.16 a	26.58 b	25.75 b	26.16 b	24.85 a	25.99 a	25.42 a
DS2	27.16 a	27.76 a	27.46 a	30.46 a	28.07 ab	29.27 a	27.74 a	25.33 a	26.54 a
moyenne	27.24 a	27.39 a		28.52 a	26.91 a		26.29 a	25.66 a	

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$. Les valeurs issues de l'interaction DS*RH possédant la même lettre ne sont pas différents au seuil de $\alpha=5\%$. En gras et horizontalement: valeurs moyennes de l'effet du régime hydrique pour chaque génotype; en gras et verticalement: valeurs moyennes de l'effet de la date de semis pour chaque génotype.

Ainsi, la réduction du pourcentage d'huile observée sous l'effet de fortes températures (semis tardif 2003) s'explique par la faible quantité d'huile accumulée dans l'amande indépendamment de l'établissement du ratio coque/amande.

Il faut noter que l'effet de la date de semis correspond aux effets cumulés des températures moyennes et des quantités de rayonnement incident reçues qui diffèrent entre années culturales. D'après Aguirrezabal *et al.* (2003), le rayonnement global influence également la teneur en huile. Durant la campagne 2002, la teneur en huile maximale a été obtenue dans le cas du semis tardif pour lequel la moyenne du rayonnement perçu par le couvert est la plus faible par rapport au semis classique, alors qu'on observe la situation inverse lors de la campagne 2003 (maximum de teneur en huile dans le cas du semis classique, pour un rayonnement global moyen plus fort par rapport au semis tardif). Ces données montrent que le rayonnement global n'a pas constitué un facteur limitant à l'accumulation d'huile dans nos conditions expérimentales.

Concernant la variabilité des protéines, l'effet de fortes températures, a entraîné une hausse de la teneur en protéines dans les conditions de températures les plus marquées (2003). A l'inverse de la fraction lipidique, le pourcentage de protéines contenues dans la matière sèche augmente à partir de

environ 20°C dans nos conditions expérimentales (exemples de Santiago II et Proléic 204: Figure 47 a et b).

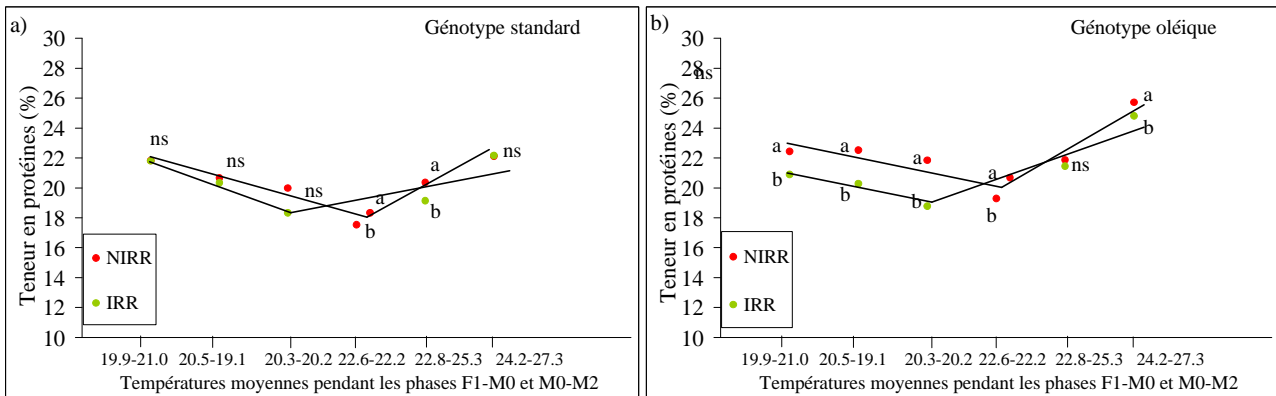


Figure 47 : Teneur en protéines en fonction des températures moyennes entre F1-M0 et M0-M2 pour le géotype standard (a) (Santiago II) et le géotype oléique (Proléic 204) (b)

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. F1: début floraison, M0: début de maturation des graines, M2: fin de maturation des graines. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$. Les valeurs moyennes possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha = 5\%$, ns: non significatif.

Ces variations confirment la relation inverse existant entre la proportion de protéines et celle consacrée aux réserves lipidiques. Concernant le niveau de production de protéines (quantités par graine et rendement à l'hectare), cet effet de la température est dilué par celui sur le rendement en graines qui diminue en réponse à la hausse de température. Ainsi, le rendement en protéines est maximal pour les températures les plus fraîches (20°C en 2002).

4.1.2. Influence de la disponibilité hydrique en phase post-florale

Lors de cette étude, l'impact des disponibilités hydriques a été évalué par différentes conduites d'irrigation pendant le remplissage de la graine. Mais seules les conditions de forts déficits hydriques (niveau de stress hydrique 5 en 2003) ont engendré un effet des régimes hydriques sur la teneur en huile et en protéines. Globalement, les déficits hydriques sévères (niveau 5) ont réduit le pourcentage d'huile. Le tournesol présente une grande sensibilité au stress hydrique appliqué entre le début floraison et la fin de remplissage (Hall *et al.*, 1985; Flénet *et al.*, 1996 ; Chimenti *et al.*, 2001, mais sa capacité d'adaptation lui permet de tolérer des déficits hydriques sévères. Ainsi, des déficits inférieurs à -70mm durant la phase sensible d'accumulation de la fraction lipidique ont pénalisé le pourcentage d'huile ainsi que le rendement à l'hectare et la quantité d'huile accumulée par graine, alors que des déficits hydriques supérieurs à -50mm ont suffi à atteindre des niveaux de pourcentage et de production d'huile élevés (années 2000 et 2002).

La situation s'avère plus contrastée pour l'accumulation de protéines dont la teneur augmente en conditions de déficit hydrique sévère (< à -70mm durant l'année 2003) et reflète à nouveau la relation négative entre ces deux constituants.

4.2. Répartition huile/protéines

Concernant l'effet de ces deux facteurs agri-environnementaux, nos résultats montrent que les proportions des fractions protéique et lipidique semblent déterminées par leur équilibre dans la graine qui est modifié en condition de stress hydrique et thermique. Deux points ressortent. D'une part, la somme de la proportion d'huile et de protéines diminue sous l'effet d'une augmentation de températures moyennes en phase post-florale (exemple de Santiago II et Proléic 204 Figure 48) (de 75 à 60%).

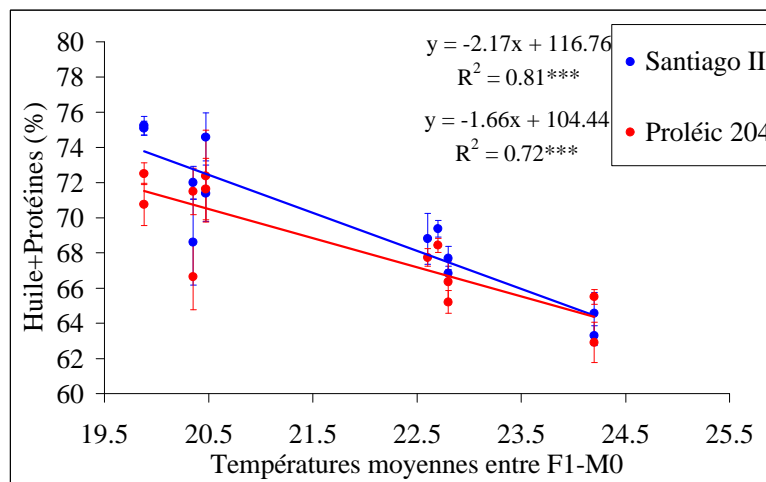


Figure 48 : Variation de la somme des proportions huile et protéines (%/matière sèche) dans les graines de Santiago II et Proléic 204 en fonction de la température moyenne entre les stades F1 et M0

F1: début floraison, M0: début de maturation des graines. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$.

Ceci signifie que des conditions limitantes réduisent la proportion de la graine consacrée à ces deux constituants pour laisser la place à d'autres composants, tels des glucides solubles ou insolubles (amidon ou cellulose) ou substances assimilées (acides organiques) (Goffner, 1989). A l'inverse lorsque la plante se développe dans des conditions non limitantes, le maximum est atteint (75%).

D'autre part, il existe une corrélation entre teneur en huile et teneur en protéines qui permet de définir la proportion de chaque fraction selon la proportion totale occupée (de 75% à 60%) mais la proportion relative de chaque constituant et leurs quantités accumulées par graine dépend des conditions de température et de déficits hydriques. Plus la contrainte hydrique est sévère et les températures moyennes élevées, plus la relation se déplace vers la production de protéines au détriment de celle de l'huile.

Il semble donc que de fortes températures associées à des déficits hydriques intenses affecte premièrement les constituants formés à partir de l'accumulation de carbone puis secondairement les composés azotés. Lorsque la plante est soumise à une contrainte thermique ou hydrique, la quantité d'assimilats carbonés par graine devient un facteur limitant au métabolisme lipidique: la quantité d'huile est affectée. Le taux de protéines est relativement stable dans les mêmes conditions: l'accumulation de protéines est favorisée au détriment des réserves lipidiques. Les protéines sont les premiers constituants accumulés dans la graine et leur durée d'accumulation est courte ce qui explique que leur marge de variabilité soit beaucoup plus faible que celle de l'huile.

Bien que les équilibres établis entre ces composés suivent les mêmes tendances pour tous les génotypes, il faut noter que l'effet du potentiel génétique est très marqué pour la détermination de ces deux constituants. Les graines du génotype oléique (Proléic 204) renferment les plus fortes teneurs en protéines tandis que les graines de l'hybride standard (Santiago II) accumulent la plus forte proportion d'huile. Ces deux génotypes se montrent sensibles aux différentes variables culturales, probablement en raison de leur déterminisme génétique moins stable pour ces composés (production de protéines pour l'oléique et d'huile pour le standard). Cela laisse supposer que, indépendamment de leur différence génétique déterminant la composition en acides gras, il existe un métabolisme physiologique d'adaptation au stress (thermique et hydrique) spécifique à chaque génotype qui détermine la composition en constituants majeurs (huile, protéine).

4.3. Acides gras

4.3.1. Influence des températures en phase post-florale

Dans nos conditions expérimentales, le maximum de teneur en acides gras saturés (C16:0, 5.7% et C18:0, 4.4%) est atteint lorsque les températures sont les plus élevées (semis classique 2002 et semis tardif en 2003) quel que soit le génotype (à l'exception de l'hybride standard dans le cas du C18:0 et de l'hybride oléique pour le C16:0 qui ne présentent pas de différences significatives). Les effets de la température sur la teneur en acides gras saturés sont peu étudiés et souvent controversés. En accord avec les travaux de Green *et al* (1986) sur le lin, Cheesbrough (1990), Rennie et Tanner, 1989), sur le soja et Fernandez-Moya *et al.* (2002) sur le tournesol mutant riche en acide stéarique (CAS14), nos résultats montrent qu'une élévation de température induit une augmentation du pourcentage relatif en ces deux acides gras saturés. De plus, ces auteurs précisent que cette augmentation ne s'observe que pour des températures diurne/nocturne supérieures à 25/15°C et que

le maximum de C18:0 (35%) est atteint pour des températures particulièrement fortes (> à 30/20°C). Cette caractéristique corrobore les faibles variations observées dans nos conditions expérimentales pour de températures plus faibles (2002) par rapport à des températures plus élevées (2003).

Concernant les acides gras insaturés, le décalage de la date de semis a entraîné une augmentation de la teneur en acide oléique (C18:1) au détriment du pourcentage en acide linoléique (C18:2) quelle que soit la séquence climatique. De nombreuses études ont mis en évidence l'augmentation du pourcentage de C18:1 concomitante à la réduction de la teneur en C18:2 en réponse à l'élévation de la température (Canvin, 1965; Harris *et al.*, 1978; Nagao et Yamazaki, 1984; Champolivier et Merrien, 1996, Lagravère *et al.*, 2000). Garcès et Mancha (1991) ont montré que cette élévation de température (supérieure à 20°C) conduit à l'inhibition *in vitro* de l'enzyme Δ -12 désaturase responsable de la conversion de C18:1 en C18:2 (Garcès *et al.*, 1989; Heppard *et al.*, 1996). Or l'activité de la Δ -12 désaturase concerne la période comprise entre les stades F1 et M0 (16 et 20 jours après floraison, Garcès et Mancha, 1991). Dans nos conditions expérimentales, le décalage de la date de semis n'implique pas nécessairement une élévation de températures durant cette phase. En effet, les températures moyennes pendant la période F1-M0 sont constantes dans les séquences climatiques de 2002 et 1999 pour les deux dates de semis, alors que l'année 2003 présente des températures moyennes supérieures dans le cas du semis tardif (+1.4°C). En revanche, la somme des températures calculées dans le cas du semis tardif (*cf* Tableau 15) entre F1 et M0 révèle une légère augmentation par rapport au semis classique quelle que soit la séquence climatique (de 21 à 48°Cjours). Aussi, bien que la température moyenne joue un rôle sur l'établissement du ratio acide oléique/linoléique, il semble que l'effet de ce facteur soit associé à la durée de la phase de sensibilité de l'enzyme correspondant à la période pendant laquelle les plantes sont exposées à une élévation de température dès le début de la floraison.

En outre, dans le cas du semis tardif des années 2002 et 1999, la stabilité des températures de la phase F1-M0 résulte des variations de température inverses entre F1-F3.2 (-0.8°C) et F3.2-M0 (environ +1°C) (Tableau 33).

Tableau 33 : Températures moyennes (°C) entre le début et la fin floraison (F1-F3.2), et entre la fin floraison et le début de maturation des graines (F3.2 et M0) lors des campagnes 1999 et 2002

		Date de semis	
		DS1	DS2
1999	Phases phénologiques		
	F1-F3.2	22.8	22.0
	F3.2-M0	22.4	23.5
	F1-M0	22.6	22.7
2002	F1-F3.2	20.1	19.3
	F3.2-M0	20.6	21.6
	F1-M0	20.4	20.5

DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive.

La hausse de température responsable de l'augmentation du pourcentage en C18:1 à la récolte semble donc se situer entre les stades F3.2 et M0. Les températures de la phase (M0-M2) n'expliquent pas l'effet température observé car le semis tardif de la campagne 2002 présentent des températures plus fraîches que le semis classique. Celles-ci auraient du diminuer la teneur en C18:1 mais l'effet inverse est observé. Le calcul de l'indice ODS (oléate désaturase) (Green, 1986) permet d'exprimer l'activité de l'enzyme $\Delta 12$ désaturase selon la formule suivante: $[\%C18:2/(\%C18:2+\%C18:1) \times 100]$. D'après Cherif *et al.*, 1975), cette valeur est directement proportionnelle à l'activité du système enzymatique responsable de la désaturation du C18:1. Le Tableau 34 représente les coefficients de régression entre les températures moyennes entre F1-M0, F1-F3.2, F3.2-M0 et l'indice ODS calculé pour des déficits hydriques compris entre 0 et -40mm; et -40mm et -90mm pour toutes les séquences climatiques étudiées.

Tableau 34 : Coefficient de régression entre les températures moyennes des phases (F1-M0; F1-F3.2; F3.2-M0) et l'indice ODS selon le déficit hydrique (DH) pour deux génotypes dans toutes les séquences climatiques étudiées

Génotypes	DH	Phases phénologiques		
		F1-M0	F1-F3.2	F3.2-M0
Santiago II	>-40mm	-0.89***	-0.152 ns	-0.89***
	<-40mm	-0.92***	-0.0354 ns	-0.92***
Proléic 204	>-40mm	-0.38*	-0.69***	-0.39*
	<-40mm	-0.0148 ns	-0.75***	-0.0148 ns

DH: déficit hydrique. * significatif pour $p < 0.05$, ** significatif pour $p < 0.01$, *** significatif pour $p < 0.001$, ns: non significatif. F1: début floraison, F3.2: fin floraison, M0: début de maturation des graines.

Dans le cas de Santiago II, il apparaît un fort coefficient de régression négatif pour les températures correspondant à la phase F1-M0. Cette forte corrélation négative se retrouve pour les températures moyennes comprises entre F3.2 et M0 alors que la phase précédente (F1-F3.2) ne présente aucune corrélation. A l'inverse, dans le cas du génotype Proléic 204, la corrélation négative observée entre

température moyenne et indice ODS concerne la phase F1-F3.2 alors qu'aucune corrélation n'est mise en évidence pour la phase globale F1-M0. Ces résultats laissent supposer qu'il existe une période de sensibilité de l'enzyme Δ -12 désaturase spécifique à chaque génotype. De plus, il semble que globalement, une courte période de fortes températures suffise à déterminer la teneur en C18:1 finale. Cette période se situe entre la fin de la floraison et le début de maturation des graines (F3.2-M0) pour l'hybride standard alors que dans le cas du génotype oléique, cette sensibilité se situe surtout entre le début de la floraison et la fin de la floraison (F1-F3.2). Le même type de conclusion sur l'augmentation de la teneur en C18:1 d'un hybride standard a été formulé pour des températures dépassant 35°C en milieu contrôlé, durant une brève période (7 jours) situées entre 19 et 26 jours après floraison (Rondanini *et al.*, 2003).

Nos données soulignent une relative stabilité des teneurs en acides gras insaturés des graines des génotypes oléiques par rapport aux génotypes standard. Elles confirment celles obtenues pour d'autres génotypes oléiques (Fernandez-Martinez *et al.*, 1986; Garcès *et al.* 1989.; Lagravère *et al.*, 2000; Triboui-Blondel *et al.*, 2000). Kabbaj *et al.* (1996) ont montré que chez une lignée standard, le niveau de transcription de l'enzyme Δ 12-désaturase est accru lorsque la température augmente (26°C jour/22°C nuit par rapport à 20°C jour/18°C) et que dans ces conditions de température, la quantité d'ARN_m de Δ 9 désaturase (produisant du C18:1) est supérieure à celle de la Δ 12 désaturase. Ainsi, la forte teneur en C18:1 des génotypes oléiques serait due à une forte accumulation d'ARN_m de Δ 9 désaturase associée à la courte chute d'activité de l'enzyme Δ 12 désaturase en réponse à l'élévation de températures par rapport aux génotypes standard.

En ce qui concerne les rendements à l'hectare des acides gras, seules de fortes températures durant l'ensemble de la phase post-florale (F1-M2) (année 2003) ont modifié les potentialités de tous les génotypes retenus. Les rendements à l'hectare d'acides gras saturés (C16:0 et C18:0) sont réduits en réponse à de fortes températures. Quant aux rendements en acides gras insaturés, malgré l'augmentation de la teneur en C18:1 et la réduction de celle en C18:2 générale chez les génotypes standard, les variations de rendements en acides gras vis-à-vis de l'élévation de température dépendent du potentiel génétique (hybrides ou populations). Globalement, on observe:

- une diminution marquée de C18:1 pour l'hybride standard,
- une augmentation de C18:1 chez le génotype population,
- une stabilité de la teneur en C18:1 chez l'hybride oléique, avec un maximum atteint pour les températures les plus fortes.

Ces variations suivent celles du rendement-grain et de la teneur en huile dont les potentialités sont réduites pour des températures de croissance supérieures à 24°C (semis classique de l'année 2003) et confirment les observations déjà faites sur la sensibilité particulièrement marquée de l'hybride standard par rapport aux deux autres typologies de génotypes.

En ce qui concerne les quantités accumulées par graine, les génotypes répondent à la hausse de température de façon similaire pour les deux catégories d'acides gras (saturés et insaturés). De fortes températures diminuent le taux de remplissage et la taille de l'embryon (Chimenti *et al.*, 2001), ce qui induit un effet dépressif sur le poids de la graine (maximum d'accumulation à 20°C). La proportion d'huile diminuant dans ces conditions, les quantités d'acides gras accumulés varient de façon similaire.

4.3.2. Influence de la disponibilité hydrique en phase post-florale

Les fortes teneurs en acides gras saturés (acide stéarique et palmitique) et en acide gras poly-insaturé (acide linoléique, C18:2) ont été favorisées par des déficits hydriques sévères, ou modérés dans le cas de l'acide stéarique (C18:0). En revanche, la teneur en acide gras monoinsaturé, l'acide oléique (C18:1), présente une sensibilité aux déficits hydriques intenses (< à -70mm) particulièrement dans le cas des génotypes standard (hybride et population) dont la teneur est fortement réduite tandis que le génotype oléique reste généralement stable. Le décalage de la date de semis a permis de mettre en évidence une corrélation négative entre les températures des phases F3.2-M0 pour le génotype standard et F1-F3.2 pour le génotype oléique. La Figure 49 représente l'évolution de l'indice ODS en fonction de l'interaction température*déficit hydrique.

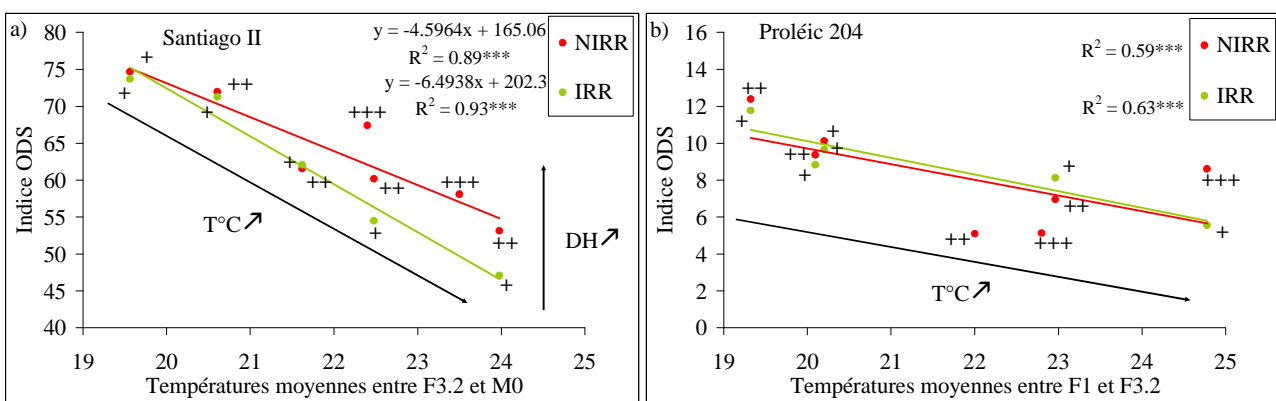


Figure 49 : Indice ODS en fonction de la température et des déficits hydriques entre les stades F3.2 et M0 dans le cas du génotype standard (Santiago II) (a) et entre les stades F1 et F3.2 dans le cas du génotype oléique (Proléic 204) (b)

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DH: déficit hydrique, +: DH > -40mm, ++: -40mm > DH > -70mm, +++: DH < -70mm; T°C: température moyenne. ODS: activité oléate désaturase. * significatif pour p < 0.05, ** significatif pour p < 0.01, *** significatif pour p < 0.001.

Dans le cas du génotype standard (Santiago II), un déficit hydrique croissant stimule l'activité ODS, reflétant la réduction des teneurs en C18:1 observée en réponse à une conduite non irriguée; alors qu'il ne se dégage pas d'effet significatif dans le cas du génotype oléique.

Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer la diminution de la proportion de C18:1 dans la graine finale (plus faible indice ODS). La première hypothèse physiologique concerne les ressources en carbone. Les ressources carbonées permettant de former les acides gras proviennent des réserves de carbones véhiculées sous forme de saccharose par la sève, des feuilles vers les graines. Les acides gras constitutifs de la fraction lipidique étant constitués de chaînes carbonées proviennent donc directement des produits de la photosynthèse. De nombreuses études ont mis en évidence une réduction de l'activité photosynthétique des feuilles sous l'effet d'un stress hydrique (Blanchet, 1987, Flénet *et al.*, 1996). Une plus faible activité photosynthétique diminuerait la quantité de carbone transférée aux graines; et donc aux acides gras et pourrait expliquer la diminution des quantités et rendements de tous les acides gras dans le cas du génotype standard dans nos conditions expérimentales.

Cependant cette hypothèse n'explique pas les modifications de teneurs en acides gras relatives aux pourcentages d'acides gras totaux. Ces variations de teneurs sont nécessairement le fruit de la modification d'activité biochimique telle que l'activité des stéarate et oléate désaturases permettant l'établissement des équilibres biochimiques entre acides gras. Dans nos conditions expérimentales, le degré d'insaturation des acides gras de l'huile extraite augmente sous l'effet d'un stress hydrique (diminution de la teneur en C18:1 et augmentation de la teneur en C18:2). En situation de stress hydrique, de nombreuses fonctions enzymatiques sont activées dans le but de protéger les cellules, comme des catalases ou peroxydases responsables de la capture des espèces oxygène réactives (ROS) (Halliwell et Cutleridge, 1990; Jiang et Zhang, 2002). Dans ces mécanismes, le degré d'insaturation est modifié en réponse aux ROS (Blokhina *et al.*, 2003) pouvant induire une peroxydation des lipides et une libération de C18:2. Ceci pourrait expliquer les variations de teneurs en acides gras insaturés en réponse à un stress hydrique.

Les études relatives à l'effet du stress hydrique sur la composition en acides gras en conditions naturelles sont peu nombreuses et contradictoires. Nos données ne confirment pas celles de Talha et Osman (1974) et Flagella *et al* (2002) qui soulignent une augmentation de la teneur en C18:2 et une diminution de la teneur en C18:1 sous l'effet d'un régime irrigué pour des génotypes oléiques et standard respectivement. Cependant, plusieurs travaux mettent en évidence de très faibles modifications chez les deux types d'hybrides (Unger, 1982; Salera et Baldini, 1998). Ces divergences sont probablement dues à la différence de caractérisation du déficit hydrique dans les

conditions expérimentales et à la forte interaction avec le potentiel génétique qui s'exprime fortement en réponse au stress hydrique.

Comme dans le cas de l'effet de la température, la réponse au stress hydrique permet de dégager des comportements différents selon les génotypes vis-à-vis des proportions d'acides gras dans la graine. De manière générale, les génotypes standard répondent fortement à l'apport d'irrigation. C'est le cas en particulier du génotype population Ichraq pour lequel l'augmentation de la teneur en C18:1 finale est la plus significativement améliorée, contrairement au génotype oléique qui se distingue par sa forte stabilité. Ces trois génotypes ont d'ailleurs été caractérisés d'un point de vue génomique, à travers l'analyse de l'expression des gènes des principaux métabolismes du tournesol en réponse au stress hydrique dans le chapitre V.

4.4. Variabilité de la teneur en phytostérols

Globalement, la teneur totale en phytostérols est influencée par le retard de semis, qui met en jeu de fortes températures durant la phase post-florale (+1.4°C et +2°C dans les phases F1-M0 et M0-M2 respectivement). Cet effet varie selon le génotype concerné: dans les génotypes hybrides (Santiago II, Proléic 204 et All Star) la variation des teneurs en phytostérols totaux est plus marquée tandis que chez les génotypes population et lignée (Ichraq, 2603 et HA300b), les teneurs demeurent relativement stables. Les mêmes tendances ont été observées concernant la variation de la teneur en phytostérols totaux de graines de soja soumises à des régimes de température croissants (20/10°C, 27/17°C, 35/25°C diurne/nocturne) où une augmentation de la teneur en phytostérols est proportionnelle à l'élévation de température (Vlahakis et Hazebroek, 2000). Le rôle de protection contre les réaction d'oxydation des phytostérols au sein des membranes cellulaires (Piironen *et al.*, 2000), ou encore leur place en tant que précurseurs dans la voie de biosynthèse des hormones végétales (brassinostéroïdes) (Asami et Yoshida, 1999) suggèrent leur implication dans la réponse des plantes aux stress, et pourraient expliquer l'augmentation du taux de phytostérols observée dans nos conditions expérimentales en réponse à des déficits hydriques sévères associées à de fortes températures. D'ailleurs, dans une étude réalisée sur la pomme de terre, Palta *et al.* (1993) émet l'hypothèse que les phytostérols pourraient être impliqués dans des mécanismes d'adaptation des plantes à des variations de température, au même titre que les acides gras insaturés.

5. Conclusion

L'analyse des variations en constituants majeurs de la graine (huile et protéines) et en constituants de l'huile (acides gras et phytostérols) révèle la possibilité d'utiliser les itinéraires techniques pour adapter la culture aux paramètres climatiques et aboutir à la production de composés d'intérêt. L'élévation de température moyenne supérieure à 20°C et de fort déficit hydrique (< à -70mm) répriment le pourcentage et le rendement en huile. En revanche, ces facteurs ont un effet inverse sur la fraction protéique et la fraction insaponifiable (phytostérols) des graines conduisant à une augmentation de leur proportion. La teneur en acides gras saturés (C18:0 et C16:0) et polyinsaturé (C18:2) diminuent lors d'une hausse de température alors qu'un déficit hydrique augmente leur proportion. Cette variabilité illustre la sensibilité des équilibres entre constituants de la graine. Dans une approche de modélisation, il conviendra de prendre en compte l'effet de ces facteurs à travers différentes fonctions. Une fonction physiologique doit prendre en compte l'accumulation des constituants majeurs: en conditions d'alimentation hydrique à 70% de l'ETM et pour des températures inférieures à 20°C, la fraction lipidique s'accumule et la fraction protéique se stabilise à un maximum. Il semble que lorsque la plante est soumise à des contraintes hydrique et thermique, elle met en place une stratégie d'adaptation qui vise à conserver l'accumulation de protéines dans la graine dont la présence est indispensable pour le développement futur de l'embryon, au détriment de la fraction lipidique. Pour les constituants de la fraction lipidique, il semble se dégager une fonction biochimique de l'effet de la température sur l'activité des enzymes responsables de la synthèse des acides gras et des phytostérols en terme de composition. Dans cette fonction, le déficit hydrique semble activer un système de protection de l'embryon en formation par l'augmentation du degré d'insaturation et des phytostérols. Ces aspects seront discutés dans le chapitre V par rapport à l'expression différentielle des gènes en conditions de contraintes hydriques.

La variabilité de composition de la graine à maturité résulte de la modification des mécanismes biochimiques actifs durant toute la maturation de la graine qui déterminent les teneurs finales en composés de la graine. L'accumulation de ces composés a été suivie et la modification de l'élaboration de ces constituants en réponse aux effets des facteurs agri-environnementaux sera développée dans le chapitre IV.

Chapitre IV - Dynamique d'accumulation des constituants dans la graine sous contraintes agri-environnementales

Avant-propos

Dans le chapitre précédent, la possibilité de maîtriser la variabilité des teneurs en composés de la graine à maturité physiologique a été mise en évidence par le choix d'itinéraires techniques. Toutefois, la réponse aux variables culturales mises en jeu que sont la température et la disponibilité hydrique dépend du potentiel génétique. Il est donc important d'analyser selon les géotypes les modifications engendrées par les facteurs du milieu sur la mise en place de chacun des constituants au cours du développement de la graine.

L'objectif de ce chapitre est de préciser les cinétiques d'accumulation de la fraction lipidique et de ces composantes (acides gras et phytostérols) dans la graine en réponse aux contraintes agri-environnementales imposées. Ces données permettront de compléter les hypothèses établies à la récolte sur l'établissement des équilibres entre composés majeurs et de caractériser le comportement de géotypes choisis pour leur différence de composition en acides gras.

Enfin, nous tenterons d'identifier des indicateurs physiologiques de la qualité pouvant servir de base pour la construction d'un module simple d'élaboration de la qualité à introduire dans les modèles de croissance et de développement du tournesol déjà existants.

Les résultats exposés portent sur les cinétiques d'accumulation de la matière sèche des graines et des composés majeurs de la graine (huile, protéines, acides gras et phytostérols) en réponse au décalage de la date de semis (campagnes 2002 et 2003) et à différents niveaux de disponibilité hydrique (campagnes 2002 et 2003; et conditions contrôlées de 2002). La dernière partie est consacrée à la synthèse et la discussion des résultats.

Les cinétiques d'accumulation des différents composés au cours du cycle sont établies au cours des campagnes présentant des différences climatiques contrastées (2002 et 2003), en particulier d'un point de vue température moyenne et disponibilité hydrique. En condition de contrainte hydrique, les cinétiques obtenues en milieu naturel sont comparées à l'étude réalisée en milieu contrôlé.

1. Accumulation de la matière sèche

L'accumulation de la matière sèche dans la graine comporte deux périodes. Pendant la première phase, la matière sèche s'accumule activement dans la graine, jusqu'à 37- 44 jours après floraison selon les géotypes (Robertson *et al.*, 1978; Champolivier et Merrien, 1996, Chimenti *et al.*, 2001). L'accumulation des constituants lipidiques débute également lors de cette phase et se poursuit lors d'une seconde phase qui se caractérise par un plateau durant lequel la graine se dessèche.

1.1. Effet de la température

Dans nos conditions expérimentales, les contraintes thermiques ont entraîné une réduction de la quantité de matière sèche finale accumulée en modifiant la durée et le taux de remplissage.

Dans le cas du géotype Santiago II, l'augmentation de température réduit la quantité finale de matière sèche accumulée par plante (Figure 50 a). L'accumulation de matière sèche est maximale à 48 jours après floraison (JAF) (environ 120g/plante) pour une température moyenne de 19.1°C entre M0 et M2 (année 2002) alors que les plus fortes températures (année 2003) durant cette même phase (25.3 à 27.3°C) ont conduit à accumuler moins de la moitié de matière sèche. D'une part, ces conditions de températures induisent une réduction de la durée d'accumulation de 9 à 17 jours selon la disponibilité hydrique, par rapport aux températures plus fraîches. D'autre part, la plus faible vitesse d'accumulation observée lorsque la température est plus élevée explique la réduction du niveau d'accumulation de matière sèche finale (Tableau 35).

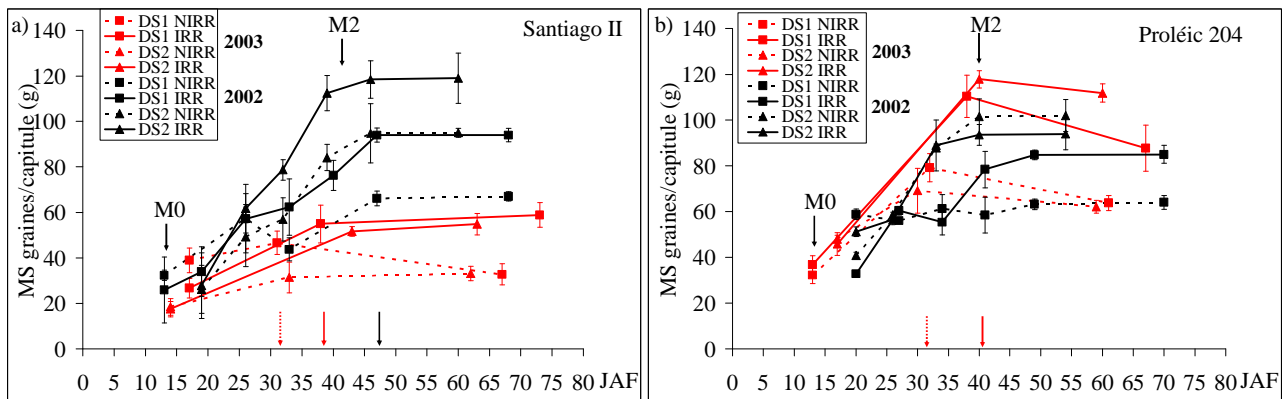


Figure 50 : Accumulation de matière sèche dans les graines en fonction des jours après floraison (JAF) pour les génotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. M0: début de maturation des graines, M2: fin de maturation des graines. MS: matière sèche. Les flèches représentent les maxima d'accumulation des différents traitements. En rouge: maxima en 2003, en noir: maxima en 2002; en trait pointillé: maxima en condition non irriguée, en trait plein: maxima en condition irriguée.

Les graines du génotype oléique atteignent leur maximum d'accumulation de matière sèche (110 g/plante) précocement (40 JAF) par rapport au génotype standard (Figure 50 b). Mais contrairement à ce dernier, l'effet de la hausse des températures moyennes (année 2003) a conduit à un taux élevé en particulier dans le cas du régime irrigué.

Tableau 35 : Accumulation de matière sèche dans les graines des génotypes Santiago II et Proléic 204 (g/jour/capitule) en fonction des conditions culturales (date de semis et régime hydrique) et de l'année

	Année	DS1		DS2	
		NIRR	IRR	NIRR	IRR
Santiago II	2002	0.7*	1.9***	2.8***	4.1***
	2003	0.6	1.3	0.7	1.2
Proléic 204	2002	0.2*	1.7***	3.1***	2.4***
	2003	2.5	2.9	1.6	3.1

Les taux d'accumulation ont été calculés par régression linéaire N=36 en 2002 et N=24 en 2003. R² en 2002: Santiago II: DS1 NIRR=0.36, DS1 IRR= 0.97, DS2 NIRR= 0.97, DS2 IRR=0.99; Proléic 204: DS1 NIRR=0.42, DS1 IRR= 0.88, DS2 NIRR= 0.98, DS2 IRR=0.90. En 2003, les coefficients sont établis sur deux prélèvements. *: coefficient de régression significatif à 0.5%, **: coefficient de régression significatif à 0.1%, ***: coefficient de régression significatif à 0.01%.

1.2. Effet de la disponibilité hydrique

Un stress hydrique de niveau 5 (cf classification Tableau 18) (année 2003 régime non irrigué) réduit la durée de remplissage de 8 à 10 jours, ce qui conduit au niveau de matière sèche accumulée le plus faible, toutes situations confondues. La durée d'accumulation reste inchangée pour des niveaux des stress hydriques plus faibles (2 à 4). Le taux de remplissage est également affecté dans les mêmes conditions (Tableau 35). Quel que soit le niveau de stress hydrique, un apport d'irrigation entre F1

et M0 permet d'augmenter la production de matière sèche dans les graines en augmentant la durée de remplissage.

Globalement, en situation de faible disponibilité hydrique (niveau de stress hydrique supérieur à 3), la durée (31 JAF) et le taux de remplissage des graines du génotype oléique sont déprimés (Tableau 35).

Bien que le niveau soit plus faible, la matière sèche accumulée dans les graines en conditions contrôlées suit la même évolution que celle observée en conditions naturelles (Tableau 36).

Tableau 36 : Accumulation de matière sèche des graines (g/plante) des génotypes Santiago II et Proléic 204 en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique (RH)

Génotypes	Santiago II						Proléic 204					
	26	32	38	44	56	69	27	33	39	45	57	67
Témoin	9.1 a	13.7 a	12.2 a	12.7 a	12.8 a	12.7 a	12.3 a	17.9 a	19.3 a	19.3 a	20.5 a	21.3 a
Stress court	7.7 b	10.2 b	15.2 a	13.4 a	13.9 a	12.1 a	9.5 b	16.4 a	18.8 a	18.4 b	19.0 b	18.6 b
Stress long	9.7a	10.0 b	12.9 a	11.6 a	11.2 a	12.7 a	11.8 a	15.4 b	17.7 b	17.6 c	18.0 b	18.5 b

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours).

Dans le cas de Santiago II, les stress hydrique à 55% de l'ETM ne permettent pas de mettre en évidence une différence d'accumulation de matière sèche à la récolte. Le niveau de matière sèche accumulée du génotype Proléic 204 est réduit sous l'effet du stress hydrique conduit à 55% de l'ETM, quelle que soit la durée de ce stress.

2. Accumulation de l'huile et des protéines

2.1. Huile

2.1.1. Effet de la température

La fraction lipidique commence à s'accumuler dès le 10^{ième} JAF jusqu'à environ 30 JAF, seuil au-delà duquel le pourcentage se stabilise jusqu'à maturité des graines. Cette évolution suit globalement l'accumulation de matière sèche. Les conditions climatiques influent sur ce maximum qui, dans nos conditions, peut atteindre 44 JAF.

Globalement, une hausse de températures provoque une réduction de la teneur en huile. Le maximum d'accumulation lipidique est atteint pour les températures les plus fraîches entre M0 et

M2 (19.1°C dans le cas du semis tardif en 2002). La hausse des températures caractérisant les autres situations (2003) est associée à une décroissance de la teneur à maturité. La cinétique d'élaboration de la fraction lipidique en conditions de températures élevées (semis tardif 2003) se différencie de celle en conditions de plus faibles températures (semis classique 2003) par une réduction du pourcentage d'huile accumulée en fin de synthèse active (à M2) (-10.6 et -11.6% pour Santiago II et Proléc 204 respectivement) (Figure 51 a et b).

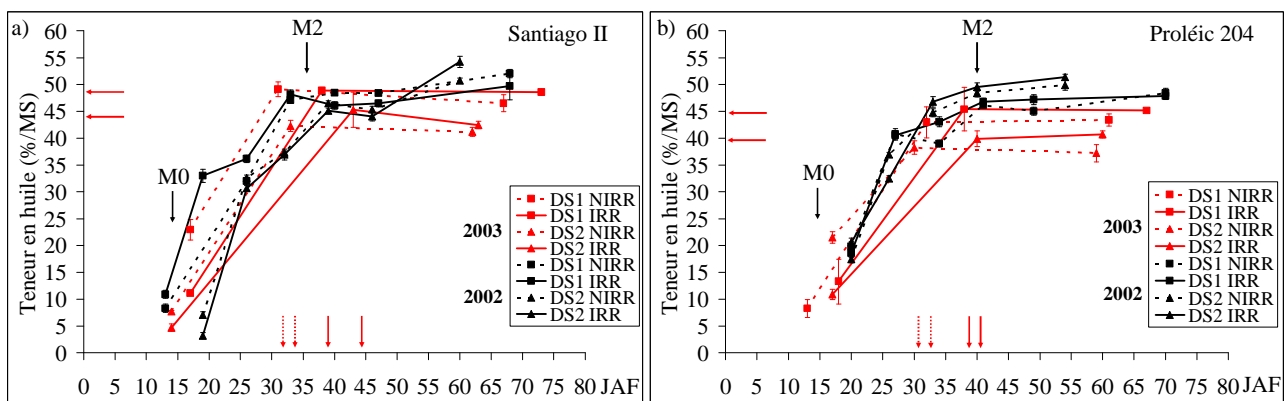


Figure 51 : Teneur en huile (%/matière sèche) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les génotypes Santiago II (a) et (Proléc 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. Les flèches représentent les maxima d'accumulation des différents traitements. En trait pointillé: maxima en condition non irriguée en 2003; en trait plein: maxima en condition irriguée en 2003.

2.1.2. Effet de la disponibilité hydrique

Un stress hydrique sévère (niveau 5 année 2003) conduit à une diminution de la teneur en huile à maturité de la graine en raison d'une réduction de la durée d'accumulation de 8 à 10 jours par rapport aux stress hydriques modérés (niveaux inférieurs pour le régime irrigué 2003 et tous traitements hydriques de 2002). En conditions contrôlées, la durée des stress hydriques appliqués influence significativement la teneur en huile à maturité uniquement dans le cas du génotype standard. Cependant, bien que l'effet ne soit pas significatif chez le génotype oléique à maturité, la teneur en huile évolue de la même manière. A l'instar des expérimentations menées en conditions naturelles, il en ressort une réduction de la durée de remplissage de 6 à 12 jours selon le génotype sous l'effet du stress de longue durée (55 jours) (Figure 52 a et b). En revanche, le stress de courte durée (10 jours) ne modifie pas la durée d'accumulation de la fraction lipidique dans la graine et atteint même le niveau maximum du régime hydrique témoin conduit à 70% de l'ETM (52 et 57% pour Santiago II et Proléc 204 respectivement).

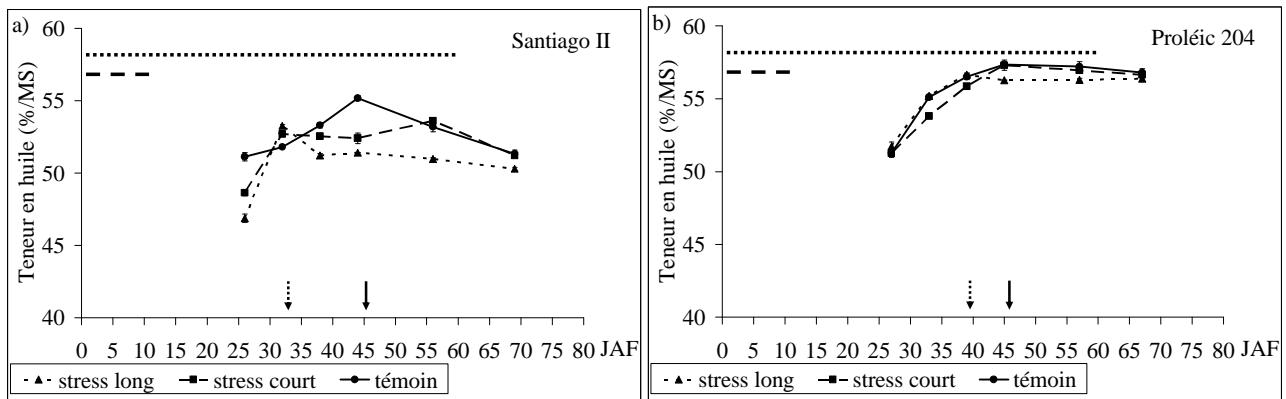


Figure 52 : Teneur en huile (%/MS) en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique pour les géotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b)

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours). Les lignes pointillées schématisent les périodes d'application des stress courts et long. Les flèches représentent les maxima d'accumulation des différents traitements. En trait pointillé: maxima pour les régimes hydriques stressés (stress long et court); en trait plein: maxima pour le régime hydrique conduit à 70% ETM.

2.1.3. Chronologie de synthèse de l'huile

Dès les premiers jours suivant la pollinisation, une phase de division cellulaire assurant le développement de l'embryon s'amorce (Cresti *et al.*, 1992). Les divisions sont associées à une synthèse de phospholipides structurels indispensables à l'édification des membranes cellulaires et nécessaires au développement des structures sub-cellulaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, plates...) (Heppard *et al.*, 1996) qui participent à la synthèse des lipides de réserve. La phase active d'accumulation des lipides commence dès le 10^{ème} JAF pendant 20 à 35 jours en moyenne selon les géotypes et les variables culturales.

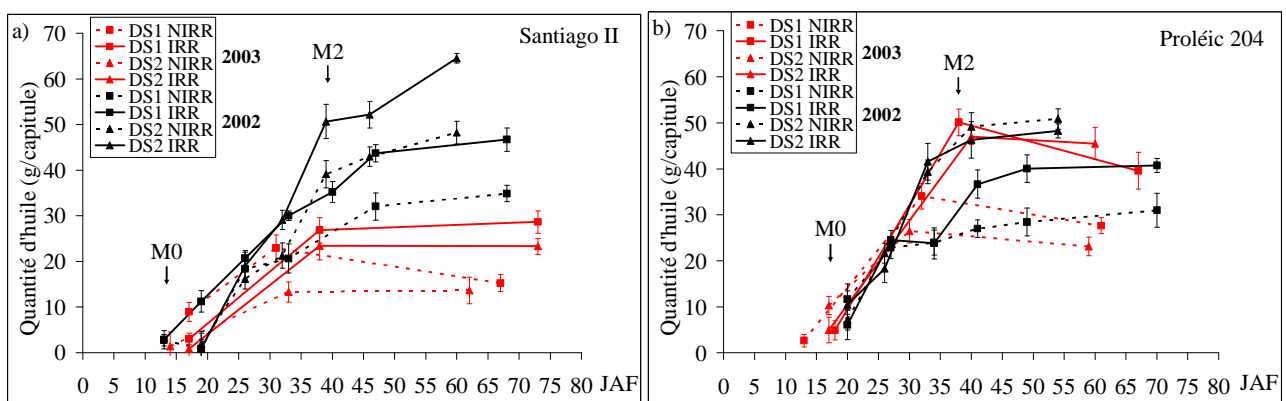


Figure 53 : Accumulation d'huile dans les graines (g/capitule) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les géotypes Santiago II (a) et (Proléic 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche.

Globalement, les conditions de température et de déficit hydrique dans l'expérimentation pluriannuelle ne modifient pas la date de début de synthèse des lipides. En revanche, il existe des différences de rythmes d'accumulation de l'huile d'une part, et de durée d'accumulation d'autre part selon les conditions de température et de déficit hydrique (Figure 53).

Dans le cas du génotype standard (Santiago II), le taux d'accumulation diminue de façon concomitante à l'élévation de température entre M0 et M2 (15 à 40 JAF) et ce phénomène s'accroît avec de faibles disponibilités hydriques (Tableau 37). La durée de la synthèse active de l'huile située entre M0 et M2 est raccourci sous l'effet des températures supérieures à 25°C (année 2003) (-10 à 15 jours).

Tableau 37 : Dynamique d'accumulation de l'huile (taux de remplissage, positionnement de la période de fin de synthèse), proportion et quantité d'huile à maturité des génotypes Santiago II et Proléic 204 selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003

Génotype	Année	DS	RH	Taux de remplissage (g. jour ⁻¹ .capitule ⁻¹)	Durée de fin de remplissage (JAF)	Proportion d'huile à maturité (%/MS)	Quantité d'huile à maturité (g. capitule ⁻¹)
Santiago II	2002	DS1	NIRR	0.94***	60	52.0 a	34.8 c
			IRR	1.19***	60	49.7 b	46.7 b
		DS2	NIRR	1.16***	47	50.7 a	48.2 b
			IRR	1.56***	47	54.2 a	64.6 a
	2003	DS1	NIRR	nd	31	46.5 b	15.2 c
			IRR	nd	38	48.6 a	28.6 a
		DS2	NIRR	nd	33	41.2 d	13.6 c
			IRR	nd	38	42.5 c	23.3 b
Proléic 204	2002	DS1	NIRR	0.52***	35	48.8 a	31.0 c
			IRR	1.11***	50	47.9 b	40.7 b
		DS2	NIRR	1.30***	40	49.9 a	50.9 a
			IRR	1.95***	40	51.3 a	48.3 a
	2003	DS1	NIRR	nd	31	43.4 b	27.6 b
			IRR	nd	35	45.1 a	39.6 a
		DS2	NIRR	nd	30	37.2 d	23.1 c
			IRR	nd	40	40.7 c	45.5 a

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. JAF: jours après floraison. Nd: non déterminé. Les taux d'accumulation ont été calculés par régression linéaire N=36. R² en 2002: Santiago II: DS1 NIRR=0.76, DS1 IRR= 0.98, DS2 NIRR= 0.85, DS2 IRR=0.83; Proléic 204: DS1 NIRR=0.61, DS1 IRR= 0.45, DS2 NIRR= 0.89, DS2 IRR=0.91. *: coefficient de régression significatif à 0.5%, **: coefficient de régression significatif à 0.1%, ***: coefficient de régression significatif à 0.01%. Pour chaque interaction date de semis*génotype, les valeurs moyennes entre régimes hydriques possédant la même lettre ne sont pas différentes au seuil de $\alpha=5\%$.

Contrairement à Santiago II, l'élévation de températures génère peu d'effet sur le rythme d'accumulation de l'huile des graines du génotype oléique (Proléic 204). En revanche, la hausse de température réduit la durée d'accumulation des lipides chez Proléic 204 (-10 jours sous le régime non irrigué en 2003).

Le rythme d'accumulation d'huile diminue dans les situations non irriguées comparativement aux conditions irriguées quels que soient le génotype et la séquence climatique. Il apparaît une forte interaction entre des températures élevée (2003) et des stress hydriques de niveau 4 et 5 qui conduit à l'arrêt de la phase active de synthèse lipidique précocement (-7 jours) dans le cas de Santiago II (Figure 53 a). Il en est de même dans le cas de Proléic 204 (-11 jours) pour des stress hydriques de niveau 5 (Figure 53 b). En conditions contrôlées, l'arrêt de synthèse précoce d'accumulation d'huile est caractéristique de la réduction de la disponibilité hydrique, particulièrement dans le cas du stress hydrique de longue durée chez les deux génotypes (-8 jours), alors que le stress hydrique de courte durée ne se distingue pas du régime hydrique témoin conduit à 70% de l'ETM.

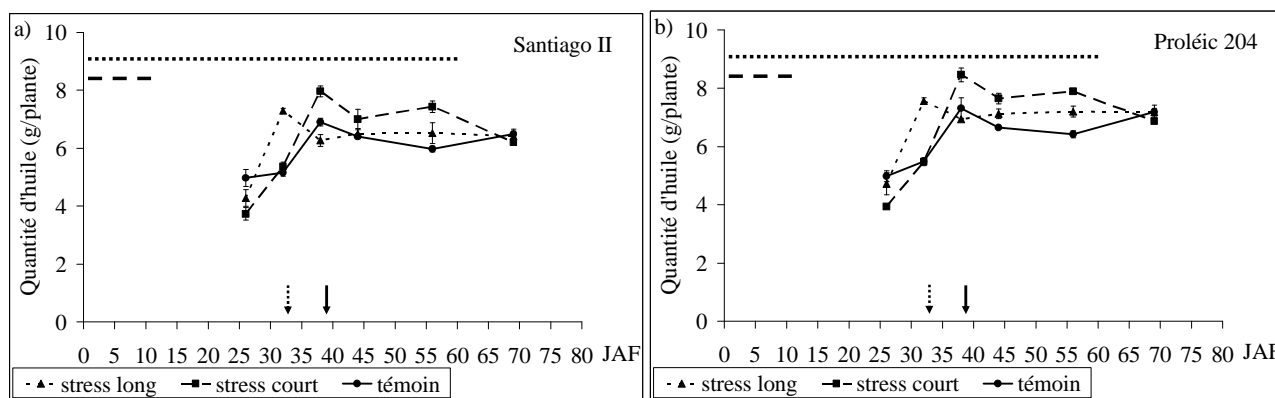


Figure 54 : Accumulation d'huile dans les graines (g/plante) en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique pour les génotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b)

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours). Les lignes pointillées schématisent les périodes d'application des stress courts et long. Les flèches représentent les maxima d'accumulation des différents traitements. En trait pointillé: maxima pour les régimes hydriques stressés (stress long et court); en trait plein: maxima pour le régime hydrique conduit à 70% ETM.

De plus, le régime hydrique de courte durée entraîne une plus forte accumulation. Toutefois, les graines à maturité ne présentent pas de quantités significativement différentes. Le retard du premier prélèvement par rapport au début de synthèse lipidique lors de cette expérimentation ne nous a pas permis d'établir les taux d'accumulation.

2.2. Protéines

2.2.1. Effet de la température

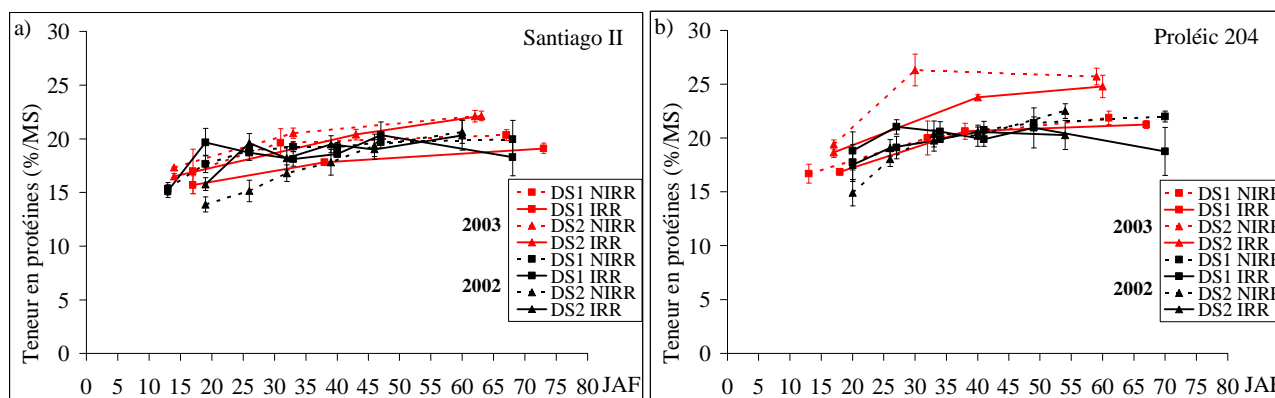


Figure 55 : Teneur en protéines (%/MS) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les géotypes Santiago II (a) et (Proléic 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche.

L'accumulation de protéines s'effectue majoritairement dans les premiers jours après floraison. Dès le 10^{ème} JAF, les graines renferment entre 13 à 17% de protéines selon le géotype. L'élévation de la température induit une légère hausse de la proportion de protéines mise en réserve dans la graine mature (+10.7 et +14.7% pour Santiago II et Proléic 204 respectivement) par rapport aux situations dont les températures apparaissent plus fraîches (semis classique de 2003 et semis tardif de 2002) (Figure 55 a et b). Contrairement à la fraction lipidique, les variations de teneurs finales en protéines résultent d'une augmentation continue de protéines jusqu'à la récolte. En effet, dans nos conditions expérimentales lors de la campagne 2003, il apparaît une augmentation significative de la teneur en protéines dès le 10^{ème} JAF suite à une élévation de températures entre F1 et M0 (+1.4°C) qui s'accroît entre M0 et la maturité avec la hausse de 2°C (semis tardif en 2003). Néanmoins, cette réponse à la température n'est pas significative pour une augmentation de 1.1°C durant cette phase (semis classique par rapport au semis tardif en 2002).

2.2.2. Effet de la disponibilité hydrique

La réponse aux stress hydriques n'est significative que dans le cas des stress hydriques les plus sévères entre F1 et M2 (niveau 5 pour la conduite non irriguée en 2003, en semis classique en particulier); avec cependant une tendance à l'établissement d'une plus forte proportion lorsque les plantes sont soumises à des déficits hydriques croissants. Les régimes hydriques réalisés en conditions contrôlées n'ont pas permis de mettre en évidence une différence dans l'établissement de

la proportion de protéines totales à maturité, ni sur l'évolution de ces dernières. La teneur apparaît globalement stable.

3. Evolution de la composition en acides gras

3.1. Proportion d'acides gras

3.1.1. Identification des phases

Deux phases sont identifiées dans l'accumulation des acides gras saturés et insaturés et leur positionnement est modulé selon le génotype. La principale différence repose sur l'établissement de la proportion de C18:1, puisque cet acide gras correspond au phénotype de la mutation oléique. De plus, il constitue une molécule clé intermédiaire entre les acides gras saturés (C18:0 et C16:0) et insaturés (C18:2).

Acides gras insaturés

La Figure 56 a et b schématise l'évolution de la teneur en C18:1 et le pourcentage d'eau dans les graines du génotype standard (Santiago II) et du génotype oléique (Proléic 204).

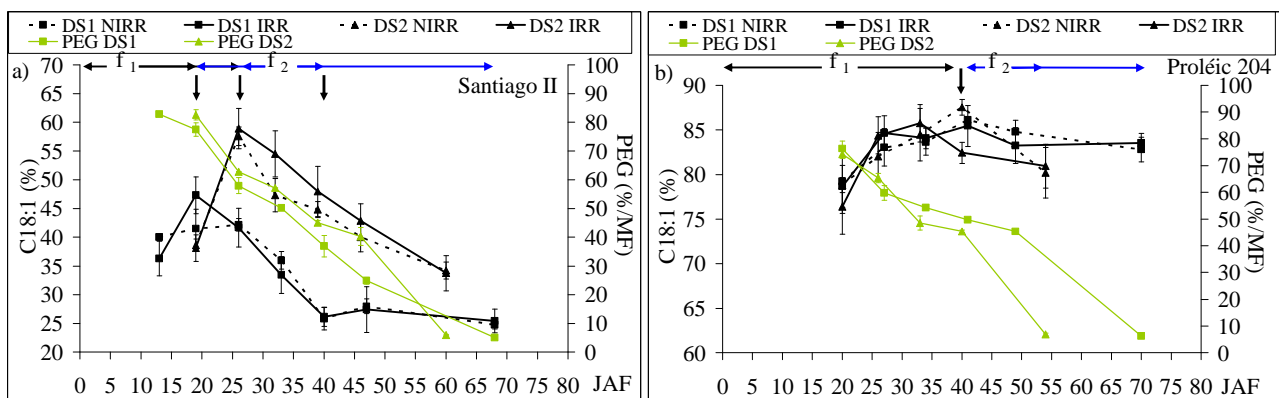


Figure 56 : Teneur en acide oléique (C18:1) et pourcentage d'eau des graines (PEG) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les génotypes Santiago II (a) et (Proléic 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MF: matière fraîche. φ1 et φ2 correspondent respectivement à la première et la seconde phase d'évolution de la proportion en C18:1; % de C18:1: %/aux acides gras totaux.

Le pourcentage d'eau des graines, exprimée en % de la matière fraîche (/MF), est communément utilisée comme indicateur de maturité physiologique. Elle varie de 85% au début de maturation des graines (M0) jusqu'à environ 5% à maturité physiologique. L'évolution de cette variable met en

évidence l'accélération du développement de la graine dans le cas du semis tardif par rapport au semis classique.

Dans les graines de l'hybride standard, la proportion de C18:1 s'établit en deux phases (Figure 56 a). La première phase (ϕ_1) correspond à l'augmentation de la fraction C18:1 qui débute dès la floraison et qui s'étend de 15 à 27 JAF (270 à 380°CJAF) selon les conditions expérimentales. Le maximum est atteint pour un pourcentage d'eau des graines compris entre 80 et 60%, (environ 120°CJAF après le premier prélèvement à M0) quelle que soit la situation. La seconde phase (ϕ_2) conduit à la réduction du pourcentage en C18:1. Chez l'hybride oléique, la cinétique de formation du C18:1 des graines se distingue de celle des graines de l'hybride standard par une phase de stabilisation de la teneur en C18:1 des graines jusqu'à la maturité qui suit la hausse continue de C18:1 de 15 JAF (250°CJAF, M0) jusqu'à 33 à 40 JAF (Figure 56 b).

Le taux de C18:2 s'établit de manière inverse à celle du C18:1 aussi bien pour le génotype standard que le génotype oléique ; c'est pourquoi l'évolution de la teneur en celui-ci n'est pas représentée.



(Inflorescences pollinisées, J. Roche)

Acides gras saturés

Le taux d'acides gras saturés évolue de façon différente à celui des acides gras insaturés pour les deux génotypes (Figure 57).

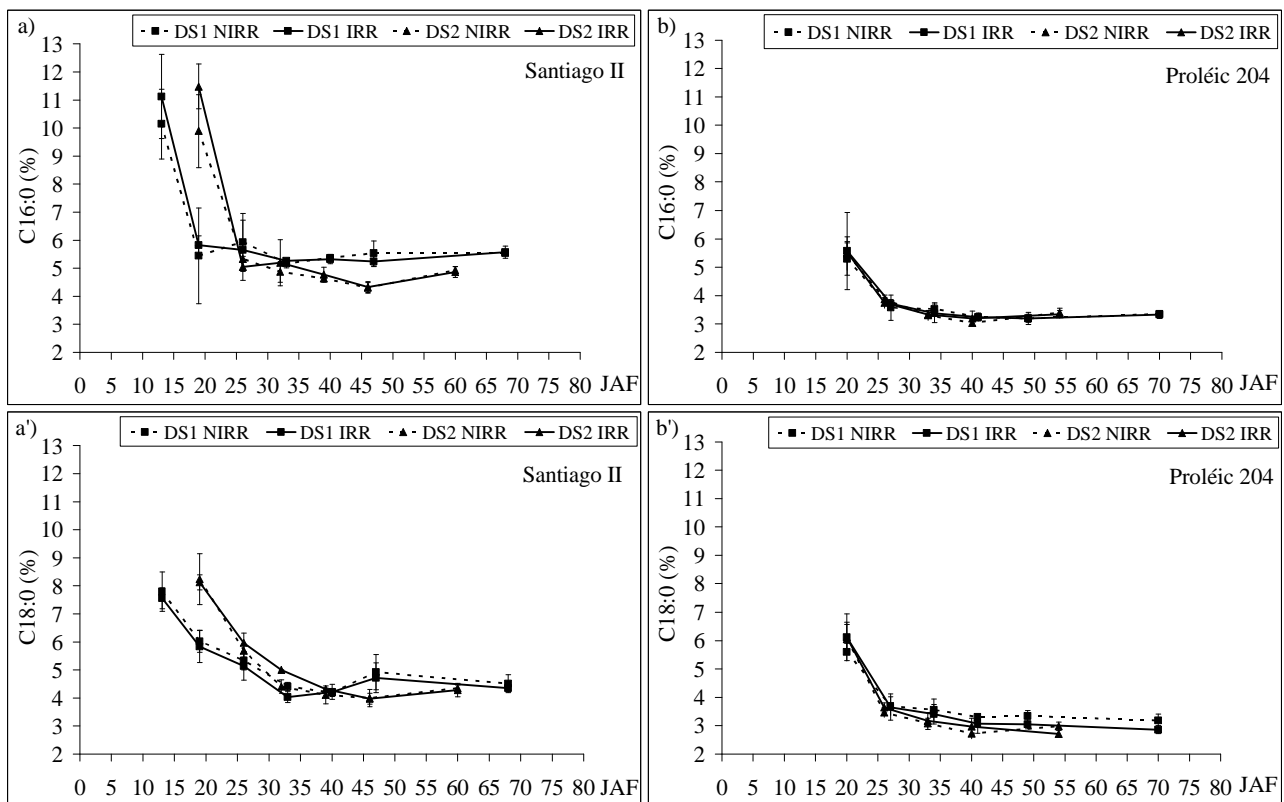


Figure 57 : Teneur en acides palmitique (C16:0) (a et b) et stéarique (C18:0) (a' et b') en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II (a et a') et Proléc 204 (b et b') selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. ; % de C18:0 ou C16:0: %/aux acides gras totaux.

Dans le cas du génotype standard, le taux de C16:0 obtenu à la récolte est quasiment établi au 20^{ème} ou 25^{ème} JAF (Figure 57 a). Il en est de même pour l'évolution du C18:0 des graines de ce même génotype, avec cependant une différence dans la durée de décroissance: la teneur en C18:0 se stabilise entre 15 à 20 JAF plus tard que celle du C16:0 (entre 35 et 45 JAF) (Figure 57 a').

Dans le cas du génotype oléique, on distingue également deux phases (décroissance, stabilisation), mais contrairement aux graines du génotype standard, les cinétiques sont relativement synchrones (stabilisation à partir de 30 JAF) (Figure 57 b et b').

3.1.2. Modifications de la teneur en acides gras en réponse à la température

Les différentes gammes de températures obtenues à travers le décalage de semis et les séquences climatiques (2002 et 2003), mettent en évidence des modifications dans la cinétique d'évolution du

pourcentage en acides gras saturés et insaturés en réponse au variation de températures pendant les différentes phases précédemment identifiées. Ces modifications seront présentées en fonction des séquences climatiques.

3.1.2.1. Cas d'un génotype standard

Acides gras insaturés

Durant la première phase d'évolution de la teneur en C18:1 (ϕ_1), le maximum est atteint plus tardivement dans le cas de la date de semis tardive (27 JAF) par rapport à la date de semis classique (20 JAF) lors de la campagne 2002 (Figure 58). Rappelons que la teneur en C18:1 finale dépend de l'action successive de deux enzymes. La $\Delta 9$ désaturase transforme le C18:0 en C18:1; et la $\Delta 12$ désaturase convertit le C18:1 en C18:2. Cette dernière est inhibée lorsque les températures sont plus élevées (Garcès *et al.* 1992) et son maximum d'activité se situe à 20 JAF selon une étude réalisée *in vitro* (Garcès et Mancha, 1991). Le maximum d'activité de la $\Delta 9$ désaturase est plus précoce (12 JAF) (Kabbaj *et al.*, 1996). La phase ϕ_1 , comprenant le maximum de C18:1, résulte également de l'activité de ces deux enzymes. Dans nos conditions expérimentales, bien que les températures soient constantes entre F1 et M0, la chute de température entre M0 et M2 dans le cas du semis tardif a entraîné un ralentissement du cycle et donc une augmentation de la durée de cette phase. Il en résulte probablement une meilleure activité de désaturation du C18:0 dans le cas du semis tardif qui pourrait expliquer la teneur en C18:1 plus élevée en fin de f_1 . Des conditions de températures plus fortes (semis tardif par rapport au semis classique en 2003) montrent un niveau plus faible de C18:1 au premier prélèvement (Figure 58). Ces résultats suggèrent une régulation par la température de l'enzyme $\Delta 9$ désaturase responsable de la formation du C18:1 durant la phase f_1 .

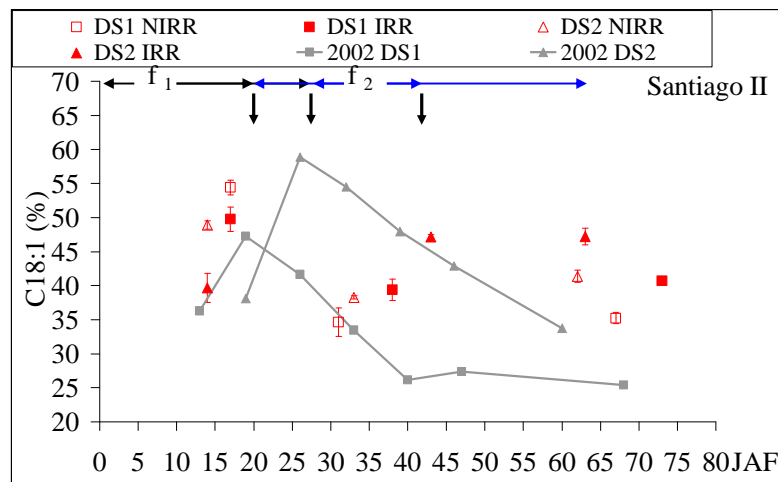


Figure 58 : Teneur en acide oléique (C18:1) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. La courbe grise rappelle l'évolution de la teneur en C18:1 lors de la campagne 2002; % de C18:1: %/aux acides gras totaux.

La cinétique de la phase ϕ_2 , débutant autour du 25^{ème} JAF, diffère également en réponse au décalage de semis. Des températures globalement plus froides pendant ϕ_2 lors de la campagne 2003 (semis tardif par rapport au semis classique durant les phases M0-M2 et M2-M4) explique le prolongement de la conversion du C18:1 en C18:2 par l'enzyme $\Delta 12$ désaturase. Il en résulte une diminution de la teneur en C18:1 plus intense et plus longue dans le cas du semis tardif mais qui ne suffit pas à rattraper le niveau final en C18:1 du semis classique. Les conditions de températures de l'année 2003, globalement plus élevées par rapport à 2002 (+ 3.1 et 6.7°C entre F1-M0 et M0-M2 respectivement), permettent d'atteindre la teneur maximum en C18:1 dès 31 à 38 JAF (second prélèvement à 560 à 680°CJAF). Ces résultats indiquent que la durée de la phase ϕ_2 est réduite sous l'effet de l'élévation de température qui résulte du raccourcissement du cycle en réponse au décalage de la date de semis. Par ailleurs, bien que la cinétique de 2003 ne présente probablement pas le maximum en C18:1 de la phase ϕ_1 , les niveaux relativement supérieurs ou égaux des pourcentages en C18:1 entre 32 et 44 JAF (2^{ème} prélèvement) dans le cas de températures plus élevées (semis tardif) montrent que la conversion du C18:1 en C18:2 est moins active durant ϕ_2 . Ces résultats suggèrent que la réduction de la teneur en C18:1 finale sous l'effet de l'élévation de températures dépend de la durée d'activité associée à l'efficacité de l'enzyme $\Delta 12$ désaturase durant la phase ϕ_2 .

La teneur en C18:2 chez le génotype standard présente une évolution inverse à celle du C18:1. L'élévation de température induit une baisse de C18:2 durant toutes les phases de maturation. Cette réduction illustre l'inhibition de l'activité et la réduction de la durée d'activité de la $\Delta 12$ désaturase

en réponse à la hausse de température durant la phase ϕ_2 (semis classique en 2002 et semis tardif en 2003), qui conduit à une plus faible teneur en C18:2 à maturité (Figure 59).

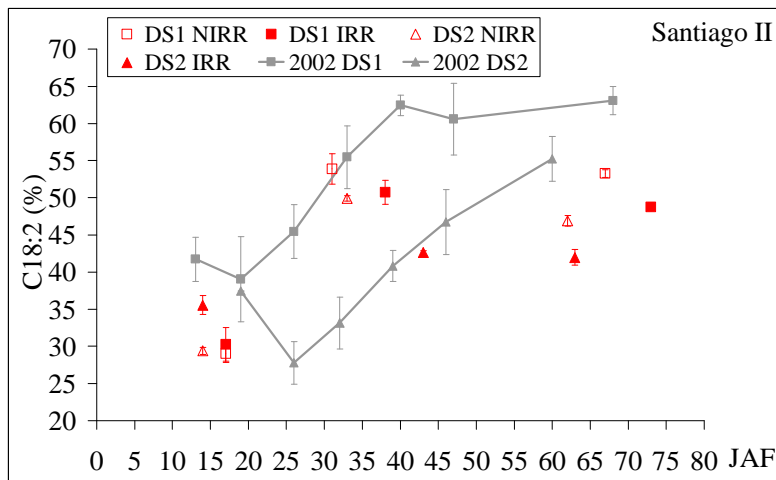


Figure 59 : Teneur en acide linoléique (C18:2) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. La courbe grise rappelle l'évolution de la teneur en C18:2 lors de la campagne 2002; % de C18:2: %/aux acides gras totaux.

Acides gras saturés

La transformation des acides gras saturés correspondant à la diminution de leur teneur (première phase) s'arrête précocement en réponse à des températures chaudes (+1.1°C entre M0 et M2 dans le cas du semis classique en 2002) et conduit à augmenter le niveau final (Figure 60 a et b). La teneur en C16:0 diminue jusqu'à 20 JAF (270°CJAF) dans le cas du semis classique alors qu'il intervient 6 jours plus tard dans le cas du semis tardif (380°CJAF). De même, la teneur en C18:0 diminue jusqu'à 33 JAF (475°CJAF) dans le cas du semis classique alors que dans le cas du semis tardif, elle diminue jusqu'au 46^{ième} JAF (630°CJAF). La seconde phase de stabilisation des acides gras saturés qui arrive plus précocement en réponse à une hausse de températures est synchronisée avec celle la seconde phase d'évolution de la teneur en C18:1 (semis classique 20 JAF, semis tardif 25 JAF en 2002). Ces résultats suggèrent que les variations des teneurs en acides gras saturés en réponse à l'élévation de températures résultent de la régulation enzymatique de la synthèse des acides gras insaturés, plutôt qu'un effet de la température directement sur leurs synthèses.

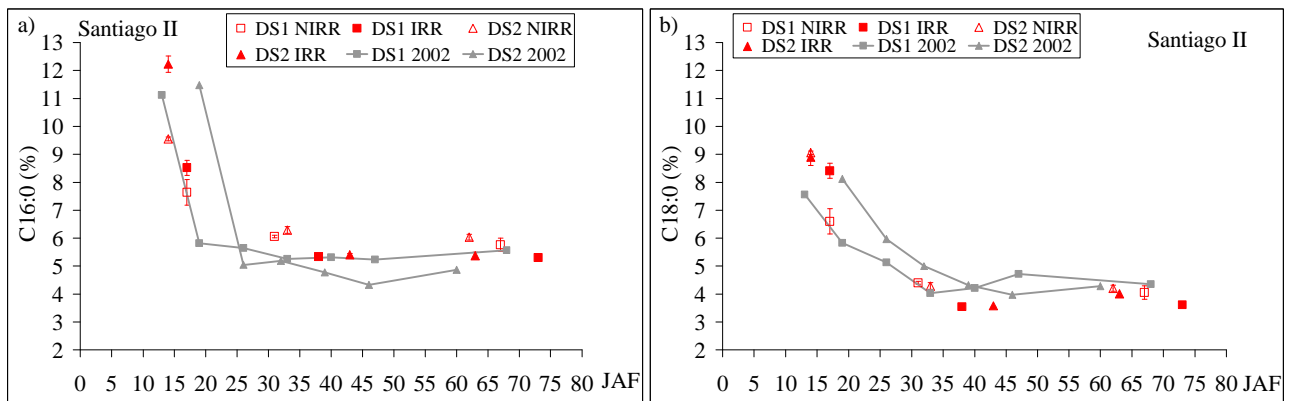


Figure 60 : Teneur en acides palmitique (C16:0) (a) et stéarique (C18:0) (b) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. Les courbes grises rappellent l'évolution des teneurs en C18:0 et en C16:0 lors de la campagne 2002; % de C18:0 et C16:0: %/aux acides gras totaux.

3.1.2.2. Cas d'un génotype oléique

Acides gras insaturés

Contrairement au génotype standard, le génotype oléique ne présente pas de modifications significatives sous l'effet des différentes gammes de températures obtenues à travers le décalage de la date de semis. Conformément aux données précédemment acquises sur d'autres génotypes (Garcès *et al.* 1989), ces cinétiques témoignent de la relative stabilité des génotypes oléiques en réponse aux variations de températures (Figure 61).

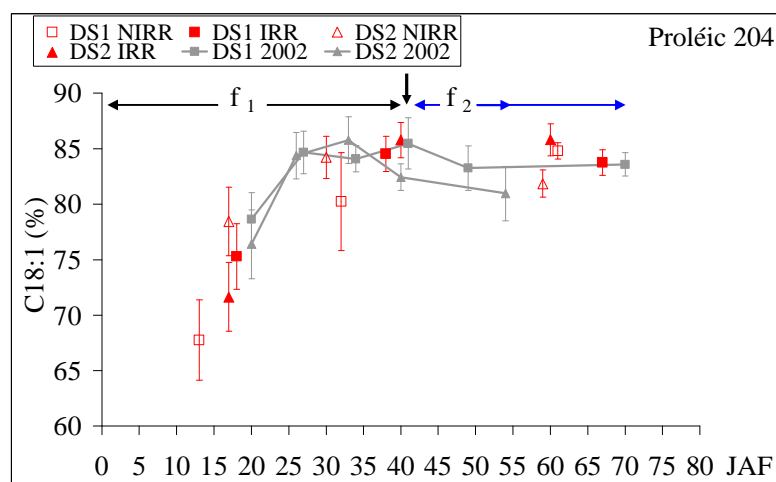


Figure 61 : Teneur en acide oléique (C18:1) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Proléic 204 selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. La courbe grise rappelle l'évolution de la teneur en C18:1 lors de la campagne 2002; % de C18:1: %/aux acides gras totaux.

Les faibles teneurs caractéristiques du génotype oléique présente une cinétique d'évolution stable vis-à-vis de la teneur en C18:2 et ne permet pas de mettre en évidence un comportement significatif distinct dans l'évolution de la teneur en C18:2 en réponse aux variations de températures.

Acides gras saturés

Concernant les acides gras saturés, les teneurs en C16:0 et C18:0 (2002) se stabilisent globalement en même temps (40 JAF, 550°CJAF) (Figure 62 a et b). A 30 JAF, le niveau en C16:0 plus élevé en réponse à une hausse de température (+2°C entre M0 et M2 en semis tardif en 2003), traduit un effet négatif des fortes températures dès ce stade sur l'utilisation de cette molécule dans la synthèse des acides gras insaturés. Il en est de même dans le cas du C18:0 pour lequel on note une supériorité de teneur dès le 30^{ème} JAF (470°CJAF) en réponse à l'élévation de températures dans les différentes situations. Ce fonctionnement réduit explique les teneurs finales en C18:0 et C16:0 significativement plus élevées en réponse à la hausse de températures.

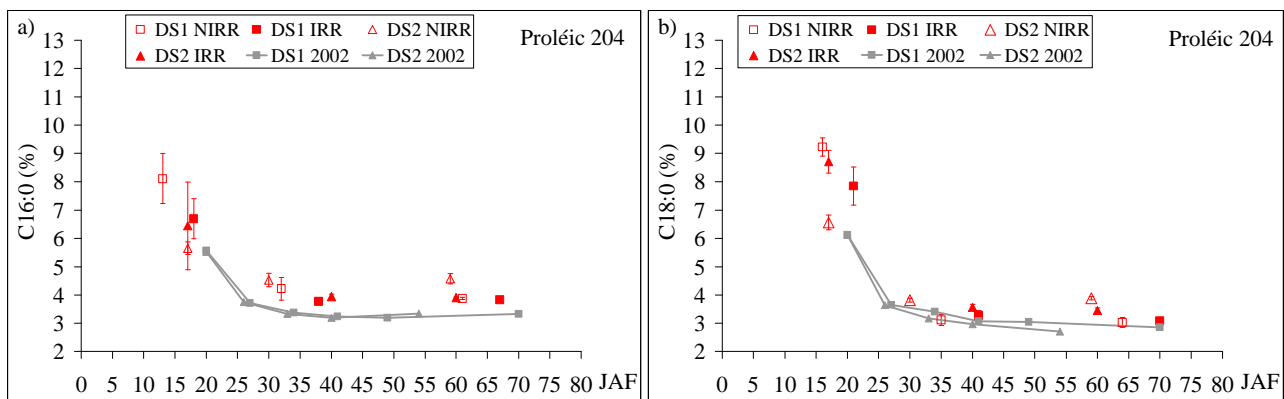


Figure 62: Teneur en acides palmitique (C16:0) (a) et stéarique (C18:0) (b) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Proléic 204 selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. Les courbes grises rappellent l'évolution des teneurs en C18:0 et C16:0 lors de la campagne 2002; % de C18:0 et C16:0: %/aux acides gras totaux.

3.1.3. Modifications de la teneur en acides gras en réponse à la contrainte hydrique

3.1.3.1. Cas du génotype standard

Acides gras insaturés

Les faibles niveaux de stress hydriques durant la campagne 2002 n'ont pas permis de mettre en évidence un effet de la disponibilité hydrique sur la cinétique de formation des acides gras insaturés. En revanche, lors de la campagne 2003, les stress hydriques de niveau 5 ont influencé les synthèses en acides gras insaturés dès le début de maturation des graines (premier prélèvement) (Figure 58).

Dans le cas du C18:1, bien que le maximum soit probablement formé plus tardivement, la teneur en C18:1 est plus élevée dès le 18^{ème} JAF lorsque le déficit hydrique est plus marqué. Il semble donc que lors de la phase φ_1 , le niveau maximum atteint soit supérieur en réponse au manque d'eau. Durant la phase φ_2 , dès 32 JAF (560°CJAF), il apparaît également que les déficits hydriques plus intenses (conditions non irriguées) diminuent le niveau de C18:1.

Comme en réponse à l'élévation de température, cette augmentation suggère la modification des deux systèmes enzymatiques responsables de la formation-transformation du C18:1 en cas de stress hydrique.

En conditions de contraintes hydriques contrôlées, la durée de transformation du C18:1 apparaît réduite quelle que soit l'intensité du stress par rapport à la condition d'alimentation hydrique témoin conduite à 70% de l'ETM (Figure 63). Ainsi, la teneur en C18:1 se stabilise à partir de 32 JAF alors que les stress hydriques montrent une stabilisation plus tardive (entre 40 et 45 JAF) conduisant à la réduction de la proportion en C18:1 à maturité.

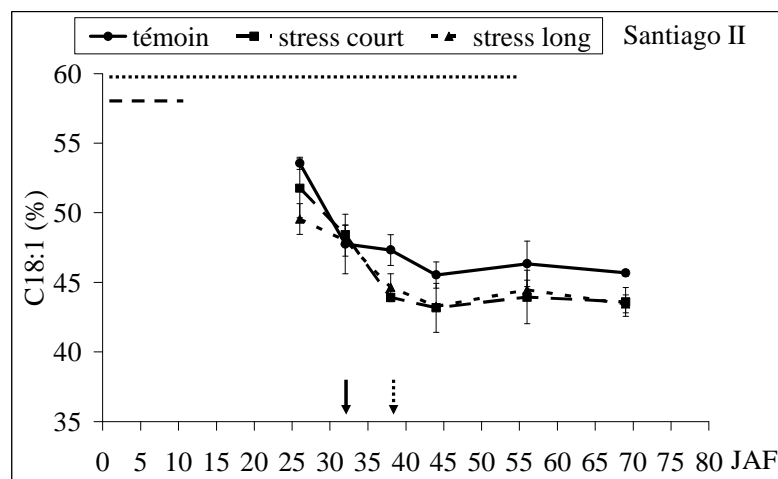


Figure 63 : Teneur en acide oléique (C18:1) en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique pour Santiago II

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours). Les lignes pointillées schématisent les périodes d'application des stress courts et long. Les flèches représentent les maxima d'accumulation des différents traitements. En trait pointillé: maxima pour les régimes hydriques stressés (stress long et court); en trait plein: maxima pour le régime hydrique conduit à 70% ETM; % de C18:1: %/aux acides gras totaux.

Acides gras saturés

Lors de la campagne 2003, les teneurs en acides gras saturés évoluent de la même façon que celle du C18:1 conduisant à un niveau plus faible dès le second prélèvement (Figure 60). Dans nos conditions expérimentales, ce niveau est maximal entre 31 et 33 JAF (560 et 660 °CJAF) en condition non irriguée et entre 38 et 43 JAF (680 et 735 °CJAF) dans les conditions irriguées. Ce décalage est dû à l'accélération du cycle lorsque le déficit hydrique augmente (sénescence foliaire

précoce et dessiccation des graines plus rapide). De faibles disponibilités hydriques semble influencer sur la vitesse d'utilisation des deux acides gras saturés et explique les teneurs plus élevées en fin de cycle.

3.1.3.2. Cas du génotype oléique

Acides insaturés

Le génotype oléique (Proléic 204) se caractérise par une relative stabilité des teneurs en C18:1 et C18:2 dans le temps en réponse à une contrainte hydrique (Figure 61). La rapidité d'accumulation des acides gras insaturés (35 JAF) explique principalement ce comportement. De plus, les fortes quantités en C18:1 accumulés à maturité ne permettent pas de mettre en évidence de façon significative les faibles variations de cet acide en réponse aux déficits hydriques.

Acides gras saturés

Les cinétiques d'évolution sont globalement semblables pour ces deux acides gras selon les conditions d'alimentation hydrique (Figure 62 a et b). Notons toutefois une légère supériorité des teneurs dès 30 JAF dans le cas de stress hydrique sévère (niveau 5) qui se maintient jusqu'à la maturité physiologique.

3.2. Quantités d'acides gras insaturés sous l'effet des facteurs agri-environnementaux

Au niveau de la plante entière, les quantités d'acide oléique et linoléique accumulées dans les akènes au cours de la maturation des graines (Figure 64) sont significativement affectées par les conditions de culture (température et disponibilité hydrique). Cette expression permet de prendre en compte les différentes modifications engendrées en réponse aux variables culturales de la fraction « acides gras » dans l'huile, de la fraction « huile » dans la matière sèche et de la fraction « matière sèche » dans la graine.

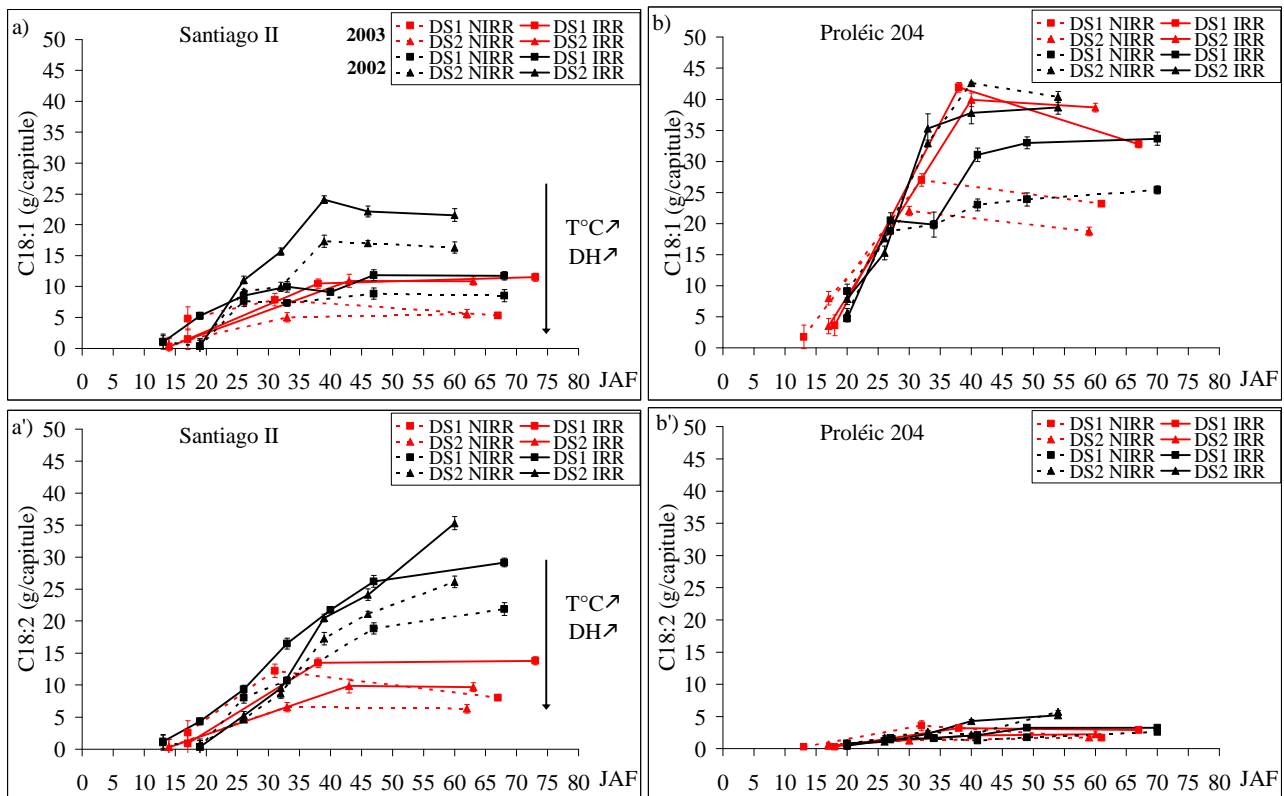


Figure 64 : Accumulation d'acides oléique (C18:1) (a et b) et linoléique (C18:2) (a' et b') dans les graines (g/capitule) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II (a et a') et Proléc 204 (b et b') selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003

NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique irrigué. DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive. MS: matière sèche. T°C ↗: températures croissantes; DH ↗: déficit hydrique croissant.

Dans les graines des deux génotypes, l'accumulation de C18:1 par capitule se compose d'une phase de synthèse active et une phase de stabilisation; alors que celle du C18:2 est continue jusqu'à la maturité. Chez l'hybride standard, les quantités d'acides gras insaturés diminuent avec l'augmentation des contraintes hydrique et thermique. Pour les quantités de C18:1, l'évolution est croissante jusqu'à environ 40 JAF (Figure 64 a). Il s'en suit une phase pendant laquelle la quantité en C18:1 n'évolue plus. En revanche, les quantités en C18:2 évolue jusqu'en fin de maturité des graines, en particulier dans les conditions les moins sévères d'un point de vue température et déficit hydrique (Figure 64 a').

Dans le cas du génotype oléique, le profil d'accumulation est différent. La synthèse d'acide oléique est très importante et peu différente entre conditions jusqu'à 25 JAF (Figure 64 b). Au-delà de ce stade, l'évolution des quantités varie principalement selon les traitements hydriques. Globalement, les conditions non irriguées conduisent à un arrêt d'accumulation précocement (vers 30 JAF), tandis que la situation irriguée induit une accumulation prolongée jusqu'à environ 40 JAF. L'effet de la hausse de températures n'est pas significatif indépendamment de son interaction avec de faibles

niveaux d'alimentation hydrique. Le profil d'accumulation du C18:2 varie très peu dans les graines du génotype oléique vis-à-vis des contraintes thermiques et hydriques (Figure 64 b').

4. Accumulation des phytostérols

4.1. Cinétique d'accumulation dans la graine entière

Afin d'identifier la période d'accumulation maximale des phytostérols dans les graines en maturation, l'évolution du contenu phytostérolique a été suivie durant deux campagnes en plein champ sur le génotype Santiago II.

Dans les akènes nouvellement formés, le taux de phytostérols est élevé, puis il décroît au cours de la maturation des graines pour atteindre à la récolte environ un tiers du taux initial (-36%) (Tableau 38).

Les déméthylphytostérols présentent une accumulation similaire de celle des phytostérols totaux (-63, 84 et 67% dans le cas du β sitostérol, stigmastérol et campestérol respectivement) (Tableau 38). Il en est de même pour l'évolution des diméthyl stérols, présents dans de plus faibles proportions, dont la concentration entre le début de remplissage et la maturité des graines varie de 65, 82 et 73% en moyenne pour le Δ^7 stigmastérol, le Δ^5 avénastérol et le Δ^7 avénastérol. En revanche, dans le cas des méthylstérols, les concentrations apparaissent globalement stables (-5.4mg/100g d'huile) alors que celles des diméthylstérols indiquent une légère croissance durant la même période, en particulier dans le cas du cycloartérol (+22%).

Tableau 38 : Concentration en déméthyl, méthyl et diméthyl phytostérols des graines du génotype Santiago II en fonction des jours après floraison (JAF) dans les conditions naturelles de 2002 et 2003 pour la situation date de semis classique*régime irrigué

Catégorie de phytostérols	Année expérimentale JAF	2002			2003		
		17	38	73	13	33	68
Phytostérols totaux (mg/100g d'huile)		837.7±66.2	604.3±94.7	326.3±13.1	1086.6±69.4	421.8±11.4	366.1±9.2
Déméthylphytostérols (mg/100g d'huile)	βSítostérol	462.0±33.3	336.5±39.0	184.0±12.2	590.5±44.3	241.3±2.1	204.1±5.1
	Campestérol	65.3±0.7	37.1±3.5	24.6±2.7	86.0±6.4	29.1±0.3	25.2±0.4
	Stigmastérol	99.8±4.9	38.5±1.8	19.1±0.2	163.7±8.1	28.6±0.3	23.8±0.5
	Δ7stigmastérol	61.3±5.5	38.6±2.3	19.7±4	74.2±5.0	31.5±0.9	28.4±1.2
	Δ7avenastérol	38.0±3.7	27.4±3.5	12.0±1.4	36.5±2.4	10.8±0.8	8.5±0.3
Méthylphytostérols (mg/100g d'huile)	Δ5avenastérol	48.1±5.9	35.0±5.2	9.6±2.8	60.5±2.8	15.7±0.6	10.4±0.3
	Gramistérol	13.3±1.7	12.8±0.3	5.1±0.9	12.1±0.6	12.2±1.0	8.7±0.3
Diméthylphytostérols (mg/100g d'huile)	Citrostadiénol	27.9±4.6	24.7±0.8	24.7±0.9	27.7±4.3	26.0±1.1	20.1±1.0
	Cycloarténol	17.7±1.0	17.7±0.9	23.8±0.6	21.6±0.4	23.7±1.6	26.1±0.4
	Méthylène cycloartanol	6.6±2.6	8.4±2.9	13.3±1.4	11.4±0.9	7.1±0.2	10.8±0.2

Bien que ces résultats ne représentent que des tendances générales en raison du trop faible nombre de prélèvements, elles montrent une diminution globale du contenu stérolique final de la graine en cours de maturation.

En conditions contrôlées, la concentration en phytostérols totaux évolue de la même manière en conditions d'alimentation hydrique témoin, le maximum étant caractéristique de graines non mures.

Les cinétiques établies en conditions contrôlées permettent de dégager un effet positif significatif d'un stress hydrique sur la concentration en phytostérols totaux (Figure 65). La concentration en phytostérols est globalement stable quelle que soit la durée des stress alors que le régime hydrique témoin conduit à 70%, entraîne une diminution progressive jusqu'à maturité (-32%).

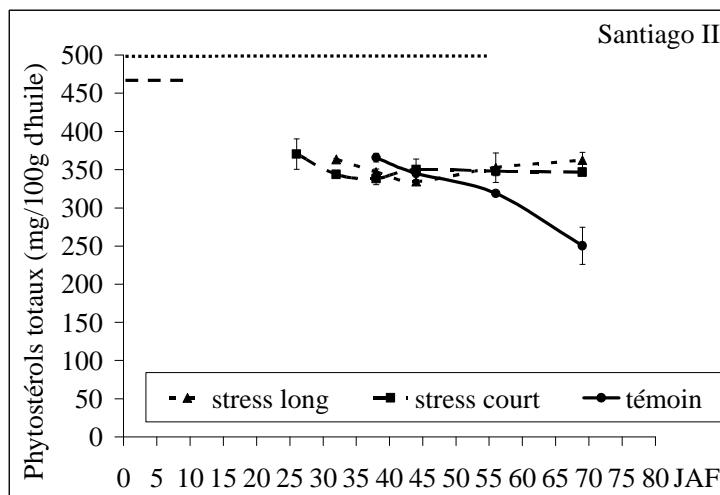


Figure 65 : Concentration en phytostérols totaux du génotype Santiago II en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique

Témoin: régime hydrique conduit à 70% ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours). Les lignes pointillées schématisent les périodes d'application des stress courts et long.

Les concentrations en déméthylstérols, correspondant aux stérols végétaux accumulés en majorité dans la graine mature, sont également plus élevées lorsque les plantes sont soumises à un stress hydrique (Figure 66). Ces résultats confirment les tendances obtenues en milieu naturel en conditions de déficits hydriques sévères (chapitre III).

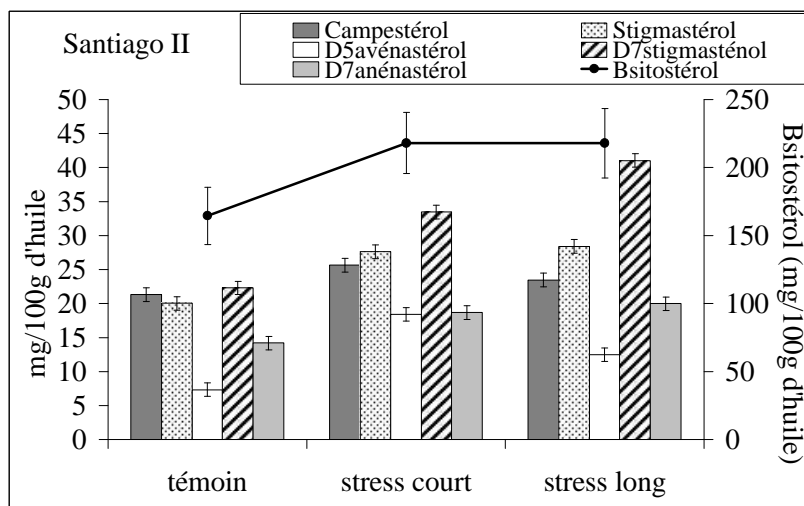


Figure 66 : Concentration en déméthylphytostérols du génotype Santiago II à la récolte en conditions contrôlées en fonction des différentes conditions d'alimentation hydrique

Témoin: régime hydrique conduit à 70% de l'ETM, stress court: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin floraison (10 jours), stress long: régime hydrique conduit à 55% ETM du début de la floraison jusqu'à la fin de maturation des graines (M2) (55 jours).

4.2. Répartition des phytostérols dans la graine

Les phytostérols sont des composés mineurs de la graine de tournesol. Généralement extraits de l'huile par saponification, la répartition de ces composés au sein des différents compartiments de la graine (coque, amande) est encore peu connue. Ces informations présentent toutefois un intérêt dans le domaine industriel pour la valorisation spécifique des coques comme source éventuelle de phytostérols.

L'étude a été réalisée sur deux génotypes de tournesol: un génotype standard (Santiago II) et un génotype oléique (Proléc 204) cultivés au cours de la campagne 2003.

Le pourcentage de phytostérols totaux de la coque représente en moyenne un quart des phytostérols contenus dans la graine pour les deux génotypes étudiés (Figure 67 a et b).

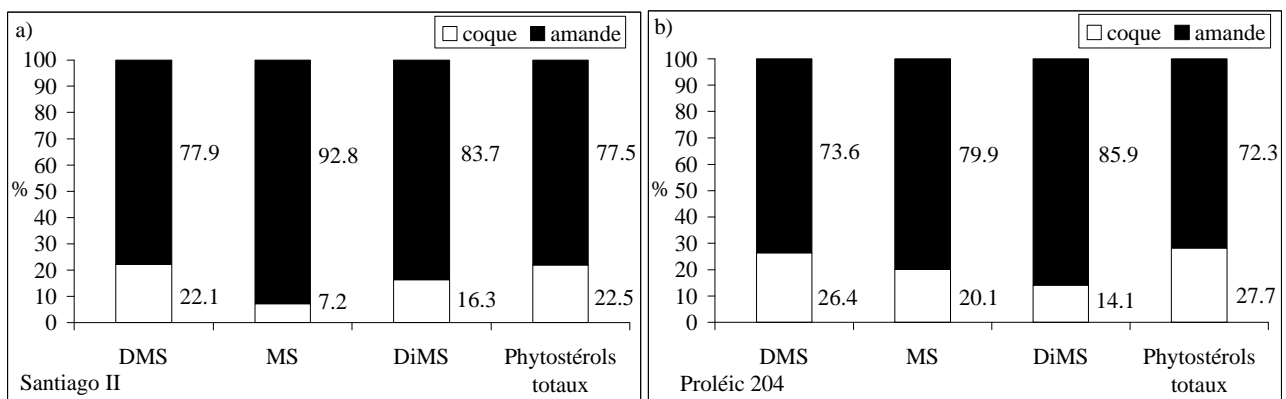


Figure 67 : Répartition des catégories de phytostérols au sein de la coque et de l'amande dans le cas d'un génotype standard (a) (Santiago II) et d'un génotype oléique (b) (Proléc 204)

Les génotypes affichent des différences de répartition, cependant non significatives, entre phytostérols totaux et selon la catégorie de phytostérols. Les déméthylstérols, correspondant aux produits finaux de la biosynthèse des phytostérols, représentent la plus faible proportion de l'amande (75.8% en moyenne) par rapport aux intermédiaires de biosynthèse dont le pourcentage atteint 86.4 et 84.8% pour les méthyl et diméthylstérols respectivement. La fraction coque renferme majoritairement des déméthylstérols (24.3%). Ces résultats montrent qu'il existe des stérols dans la fraction coque de la graine dont le rôle est de protéger l'embryon. Cette répartition traduit le rôle actif des phytostérols au sein des structures membranaires. Il est cependant à noter que le décorticage manuel ne permet pas de séparer de façon homogène la coque de son tégument qui protège l'amande. Ainsi, il est possible que les phytostérols dosés dans la fraction « coque » proviennent en partie du tégument.

5. Synthèse et Discussion sur les modifications d'accumulation en réponse aux contraintes agri-environnementales

L'étude des effets de la température et de la disponibilité hydrique sur la composition de la graine implique dans certains cas d'interpréter leurs effets simultanément.

L'objectif de ce chapitre consistait à préciser le profil d'accumulation des différents composés de la graine en réponse aux variables culturales, en tenant compte des différents potentiels génétiques. L'évolution d'indicateurs de développement, comme la surface foliaire et l'accumulation de matière sèche, a également été suivie de manière à mettre en parallèle les modifications de critères de productivité avec celles de critères de qualité.

Généralement, l'élévation de température tend à diminuer l'accumulation de la matière sèche des graines dans nos conditions expérimentales. Chimenti *et al.* (2001) notent une réponse curviligne du taux de remplissage de l'embryon en fonction de la température et la durée de remplissage est minimum à 35°C. En conditions contrôlées, la dynamique d'accumulation de matière sèche est affectée pour des températures beaucoup plus élevées (> à 35°C) et l'effet est d'autant plus marqué que le stress thermique est précoce (Rondanini *et al.*, 2003).

Cependant, l'accumulation de la matière sèche dans les graines diffère selon le génotype. Dans le cas du génotype standard, la quantité de matière sèche accumulée diminue de façon concomitante à l'augmentation de température et du stress hydrique. En revanche, pour le génotype oléique, s'il n'y a pas de stress hydrique, la production de matière sèche par capitule se poursuit jusqu'à des conditions de température les plus élevées. Sous contrainte hydrique, alors que la surface foliaire photosynthétiquement active du génotype standard est fortement réduite, celle du génotype oléique se maintient.

Contrairement à l'accumulation de matière sèche, les cinétiques d'établissement de la teneur en huile sont globalement semblables chez les deux génotypes. Ceci suggère que les différences de surface foliaire par plante n'ont pas un rôle déterminant sur la teneur en huile. De plus, il a été observé en conditions contrôlées que les stress hydriques appliqués ont considérablement réduit la masse sèche des graines par plante sans modifier notablement le taux d'huile à maturité.

Toutefois, l'augmentation de l'intensité des stress hydriques entraîne une réduction de la phase de remplissage consacrée à la synthèse de la fraction lipidique quel que soit le génotype. La durée d'accumulation de la fraction huile peut varier de 10 jours, ce qui conduit à une réduction pouvant atteindre 24% de la teneur à la récolte. Conformément aux données de la littérature (Merrien *et al.*, 1992), ces résultats confirment le rôle déterminant de la durée d'activité de la surface foliaire dans l'élaboration de la fraction lipidique. La diminution de la teneur en huile est souvent le fruit de l'accélération de la sénescence foliaire provoquées par des conditions extrêmes avec pour conséquence une réorientation des transferts de photoassimilats destinés à la synthèse lipidique vers d'autres composés de la graine, comme les protéines.

En réponse à l'élévation de températures, c'est le taux d'accumulation de l'huile qui est ralenti dans les deux catégories de génotypes puisque le maximum atteint est beaucoup plus faible en fin de synthèse. En tenant compte des variations de matière sèche et de teneur en huile, la fraction huile subit des modifications de vitesse et de durée d'accumulation dans la graine en réponse à l'accentuation des contraintes thermique et hydrique. Ceci conduit à la réduction des quantités d'huile par capitule dans le cas du génotype standard en particulier. De manière générale, la teneur en huile évolue peu après 40 JAF. Cette relative stabilité indique qu'il est possible de prévoir la teneur en huile finale de la graine entre 2 à 4 semaines avant la récolte.

Globalement, le pourcentage en protéines est relativement stable dès le 10^{ième} JAF. Selon une étude réalisée par marquage radioactif au ¹⁴C (Goffner, 1989), dans les graines les plus jeunes, le carbone assimilé se dirige principalement vers la synthèse de protéines pendant que des graines plus âgées sont déjà chargées en lipides. Dès 4 semaines après floraison, la proportion de protéines est stabilisée, 80% du carbone est orienté vers la synthèse lipidique.

Bien que les variations soient relativement faibles par rapport à la fraction lipidique, la teneur en protéines augmente significativement jusqu'en fin de cycle en réponse à l'élévation de température et le processus concerne particulièrement le génotype oléique qui se différencie du standard par une hausse de 13%. En revanche, la teneur en protéines varie faiblement en réponse au déficit hydrique.

Concernant la composition en acides gras, il y a deux phases déterminent la synthèse des acides gras insaturés. Une première phase régit la formation du C18:1 (ϕ_1) tandis qu'une seconde phase correspond à la transformation de cet acide gras en C18:2 (ϕ_2). Ces deux phases résultent de l'activité successive de deux enzymes responsables de la formation et de la transformation du C18:1: la $\Delta 9$ désaturase et la $\Delta 12$ désaturase. Toutefois, dans le cas du génotype standard, la

seconde phase (ϕ_2) se caractérise par une réduction de la teneur en C18:1, alors que dans les graines du génotype oléique, cette teneur est stable.

Dans le cas du génotype standard, un niveau élevé en C18:1 en fin de première phase (ϕ_1) peut être atteint s'il y a un allongement de la phase sous l'effet de faibles températures (semis tardif campagne 2002). Une élévation de température significative (semis tardif campagne 2003) correspond à un niveau en C18:1 bas dès 15 JAF (stade M0). Des observations similaires chez le soja (Cheesbrough, 1990) suggèrent une régulation par la température de la $\Delta 9$ désaturase, l'enzyme responsable de la formation du C18:1. Dans le cas de la $\Delta 12$ désaturase, bien que son activité enzymatique diminue sous l'effet de fortes températures, l'accumulation d'ARNm est accentuée (Kabbaj *et al.*, 1996; Lagravère *et al.*, 2004).

Durant la seconde phase (ϕ_2), les températures influent sur le taux de transformation du C18:1 en C18:2 à travers l'activité de la $\Delta 12$ désaturase qui, affectée par la hausse de température (Garcès *et al.*, 1989), conduit à une augmentation du pourcentage en C18:1. Plusieurs hypothèses controversées sont proposées pour expliquer la régulation de l'activité des désaturases par la température. Parmi celles-ci, on trouve la concentration en oxygène dissous. L'oxygène moléculaire (O_2) requis pour la désaturation et sa solubilité sont significativement plus élevés à faible température. Par conséquent, si l' O_2 est le facteur limitant pour la désaturation, de faibles températures devraient améliorer l'insaturation en augmentant la disponibilité du substrat (O_2) (Harris *et al.*, 1978). Or la mesure du K_m de l'oxygène vis-à-vis de la stéaroyl-ACP désaturase de carthame ne suggère pas que l'oxygène soit le facteur majoritaire contrôlant la synthèse de C18:1 (Mc Keon *et al.*, 1982). Néanmoins, de récentes études montrent que l'activité de l'enzyme *in vivo* semble bien être régulée par la disponibilité en O_2 . Sa diffusion est limitée sous de fortes températures (Garcia-Diaz *et al.*, 2002). Ainsi la température régulerait l'activité de la $\Delta 12$ désaturase par deux moyens: un effet direct irréversible lié à la stabilité thermique de l'enzyme, et un effet indirect qui détermine la disponibilité de l' O_2 responsable de la modification réversible du niveau d'activité enzymatique (Martinez-Rivas *et al.*, 2003). D'autres études suggèrent que la fluidité membranaire pourrait être responsable de la régulation de ces modifications de désaturation dues à la température (Mazliak, 1981). Cependant, chez un autre oléagineux le carthame, les variations de fluidité membranaire ne suffisent pas à rendre compte de la variation d'activité de $\Delta 12$ désaturase (Stymne et Appleqvist, 1978).

En résumé, les cinétiques établies lors de cette étude montrent que l'augmentation de la teneur en C18:1 en réponse à la hausse de température se décompose en deux phases résultant de deux phénomènes successifs agissant en synergie et liés à l'équilibre de l'enzyme:

- un niveau en C18:1 plus faible en fin de phase φ_1 , probablement dû à une plus faible activité de la $\Delta 9$ désaturase,
- une diminution plus faible de C18:1 pendant la phase φ_2 , due à une inhibition de l'activité de la $\Delta 12$ désaturase.

Dans le cas de la campagne 2002, la phase φ_1 apparaît déterminante pour la teneur en C18:1 finale car c'est dans cette courte période que se situe le maximum d'activité enzymatique responsable de l'équilibre conversion/transformation du C18:1. Cet équilibre détermine la teneur en acides insaturés (C18:1 et C18:2). Les prélèvements de la campagne 2003 ne permettent pas de confirmer l'importance de cette phase mais montrent que le niveau de transformation du C18:2 est considérablement diminué lorsque les températures varient de 2°C (entre M0 et M2) durant la seconde phase (φ_2).

Dans le cas du génotype oléique, la déficience du système $\Delta 12$ désaturase responsable de la désaturation du C18:1 conduit à un comportement relativement stable en réponse au facteur température durant les deux phases. L'accumulation de C18:1 est effective jusqu'à environ 40 JAF, seuil au-delà duquel la teneur ne varie pas significativement. Bien que le système responsable de la formation de C18:2 dans les génotypes soit déficient dans les graines du génotype oléique, la teneur en C18:2 n'est pas négligeable. Chez le soja, il existe deux systèmes enzymatiques de désaturation du C18:1: le premier est présent dans la plante entière et le second est spécifique à la graine (Heppard *et al.*, 1996). Bien que ce ne soit pas démontré, il existerait les mêmes systèmes de désaturation chez le tournesol et les génotypes oléiques seraient mutés uniquement pour le système graine spécifique (Lagravère *et al.* 2004) et la faible proportion en C18:2 présente dans les génotypes oléiques proviendrait de la désaturation du C18:1 issu du premier système. Le C18:2 intervient dans les propriétés de fluidité des structures membranaires et au niveau des activités enzymatiques. La présence de C18:2 chez le génotype oléique, malgré la mutation de l'enzyme responsable de sa formation (la $\Delta 12$ désaturase), correspond probablement à la fraction de C18:2 contenue dans les lipides polaires qui lui permet de conserver les fonctions normales présentes aussi chez le génotype standard. Dans notre étude, il a été noté un taux relativement plus faible de C18:1 sous l'effet des températures les plus fraîches pendant la phase φ_2 (17.7°C entre M2 et M4 semis tardif en 2002). Cette diminution pourrait résulter d'une meilleure activité de l'enzyme $\Delta 12$ désaturase exprimée constitutivement qui transforme le C18:1 en C18:2.

Rappelons que les deux années expérimentales durant lesquelles les cinétiques d'accumulation des composés ont été réalisées présentent un niveau de disponibilité hydrique contrasté. La première

campagne (2002), particulièrement humide, ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet d'un déficit hydrique sur la cinétique d'établissement de la composition en acides gras. Les données de la campagne de l'année 2003 révèlent un effet positif de déficits hydriques sévères durant la phase active de la $\Delta 12$ désaturase (ϕ_2) sur la transformation du C18:1 en C18:2. Ceci suggère qu'un stress hydrique influe sur la régulation du système de désaturation du C18:1. D'après Slocombe *et al.* (1994), l'acide abscissique, induit en réponse à un stress hydrique, pourrait agir comme activateur de la $\Delta 9$ désaturase responsable de la formation du C18:1.

Nos données permettent de mettre en évidence une relation entre teneurs en acides gras insaturés et teneur en eau quels que soient la situation et le génotype (Figure 68). Dès 60% de teneur en eau, la teneur globale en acides gras insaturés semble fixée.

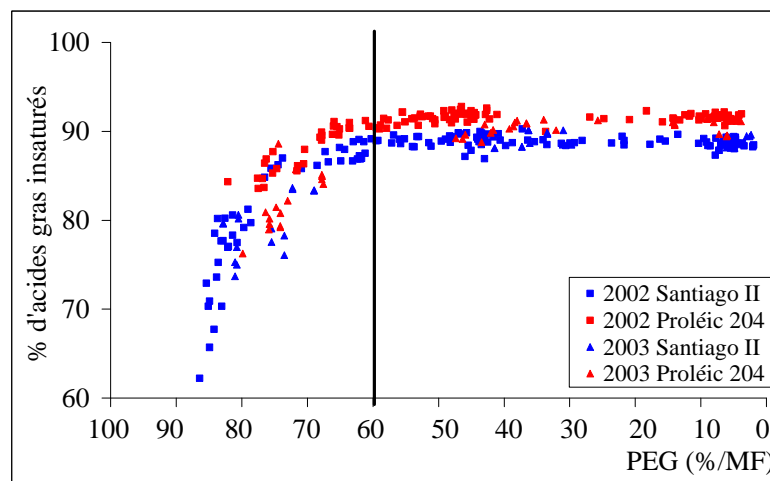


Figure 68 : Pourcentage d'acides gras insaturés en fonction du pourcentage d'eau des graines (PEG) Santiago II et Proléic 204 dans les conditions naturelles de 2002 et 2003

MF : matière fraîche

Cette relation permet d'envisager la teneur en eau de la graine comme un indicateur physiologique précoce de la teneur en acides gras insaturés. En outre, cela suggère que la détermination de la composition en acides gras dépend de la vitesse de maturation des graines qui est modifiée en réponse aux conduites de culture.

D'après les phases d'évolution de la teneur en C18:1 identifiées (*cf* Figure 56), la teneur en C18:1 dans les graines des génotypes standard évolue jusqu'à la fin du cycle et ne permet pas de prévoir en cours de culture le pourcentage des graines à la récolte. En revanche, dans le cas des génotypes oléiques, dès 35 JAF environ, le taux ne varie plus ce qui laisse envisager une détermination précoce. Pour les deux génotypes, la teneur maximale en C18:1 est atteinte lorsque la graine est

encore immature, à environ 55% dans le cas de Santiago II et entre 45 et 50% dans le cas de Proléic 204. Cet indicateur pourrait également permettre de déterminer le niveau maximum de C18:1 au cours du cycle quel que soit le génotype.

Les teneurs en acides gras saturés s'accumulent selon deux phases similaires chez les génotypes oléiques ou standard. Ceci confirme la mise en place précoce de ces composés et leur rôle dans la fourniture des chaînes carbonées pour la synthèse des acides gras insaturés, qui est indépendant du facteur génotype. Globalement, il apparaît une différence dans la durée d'accumulation entre ces deux acides gras. Le C18:0 diminue entre 35 et 45 JAF jusqu'à une teneur correspondant à sa teneur à la récolte quel que soit le génotype, tandis que la teneur en C16:0 se stabilise plus précocement (entre 20 et 35 JAF). A de fortes températures (campagne 2003) correspondent un renforcement de la proportion à la fois de C16:0 et de C18:0. Ceci souligne que la période de sensibilité à la hausse de température diffère ici de celle observée pour les acides gras insaturés.

Très peu d'études s'intéressent à l'évolution de la fraction insaponifiable dans les huiles oléoprotéagineuses. Bien que le suivi des cinétiques de concentration en phytostérols soit restreint, il apparaît que le maximum est localisé en début de maturation de la graine. Les phytostérols interviennent principalement dans la structure des membranes (Schaller *et al.*, 2003). Il est donc logique que le maximum d'accumulation se situe dès le début de formation des graines au moment où les phases de divisions cellulaires sont intenses (Cresti *et al.*, 1992), divisions qui sont associées à la synthèse de molécules structurelles indispensables à l'édification des membranes cellulaires (Heppard *et al.*, 1996).

6. Conclusion

L'étude cinétique précise les modifications d'élaboration au cours du temps des composés majeurs de la graine (protéines et huile) représentant de 60 à 75% de la matière sèche contenue dans la graine, en réponse à la hausse de température et de contrainte hydrique chez deux génotypes. L'accumulation de matière sèche diffère entre génotype, notamment vis-à-vis de la contrainte hydrique. Au contraire, la synthèse de la fraction lipidique est semblable pour les deux génotypes sous l'effet de contraintes hydrique et thermique. La durée consacrée à l'accumulation de cette fraction des plantes soumises à de fortes contraintes hydriques est raccourcie. Une élévation de température moyenne conduit à réduire la vitesse de remplissage d'huile dans les graines. En revanche, la synthèse protéique débutant beaucoup plus précocement et relativement stable par rapport à l'huile, révèle des comportements qui diffèrent entre génotype jusqu'en fin de synthèse, en particulier dans le cas du génotype oléique (Proléic 204) qui se distingue du génotype standard (Santiago II) par une teneur en protéines finale plus élevée.

L'évolution de la composition en acides gras de chaque génotype révèle également des comportements différents vis-à-vis des contraintes appliquées. Bien que l'effet d'inhibition de l'enzyme responsable de la conversion de l'acide oléique en acide linoléique soit bien connue, nous avons précisé les modifications des différentes phases intervenant dans l'élaboration des acides gras en réponse à une hausse de températures, sachant que l'acide oléique occupe une place centrale au sein de la chaîne de biosynthèse. Il apparaît globalement que le génotype oléique est stable tandis que les teneurs des graines du génotype standard sont significativement modifiées en réponse à la hausse de température. Cependant l'effet du facteur déficit hydrique est relativement moins bien connu car, à priori, cette contrainte n'implique pas la régulation de l'activité de la 12 désaturase. Aussi, nous avons entrepris de réaliser une étude comparative de ces deux génotypes par rapport à l'expression de leur potentiel génétique en réponse à d'intenses stress hydriques. La caractérisation génomique de l'expression des gènes en réponse à l'effet de cette contrainte est présentée dans le chapitre V.

Chapitre V - Caractérisation génomique: Interaction contrainte hydrique *génotype pour l'expression des gènes des métabolismes liés aux critères qualitatifs retenus

1. Avant-propos

Actuellement, les programmes de sélection traditionnelle parfois appuyés par des programmes utilisant la modification génétique présentent un objectif double. Tout en continuant d'améliorer les potentiels de production, notamment par rapport à la résistance aux maladies, ils visent à étendre la gamme de composition de la graine, notamment celle des teneurs en acides gras. Cette orientation repose sur la connaissance des mécanismes de biosynthèse des acides gras à l'échelle moléculaire; ainsi que sur la régulation de leur synthèse au niveau génomique. Les précédents chapitres ont souligné que les critères de qualité de la graine en acides gras sont sous le contrôle de facteurs extrinsèques à la graine (température et disponibilité hydrique) et intrinsèques (génotype), ainsi que de leur interaction. Aussi, les mécanismes de réponse aux conditions de contraintes hydrique et thermique correspondent à des changements physiologiques pouvant être liés à la modification des gènes ou à celle de leur expression dans les cellules.

A travers le choix de génotypes différant par la composition en acides gras de la graine (génotype oléique et standard) et par la tolérance à la sécheresse (génotypes cultivés dans des zones arides et dans des zones tempérées), il est apparu nécessaire d'entreprendre une étude de caractérisation génotypique afin de faire le lien entre les potentialités d'expression du génome et la composition finale de la graine.

2. Démarche méthodologique

La démarche se situe à deux niveaux:

- caractériser d'un point de vue génomique les génotypes choisis pour des critères agronomiques vis-à-vis de la tolérance à la contrainte hydrique,
- corrélérer la réponse (expression des gènes) de la tolérance à la contrainte hydrique avec l'élaboration de la qualité (composition en acides gras) et mettre en évidence différents comportements de sensibilité à la sécheresse vis-à-vis de l'élaboration de la qualité.

Cette étude conduite en collaboration avec les chercheurs du laboratoire Biotechnologie et Amélioration des Plantes de l'ENSA Toulouse a bénéficié des technologies mises au point sur la plate-forme Génotypage-Séquençage de la Génopôle Midi-Pyrénées et a donné lieu à une publication annexée à ce mémoire (annexe 14).

La technologie des puces à ADN (microarray) ou bio-puce utilisée est une technique de phénotypage à haut débit qui permet la mesure simultanée du niveau d'expression de plusieurs milliers de gènes, voire d'un génome entier dans des dizaines de conditions différentes physiologiques ou pathologiques. La puce à ADN déjà réalisée pour le tournesol par la Génopôle Midi-Pyrénées, nous a donné l'opportunité de quantifier les variations du niveau d'expression des gènes, induites en condition de contrainte hydrique limitante pour des génotypes différant par leur tolérance à la sécheresse et leurs critères qualitatifs.

Un total de 800 produits PCR de séquences de tournesol impliquées dans différentes voies du métabolisme de base et dans le signal de transduction a été déposé sur membrane de nylon à raison de deux dépôts pour chaque produit PCR. Parmi ceux-ci, 77 appartiennent au métabolisme des acides gras et des glycérolipides. Afin de vérifier la reproductibilité de l'analyse des puces, le dépôt a été répété deux fois sur deux membranes de nylon indépendantes, pour un même échantillon biologique. Deux répétitions biologiques ont été réalisées. L'analyse qualitative des données brutes révèle une bonne corrélation entre 2 répétitions biologiques (Figure 69 a) et 2 dépôts sur la puce d'un même échantillon biologique (Figure 69 b). Les données ont ensuite été normalisées en éliminant la variabilité totale due au traitement et à celle des membranes d'hybridation. Cette normalisation permet de s'assurer que le niveau d'expression de chaque gène n'est attribuable qu'au seul effet des gènes. Les résultats ont alors pu être analysés gène par gène afin de mettre en évidence une expression différentielle des gènes étudiés et ce dans toutes les conditions entre traitement irrigué et non irrigué, entre génotypes (tolérant/sensibles et oléique/standard) et entre organes (graines/feuilles). Une dernière analyse nous a permis d'étudier les interactions entre les différents facteurs: traitement disponibilité hydrique/génotype, disponibilité hydrique/organe et organe/génotype.

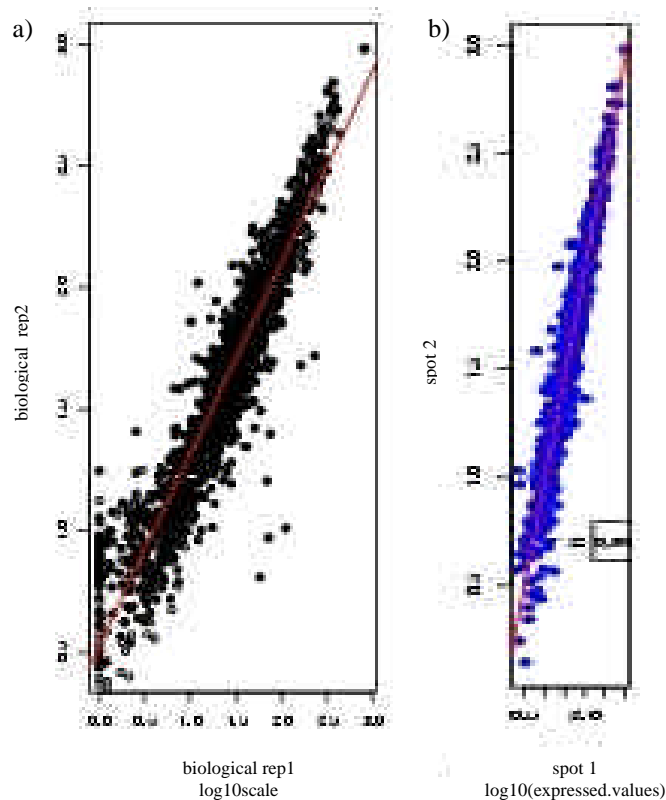


Figure 69 : Exemple de corrélation représentative de l'expression globale des gènes déposés sur la puce (a) entre répétitions biologiques et en (b) entre dépôt

La quantification du niveau d'expression des gènes a été validée par PCR quantitative (ou PCR en temps réel). Cette technique permet d'obtenir un signal fluorescent à partir d'une sonde bi-marquée dont l'augmentation de fluorescence est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

Cette étude génomique a été menée sur trois génotypes cultivés en champ dans une année à forts déficits hydriques (2003) et sur des graines prélevées au début de l'accumulation d'huile (M0) ainsi que sur les feuilles prélevées au même stade.

Le détail des techniques utilisées (microarray, PCR quantitative, analyse statistique) est développé dans l'article présenté dans l'annexe 14.

Les données de cette étude ont permis de mettre en évidence des gènes du métabolisme de base et du signal de transduction différenciellement exprimés en conditions de déficit hydrique intense et jusqu'à présent non décrits dans la littérature.

Nous présenterons dans la partie suivante les faits marquants des résultats obtenus.

3. Tolérance au stress hydrique et déterminisme de la qualité

L'étude réalisée sur les organes feuille adulte et graine, a permis de mettre en évidence 44 gènes appartenant aux métabolismes des acides aminés, des sucres, des glycérolipides et à la biosynthèse des tocophérols ainsi qu'au signal de transduction, dont le profil d'expression diffère pour les trois génotypes en réponse à un stress hydrique.

L'analyse de l'expression différentielle des gènes a révélé que 9 gènes sont réprimés sous l'effet d'un stress hydrique quel que soit le génotype (Tableau 39). Ils concernent le métabolisme des acides aminés, des protéines phosphatases et kinases et des facteurs de transcription. Ce profil d'expression reflète la réponse globale cellulaire de la plante vis-à-vis des dommages physiologiques engendrés par un stress hydrique. Les gènes identifiés codent pour des protéines telles que les peroxydases, émolases, protéines kinases, facteurs de transcription et protéines phosphatases 2A qui sont connues pour être exprimées dans la réponse générale des plantes aux stress abiotiques (Rizhsky *et al.*, 2004). A cet égard, la phosphatase est connue pour réguler négativement la synthèse d'acide abscissique (Kwak *et al.*, 2002) responsable de l'accélération de la sénescence. Cette protéine est inhibée dans des conditions de stress hydrique naturelles, ce qui suggère que la synthèse d'acide abscissique résulte de la régulation potentielle de la phosphatase 2A.

Tableau 39 : Exemples de gènes présentant une interaction génotype*stress hydrique

Nom des séquences	P value	Putative orthologue	Annotation	Catégorie fonctionnelle	Fold change		
					Ichraq	Proléic 204	Santiago II
DH0AB49ZH03RM1	1.27E-07	At1g05240	peroxidase [EC:1.11.1.7] *	Amino acids metabolism	-4.71	-1.12	-1.58
DH0AL15ZD01ZM1	5.47E-05	At2g36530	enolase [EC:4.2.1.11] *	Amino acids metabolism	-3.08	-1.02	-1.45
DH0AB001ZA12RM1	3.05E-05	At1g68550	AP2 domain transcription factor *	Transcription factor	-3.46	-1.44	-1.34
HaDplR107A05	1.08E-07	At4g31800	WRKY family transcription factor *	Transcription factor	-3.35	-1.00	-1.15
DH0ANA3ZB06FM1	8.01E-06	At1g03960	protein phosphatase 2A *	Protein phosphatase	-3.59	-1.08	-1.24
HaDplR108D06	3.13E-06	At3g58640	protein kinase family protein *	Protein kinase	-3.41	-1.18	-1.11
HaDplR201D09	4.19E-05	At1g04440	casein kinase [EC:2.7.1.-] *	Protein kinase	-2.85	-1.15	-1.21
DH0ANA13ZB05FM1	1.52E-06	At1g10940	serine/threonine protein kinase, putative [EC:2.7.1.-] *	Protein kinase	-3.75	-1.05	-1.08
DH0AQA11ZF09RM1	9.49E-10	At4g31170	protein kinase family *	Protein kinase	-4.31	-1.14	-1.14
DH0ALL29ZF03ZZM1	1.29E-05	U02949	cytosolic triose phosphate isomerase [EC:5.3.1.1]	Glycerolipids metabolism	-3.19	1.01	-1.46
DH0AFF27ZF01ZZM1	4.30E-05	At1G23800	aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein[EC:1.2.1.3] **	Fatty acids biosynthesis and	1.82	-1.74	-1.47
DH0ALL30ZA06ZZM1	1.92E-05	At1g07890	L-ascorbate peroxidase 1, cytosolic (APX1) [EC:1.11.1.11] **	Carbohydrate metabolism	2.29	-1.46	-1.31
DH0ALL9ZD02ZZM1	2.49E-05	At1g13440	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12] **	Carbohydrate metabolism	2.00	-1.38	-1.10
HACotR016B05	7.67E-06	At4g37870	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) [EC:4.1.1.49] **	Protein kinase	4.78	-1.04	-1.54
HaDplR101G03	2.65E-05	At3g58640	protein kinase family protein **	Protein kinase	1.99	-1.58	-1.05
DH0AB006ZF09FM1	5.96E-05	AF188066	isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl pyrophosphate isomerase [EC:5.3.3.2] **	Tocopherol biosynthesis	2.01	-1.18	-1.17
DH0ALL25ZA03ZZM1	3.37E-05	At1g64970	gamma-tocopherol methyltransferase [EC:2.1.1.95] **	Tocopherol biosynthesis	1.90	-1.38	-1.12
DH0AMM7ZF07ZZM1	1.29E-06	U47324	isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase [EC:5.3.3.21] **	Tocopherol biosynthesis	2.65	-1.34	-1.27
DH0AL3ZB03ZM1	2.23E-09	At2g23070	putative casein kinase II catalytic b unit [EC:2.7.1.37] **	Protein kinase	4.08	-1.13	-1.15
HM0005A12	9.93E-05	At4g37840	hexokinase 1 (HXK1) [EC:2.7.1.1] ***	Protein kinase	-1.49	1.06	2.25
DH0ALL12ZB01ZZM1	8.29E-05	At2g44680	casein kinase II beta chain, putative ***	Protein kinase	-3.47	1.46	-1.06
DH0AQA20ZH10RM1	1.98E-06	At2g28350	auxin response transcription factor ***	Transcription factor	-5.12	1.01	1.21

Les « fold change », correspondant au nombre de fois où le gène est plus exprimé (signe +) ou inhibé (signe -), ont été calculés pour 10 fois la différence par rapport aux valeurs normalisées. Les catégories fonctionnelles ont été déterminées sur Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database. NIRR: régime hydrique non irrigué; IRR: régime hydrique conduit à 70% ETM. * gènes régulés négativement dans tous les génotypes; **: gènes régulés positivement uniquement chez le génotype Ichraq; ***: gènes régulés négativement uniquement chez le génotype Ichraq.

L'analyse du profil d'expression a permis de mettre en évidence 25 gènes induits spécifiquement dans le génotype Ichraq tolérant à de faibles niveaux d'alimentation hydrique (Figure 70) et ouvre des pistes de réflexion sur les mécanismes d'adaptation des génotypes au stress hydrique et la détermination d'indicateurs de tolérance à la sécheresse.

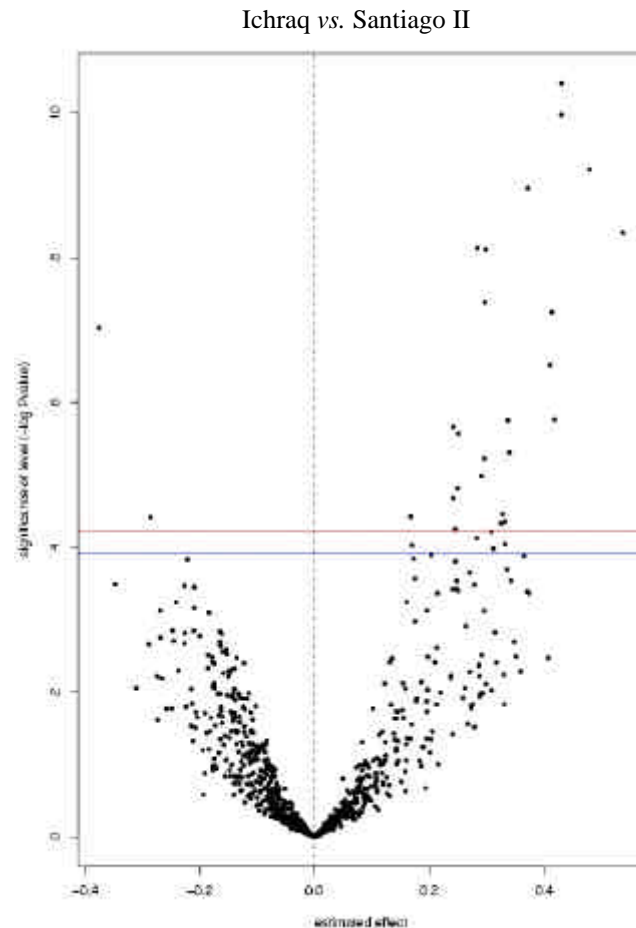


Figure 70 : « Volcano plots » représentant les gènes différentiellement exprimés entre Ichraq et les deux autres génotypes présentant une différence significative

Les gènes sont représentés par des cercles noirs. L'axe des abscisses représente les valeurs normalisées de la différence entre Ichraq et les génotypes non tolérants, l'axe des ordonnées représente le log10 de l'inverse des P-values de l'analyse ANOVA. Les lignes rouge et bleue représentent les seuils de signification pour $p=10^{-4}$ et $p=10^{-5}$ respectivement. Un total de 31 gènes sont significativement différemment entre Ichraq et les génotypes non tolérants. La majorité des gènes (28) présentent un effet interaction. Les gènes représentés dans la partie gauche de la figure correspondent aux gènes exprimés dans Ichraq alors que les gènes représentés dans la partie droite correspondent aux gènes inhibés dans Ichraq.

La régulation positive chez le génotype Ichraq de la majorité des gènes en condition de stress hydrique est liée à une réponse physiologique permettant d'esquiver les dommages cellulaires (Tableau 39). Par exemple, un gène codant pour une aldéhyde déshydrogénase induit spécifiquement dans le génotype Ichraq en réponse aux conditions de stress hydrique permet de maintenir le taux d'aldéhydes cellulaires à un taux non toxiques pour les cellules (Kirch *et al.*, 2004). C'est également le cas de l'ascorbate peroxidase dont le gène est exprimé uniquement chez

le génotype Ichraq. Cette enzyme est impliquée dans la détoxification des espèces oxygènes réactives (ROS) générées en réponse à de nombreux stress abiotiques (Kreps *et al.*, 2002; Ozturk *et al.*, 2002; Panchuk *et al.*, 2002). Des gènes impliqués dans l'adaptation cellulaire à la contrainte hydrique sont également fortement exprimés dans Ichraq: des gènes appartenant à la famille des protéines kinases induites en tant que régulateur des facteurs de transcription (phosphoenolpyruvate carboxykinase, casein kinase II). Ceci indique une régulation transcriptionnelle permettant la mise en œuvre d'une stratégie d'adaptation cellulaire au stress hydrique. Plusieurs gènes impliqués dans la synthèse des tocophérols sont régulés positivement en conditions de stress hydrique dans le génotype Ichraq comparativement au génotype Santiago II. Or l'accumulation de la concentration en tocophérols est augmentée en réponse à de nombreux stress abiotiques (forte luminosité, sécheresse, forte salinité et froid) (Havaux *et al.*, 2000; Munne-Bosch et Alegre, 2002). Ces différences d'expression suggèrent le rôle potentiel des tocophérols dans la protection des tissus contre les dommages oxydatifs qui agissent en éliminant les ROS induits en réponse à un stress hydrique (Munne-Bosch et Alegre, 2002; Collakova et DellaPenna, 2003). D'autres gènes codant pour des enzymes de la glycolyse (glycéraldéhyde 3-phosphate deshydrogénase par exemple) impliqués dans la synthèse des glucides sont induits en réponse à un stress hydrique dans le cas particulier du génotype Ichraq. L'augmentation d'expression des gènes de la glycolyse suggère que le métabolisme carboné primaire est l'une des voies de réponse aux effets des variations de disponibilité hydrique et que ces gènes sont régulés au niveau transcriptionnel.

Certains gènes sont au contraire préférentiellement sous-exprimés chez le génotype Ichraq (Tableau 39). Ils sont liés au contrôle de la division et de la différenciation cellulaire et appartiennent à la famille des protéines kinases (cdc2 kinase et hexokinase) et au facteur de transcription lié à la réponse à l'auxine (Xiao *et al.*, 2000). L'inhibition de ces gènes serait une conséquence de la réponse au stress hydrique et permettrait d'éviter les effets nuisibles du stress sur le développement et la croissance des plantes.

La régulation spécifique des gènes du génotype oléique par rapport aux génotypes standard en réponse au stress hydrique illustre le déterminisme génétique lié à la composition biochimique de la graine (Tableau 40).

Tableau 40 : Exemples de gènes présentant un effet génotype (Ichraq vs Santiago II et Proléic 204 ou Proléic 204 vs Santiago II et Ichraq) et un effet stress hydrique (NIRR vs IRR)

	Nom des séquences	P value	Putative orthologue	Annotation	Catégorie fonctionnelle	Fold change
Ichraq vs Santiago II et Proléic 204	DH0AQA14ZC04RM1	5.60E-05	At1g54100	aldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.-]	Amino acids metabolism	1.73
	DH0AMM3ZD01ZZM1	7.49E-07	At5g35360	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit (CAC2) [EC:6.3.4.14]	Fatty acids biosynthesis	-1.68
Proléic 204 vs Santiago II et Ichraq	DH0ALL12ZG03ZZM1	2.56E-05	At3g12120	omega-6 fatty acid desaturase: endoplasmic reticulum (FAD2)/delta-12 desaturase [EC:1.14.99.-]	Fatty acids desaturation	-2.14
	DH0AF22ZC10ZM1	4.93E-07	At1g13440	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	Amino acids metabolism	-1.78
	HaCot005E03	6.31E-05	At1g30120	pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit [EC:1.2.4.1]	Amino acids metabolism	-1.81
	DH0AMM15ZB11ZZM1	1.49E-05	At5g01320	pyruvate decarboxylase [EC4.1.1.1]	Carbohydrate metabolism	-1.69
NIRR vs IRR	DH0AGB16ZD02RM1	3.89E-05	At3g12120	omega-6 fatty acid desaturase: endoplasmic reticulum (FAD2)/delta-12 desaturase [EC:1.14.99.-]	Fatty acids desaturation	1.66
	DH0AQA14ZC04RM1	1.05E-04	At1g54100	aldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.-]	Amino acids metabolism	-1.59

Les « fold change », correspondant au nombre de fois où le gène est plus exprimé (signe +) ou inhibé (signe -), ont été calculés pour 10 fois la différence par rapport aux valeurs normalisées. Les catégories fonctionnelles ont été déterminées sur Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database. NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: régime hydrique conduit à 70% ETM

Le gène de l'enzyme $\Delta 12$ désaturase s'exprime différemment dans le génotype oléique par rapport aux génotypes standard sous l'effet d'un stress hydrique (effet majeur stress hydrique et génotype). Son expression est augmentée dans le cas des génotypes standard en réponse au stress hydrique alors qu'elle est affectée négativement dans le cas du génotype oléique. La surexpression de cette enzyme chez les génotypes standard laisse supposer une régulation transcriptionnelle du gène de cette enzyme et pourrait expliquer la baisse du niveau de la teneur en acide oléique des graines des génotypes standard observés en réponse au faible niveau d'alimentation hydrique (2003) (chapitre III et IV). En revanche, la régulation négative de la $\Delta 12$ désaturase dans le génotype oléique suggère la mise en place d'un mécanisme de tolérance qui rend compte de la stabilité de la teneur en acide oléique de ce type de génotype en réponse au stress hydrique.

La caractérisation des génotypes différenciés pour leur composition en acides gras a permis d'identifier 12 gènes exprimés ou inhibés spécifiquement dans le génotype oléique par rapport aux génotypes standard indépendamment de l'effet du stress hydrique

Figure 71).

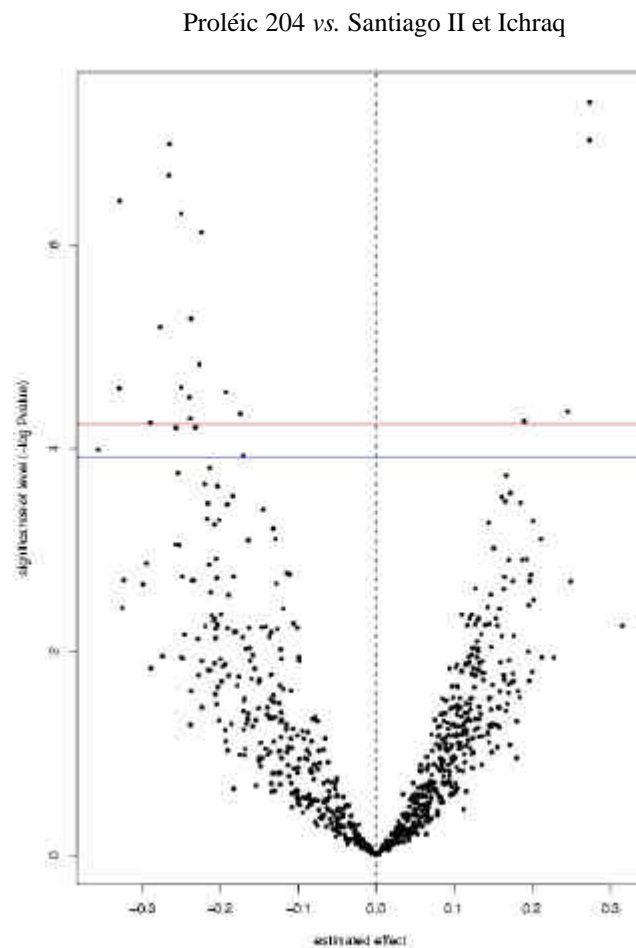


Figure 71 : « Volcano plots » représentant les gènes différentiellement exprimés entre le génotype oléique (Proléic 204) et les génotypes standard présentant une différence significative

Les gènes sont représentés par des cercles noirs. L'axe des abscisses représente les valeurs normalisées de la différence entre Proléic 204 et les génotypes standard, l'axe des ordonnées représente le \log_{10} de l'inverse des P -values de l'analyse ANOVA. Les lignes rouge et bleue représentent les seuils de signification pour $p=10^{-4}$ et $p=10^{-5}$ respectivement. Un total de 23 gènes sont significativement différemment entre le génotype oléique et les génotypes standard. La majorité des gènes (11) présentent un effet interaction. Les gènes représentés dans la partie gauche de la figure correspondent aux gènes exprimés chez Proléic 204 alors que les gènes représentés dans la partie droite correspondent aux gènes inhibés chez Proléic 204.

La plupart des gènes présentant une expression différente dans le génotype oléique par rapport aux deux autres génotypes est régulée négativement. Ce sont les gènes du métabolisme des acides aminés et ils sont liés à l'élaboration des protéines. Deux d'entre eux codent pour des enzymes participant à la formation de l'acétylCoA (pyruvate déshydrogénase, glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase, puruvate décarboxylase) qui occupe une position centrale dans la synthèse des protéines et des lipides. C'est également le cas du gène de l'acétyl-CoA carboxylase, enzyme clé dans la biosynthèse des acides gras, qui est réprimé dans le génotype oléique. Ceci suggère à nouveau que, indépendamment de la différence d'expression du gène responsable de la formation

de l'acide oléique qui résulte de la mutation oléique de ce génotype, le métabolisme général des acides gras est modifié dans ce type de génotype.

Enfin, indépendamment de l'effet génotype, notre étude a mis en évidence la régulation positive de l'expression de nombreux gènes du métabolisme des acides aminés et des carbohydrates préférentiellement dans les graines par rapport aux feuilles, ce qui reflète le rôle majeur de ces composés dans la protection des embryons au stress hydrique. La réponse spécifique de certains gènes dans les graines en réponse à la sécheresse suggère des perspectives intéressantes pour la sélection de génotypes à partir des graines.



(Capitule en maturation, J. Roche)

Chapitre VI - Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, plusieurs approches ont été mises en oeuvre permettant d'associer des connaissances agro-physiologiques, biochimiques et génomiques pour étudier l'impact des conditions agri-environnementales et du facteur génotype sur la composition de la graine de tournesol. Ces différentes approches complémentaires s'inscrivent dans une démarche concrète visant à répondre à la problématique de valorisation et de transformation industrielle des graines. L'objectif premier de ce travail était d'identifier quelques unes des meilleures combinaisons génotype*itinéraires techniques permettant de produire une récolte dont la qualité repose sur plusieurs critères utiles (qualité multicritères). Par l'investigation de la dynamique d'accumulation des constituants et la caractérisation de l'expression des gènes, ce travail a conduit à préciser les équilibres biochimiques entre les principaux constituants de la graine (huile, protéines, acides gras et phytostérols) et la réponse génotypique en situation de contraintes agri-environnementales.

Pour la réalisation de cette étude, le choix des méthodes analytiques a porté sur des techniques de pointe pour la détermination biochimique comme pour la détermination génomique, développées sur la plate-forme lipochimique (UMR INRA/ENSIACET) et aussi sur la plate-forme Génomique-Séquençage de la Génopôle Midi Pyrénées. De plus, par l'utilisation du dispositif « Rotations-qualité » de grandes cultures situé à l'UMR INRA/ENSAT Arche et des essais pluriannuels, une gamme de situations culturales a été générée. Bien que ce type d'approche représente un atout indéniable pour l'analyse des interactions génotype*milieu, il nécessitera l'élargissement à d'autres situations climatiques et à d'autres matériels génétiques pour l'approfondissement, et la validation des données acquises.

Apports sur l'élaboration de la composition biochimique

Importance du choix des génotypes d'un point de vue composition et production des graines

Le choix d'un génotype adapté est déterminant pour l'obtention d'une composition donnée de la graine. Les génotypes utilisés lors de cette étude ont été retenus sur leurs performances qualitatives (huile, acides gras, phytostérols) et/ou leur tolérance à la sécheresse. Des hybrides classiquement utilisés en France, des populations issues du Maroc et des lignées en cours de fixation pour leur

composition en phytostérols ont été exploités dans la mesure où chaque génotype est susceptible de répondre à des attentes industrielles spécifiques.

Concernant la teneur en acides gras, une large gamme de variabilité de composition est accessible par le simple choix du potentiel génétique. La teneur en acide oléique par exemple varie de 19 à 41% au sein des génotypes standard, et de 81 à 91% au sein des génotypes oléiques. Le choix du génotype est donc d'une importance capitale dans un objectif de production d'acides gras particuliers. Pour atteindre des teneurs élevées en acide oléique, nous avons vu que le recours à des hybrides oléiques permet de dépasser les seuils de 82 à 85%, voire 90%; toutefois la teneur en huile et le rendement-grains sont déprimés par rapport aux hybrides standard (perte de 3% d'huile et de 3 q/ha). De plus, les génotypes oléiques renferment une forte teneur en protéines. Il en est de même pour les populations d'origine marocaine dont la forte teneur en protéines des graines, associée à une graine plus lourde, confère des propriétés nutritives particulièrement intéressantes pour leur utilisation en graines de bouche.

La demande pour la fourniture de phytostérols est d'actualité. Les graines de tournesol peuvent constituer une source privilégiée, notamment chez les lignées qui ont été sélectionnées pour leur forte teneur en phytostérols que nous avons utilisées. Toutefois, l'expression du haut potentiel en phytostérols pour ces lignées n'est pas toujours associée à la mise en place d'un pool reproducteur et d'un rendement aussi abondants que les hybrides standard. Pour l'obtention d'une qualité déterminée, ce comportement suggère la nécessité de mettre en œuvre une sélection adaptée à la production qualitative en conditions agri-environnementales contraignantes.

La caractérisation génomique des génotypes étudiés et distincts par leur teneur en acide oléique et leur tolérance aux contraintes hydriques sévères, a révélé différents profils d'expression des gènes en réponse à des stress hydriques sévères. D'une part, le génotype marocain, adapté à de faibles ressources hydriques, met en place une stratégie de tolérance à la sécheresse par modulation de l'expression de divers gènes liés au métabolisme de base et au signal de transduction lui permettant d'être particulièrement performant en terme de production et de qualité (huile notamment). D'autre part, chez le génotype oléique, l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme lipidique est particulièrement modifiée en réponse à un stress hydrique, traduisant ainsi un processus d'adaptation spécifique.

La caractérisation génomique a été réalisée sur les tissus végétatifs (feuilles) et reproducteurs (graines). Ceci a permis de mettre en évidence la réponse spécifique de la majorité des gènes dans les graines en réponse à la sécheresse et suggère des perspectives intéressantes pour la sélection de génotypes tolérants à la sécheresse à partir des graines et non plus des plantes jeunes.

En résumé, tout en maintenant l'exigence d'une augmentation du rendement-grains, les caractéristiques qualitatives de la graine demeurent une priorité. La recherche de caractères de qualité se poursuit par l'amélioration génétique du tournesol sur les teneurs en acides gras, en phytostérols ou en tocophérols (croisements, mutations, transgénèse). Un exemple est celui de la surexpression ou l'inhibition d'enzymes clés du métabolisme stérolique (HMGR et SMT) (Schaller, 2003) permettant la modulation des teneurs en phytostérols désirés (Diener *et al.*, 2000; Nes, 2000; Szalay *et al.*, 2003).

Toutefois, l'adaptation des itinéraires techniques est indispensable pour optimiser les potentiels génétiques et réaliser les objectifs quantitatifs et qualitatifs.

Impacts des itinéraires techniques sur l'élaboration de la qualité de la graine

Par l'utilisation d'itinéraires techniques générant une gamme de variation de la température et du bilan hydrique durant les phases post-florales, il apparaît clairement que l'accumulation des composés biochimiques de la graine est régulée par ces facteurs abiotiques.

Orientation de la synthèse des constituants

L'effet des facteurs du milieu sur la composition se situe à la fois au niveau des processus physiologiques de l'activité photosynthétique qui régissent les transferts vers la graine, et au niveau de la néosynthèse des constituants.

Impact sur les processus azotés et carbonés déterminant la qualité de la graine

L'optimisation de la teneur en huile dépend principalement de la disponibilité hydrique en phase post-florale. Globalement, un déficit hydrique sévère pendant la formation de la graine réduit la proportion d'huile accumulée à maturité. La teneur en protéines étant significativement corrélée à celle de l'huile en situations de contrainte hydrique, l'accumulation d'huile se fait au détriment de celle des protéines et la teneur en protéines est maximale dans ces conditions. En effet, un déficit hydrique post-floral provoque l'accélération de la sénescence foliaire, une baisse d'activité photosynthétique qui conduit à accélérer les translocations azotées des feuilles vers les graines. Or le taux de protéines à maturité dépend des translocations azotées et la synthèse lipidique dépend de l'activité photosynthétique après floraison. Il apparaît que cet équilibre est régi par le statut azoté des plantes et que la durée d'activité des feuilles constitue un facteur déterminant la proportion d'huile et de protéines à maturité. Les données que nous avons obtenues au cours du remplissage

des graines montrent que la durée de synthèse de la fraction lipidique est raccourcie de 10 jours lorsque la contrainte hydrique est très sévère (niveau 5) entre le début floraison (F1) et la fin de maturation des graines (M2), alors que la proportion de protéines augmente de façon constante jusqu'à la maturité.

Impact sur la biosynthèse des constituants de la graine

Parmi les facteurs du milieu, la température apparaît le facteur dominant agissant sur les mécanismes de synthèses des réserves de la graine. En effet, la température durant les phases de remplissage et de maturation régule l'équilibre entre les différents acides gras de la fraction lipidique et agit plus globalement sur l'élaboration de la fraction huile.

La teneur en huile diminue en réponse à la hausse de températures. Elle est optimale lorsque les températures post-florales (F1-M2) sont inférieures à 20°C. Au-delà de cette température, la vitesse d'accumulation de l'huile ralentit (-3 % pour une augmentation de température de 1°C). L'hypothèse est celle d'une diminution de l'activité des enzymes impliquées dans la biosynthèse des lipides et de l'arrêt des transferts des photosynthétats. De fortes températures augmentent la teneur en protéines lorsque les températures dépassent 20°C entre F1 et M2.

Au-delà des modifications de répartition de chacune des fractions huile et protéines dans la graine en réponse à la hausse de température, nos résultats montrent que la somme de ces deux fractions dépend également des températures post-florales. La fraction totale (huile+protéines) diminue de 2% environ pour une augmentation de 1°C et varie de 60 à 75% par rapport à la matière sèche. Ce constat signifie que la proportion en glucides restante est susceptible de varier également en réponse aux contraintes agri-environnementales.

Toutefois, il faut noter que ces données résultent de l'effet de la température associé à celui du rayonnement incident qui régit l'activité photosynthétique de la culture, et que ce facteur, bien que de valeur relativement constante dans nos expérimentations, influe probablement sur l'orientation des synthèses lipidique et protéique.

L'équilibre biochimique entre les divers acides gras insaturés est principalement modifié en réponse aux variations de température. Toutefois, l'orientation de cet équilibre varie selon le génotype. Dans le cas des génotypes standard, lorsque la température dépasse 20°C, le ratio acide oléique/linoléique augmente de façon linéaire par rapport à l'élévation de température (augmentation de la proportion d'acide oléique et diminution de celle de l'acide linoléique). La réduction résulte d'une plus faible

activité des enzymes de désaturation responsables de la formation et transformation de l'acide oléique (la $\Delta 9$ désaturase et la $\Delta 12$ désaturase) sous l'effet d'une hausse de température. Au contraire, chez les génotypes oléiques, nos déterminations analytiques montrent une stabilité de teneur en acides gras insaturés vis-à-vis de l'élévation de température. La composition en acides gras insaturés dans les graines de ces génotypes est fixée tôt (40 jours après floraison) alors que, dans le cas des génotypes standard, elles peuvent varier jusqu'à maturité.

Les teneurs en acides gras saturés (acides palmitique et stéarique) présentent moins de variation du fait de leur faible proportion par rapport aux acides gras insaturés. Toutefois, les conditions de température régulent également leur accumulation dans la graine. La teneur en acide palmitique et stéarique est réduite à maturité lorsque les températures sont élevées (supérieures à 24°C), mais la période de sensibilité diffère de celle des acides gras insaturés.

Concernant l'accumulation des phytostérols, une hausse de température modifie également la concentration en phytostérols dans l'huile contenue dans la graine. Le ratio β sitostérol/campesterol est augmenté avec l'élévation de température. Cette variation suggère également une régulation par la température de l'enzyme stérol méthyl transférase (SMT2) qui intervient dans l'obtention des deux composés.

Les disponibilités hydriques post-florales peuvent être considérées comme le deuxième facteur de variation de la qualité, mais son effet sur les équilibres semble plus modéré. Les processus mis en jeu en réponse à une contrainte hydrique paraissent être régis par des mécanismes de régulation différents de ceux impliqués dans la réponse à l'élévation de température.

Un stress hydrique sévère pendant les phases de remplissage et de maturation des graines favoriserait l'activité des deux enzymes désaturases durant la première phase (ϕ_1) de la formation de l'acide oléique, et durant la seconde phase (ϕ_2) de sa conversion en acide linoléique. L'accumulation d'acide oléique est accentuée en réponse à un stress hydrique. La caractérisation génomique de l'expression différentielle des gènes en conditions de contrainte hydrique montre que l'accumulation d'ARNm correspondant au gène de la $\Delta 12$ désaturase augmente en situation de stress. Il en résulterait une augmentation de la quantité d'enzyme responsable de la formation plus importante d'acide linoléique en condition de contrainte hydrique. Dans le cas d'une hausse de température, l'accumulation d'ARNm est également accrue et correspondrait à une tentative de compensation cellulaire en réponse à la baisse d'activité enzymatique (Kabbaj *et al.*, 1996), et parallèlement, cette hausse de température inhibe l'activité de l'enzyme (Garcès *et al.* 1989). Il

semble donc que, contrairement à l'effet de températures élevées, d'autres processus de régulation de cette enzyme soient impliqués en réponse à un stress hydrique.

Comme pour la teneur en acide linoléique, nos résultats montrent une augmentation de la concentration en phytostérols totaux en conditions de stress hydrique. Il est connu que les acides gras polyinsaturés et les phytostérols sont constitutifs des structures membranaires et jouent un rôle protecteur contre les réactions d'oxydation (Cresti *et al.*, 1992; Piironen *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 2003). Ceci pourrait expliquer qu'ils s'accumulent plus fortement dans la graine dans le but de protéger l'embryon contre les dommages engendrés par un stress hydrique.

Outre la meilleure connaissance de l'établissement des équilibres biochimiques dans la graine, les données acquises lors de ce travail montrent qu'il est possible de rechercher l'amélioration de plusieurs caractères à la fois en terme de qualité technologique de la graine.

Propositions d'itinéraires techniques adaptés pour l'obtention d'une composition recherchée: marges de manœuvre

Dans l'objectif de valoriser les composés de la graine à des fins industrielles, la connaissance des mécanismes biochimiques en condition agricole est essentielle car elle permet d'ouvrir la voie à d'autres formes d'utilisation et de transformation des graines.

L'ensemble des résultats obtenus lors des expérimentations pluriannuelles nous permet de dégager quelques propositions d'itinéraires techniques adaptés à l'obtention d'une récolte de composition définie et pouvant alimenter les filières industrielles.

Selon le type de constituant, le choix du génotype est incontournable.

Le choix de la date de semis est un élément essentiel pour la détermination des constituants huile, protéines, phytostérols et acides gras parce qu'il met en jeu la température, premier facteur influençant les équilibres biochimiques de la graine. La gestion des disponibilités hydriques post-florales est également un aspect majeur à considérer, en particulier pour les situations présentant des déficits hydriques sévères. Le Tableau 41 présente les seuils de concentrations atteints par rapport au constituant visé correspondant aux marges de manœuvre accessibles selon la date de semis, le régime hydrique et le choix du génotype.

Tableau 41: Marges de manœuvre accessibles par les itinéraires techniques (date de semis et régime hydrique) et par les géotypes pour la teneur en protéines et en huile (a), la teneur en acides gras insaturés (b), la teneur en acides gras saturés (c) et la teneur en phytostérols (d)

a)	Protéines		Huile	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
	26%	18%	54%	37%
Géotype	populations et oléique	Santiago II	Hybrides standard	populations et oléiques
marge de manœuvre	8%		17%	
Date de semis	Date de semi tardive	Date de semis classique	Date de semis classique (sauf si T°C<20°C M0 et M2)	Date de semi tardive
marge de manœuvre	8%		15%	
Régime hydrique	Sans apport d'irrigation entre F1-M0	Avec apport d'irrigation entre F1-M0*	Avec apport d'irrigation entre F1-M0*	Sans apport d'irrigation entre F1-M0
marge de manœuvre	7%		17%	

b)	C18:1		C18:2	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
	90.7%	19.4%	66.9%	1.4%
Géotype	populations et oléique	Santiago II	Hybrides standard	populations et oléiques
marge de manœuvre	71.3%		65.5%	
Date de semis	Date de semi tardive	Date de semis classique	Date de semis classique	Date de semi tardive
marge de manœuvre	9.5% (standard)		8.7% (standard)	
Régime hydrique	Sans apport d'irrigation entre F1-M0	Avec apport d'irrigation entre F1-M0*	Avec apport d'irrigation entre F1-M0*	Sans apport d'irrigation entre F1-M0
marge de manœuvre	7.4% (population)		6.7% (population)	

c)	C16:0		C18:0	
	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum
	6.6%	3.1%	2.8%	4.3%
Géotype	populations et oléique	Santiago II	Hybrides standard	populations et oléiques
marge de manœuvre	3.5%		1.5%	
Date de semis	Date de semi tardive	Date de semis classique	Date de semis classique	Date de semi tardive
marge de manœuvre	0.7% (standard et population)		0.9% (oléique)	
Régime hydrique	Sans apport d'irrigation entre F1-M0	Avec apport d'irrigation entre F1-M0*	Avec apport d'irrigation entre F1-M0*	Sans apport d'irrigation entre F1-M0
marge de manœuvre	1.2% (population)		0.8% (population)	

d)	Phytostérols totaux	
	Maximum	Minimum
	587.6 (mg/100g d'huile)	411.8 (mg/100g d'huile)
Génotype	populations et oléique	Santiago II
marge de manoeuvre	175.8 (mg/100g d'huile)	
Date de semis	Date de semi tardive	Date de semis classique
marge de manoeuvre	91.3 (mg/100g d'huile) (standard)	
Régime hydrique	Sans apport d'irrigation entre F1-M0	Conduite à 70%ETM
marge de manoeuvre	77.6 (mg/100g d'huile) (oléique)	

*: irrigation à satisfaction de 70% des besoins

Une forte proportion d'huile est caractéristique des cultures mises en place tôt (semis classique) et se développant sous l'effet des températures fraîches associé à un régime hydrique satisfaisant 70% des besoins en eau. Il serait possible d'envisager la mise en place de semis plus précoce pour améliorer la teneur en huile.

Un semis à la date classiquement retenue (en particulier lorsque les températures sont fraîches) et un régime hydrique non irrigué permettent d'optimiser la teneur en acide linoléique.

De fortes teneurs en acides stéarique et palmitique, en phytostérols totaux dans l'huile et une forte proportion de protéines sont des objectifs qu'il est possible d'atteindre par le même itinéraire: un semis tardif sans apport d'irrigation pendant les phases post-florales; et d'assurer la réalisation d'une qualité multicritères.

Enfin, un semis tardif associé à un régime irrigué permettant de satisfaire 70% des besoins en eau de la culture serait préconisé pour augmenter la teneur en acide oléique, bien que les génotypes oléiques actuels présentent des teneurs relativement stables vis-à-vis de la modification des conditions agri-environnementales.

Apports pour une approche de modélisation de la qualité

Dans de nombreux modèles de croissance et de développement du tournesol (EPIC, STICS, OILCROPSUN,...), les caractéristiques qualitatives sont généralement peu (huile, protéines) ou pas (acides gras, phytostérols) prises en compte. Il apparaît essentiel de concevoir un module agro-physiologique de l'élaboration de la composition de la graine permettant d'associer des critères qualitatifs à la prévision du rendement. La conception d'un tel module repose sur la connaissance des cinétiques d'évolution des différents composés, sur l'identification des facteurs responsables

des variations de ces composés et sur la description des équilibres et de leur évolution en fonction des facteurs limitants. L'étude réalisée a permis de fournir des données pouvant servir à l'introduction de caractères qualitatifs dans un modèle de croissance et développement du tournesol.

En ce qui concerne l'élaboration de la fraction lipidique et protéique, l'évolution de leurs pourcentages étudiée lors de cette étude peut servir de base pour créer un premier module de qualité dans la mesure où la proportion de l'huile dépend de la matière sèche accumulée dans la graine et que cette variable est déjà décrite dans les modèles de croissance et développement.

Deux types d'approches de modélisation peuvent être envisagés pour lesquelles les données acquises au cours de ce travail sont utiles. La première approche repose sur la description des cinétiques permettant de donner dans le temps le taux d'accumulation d'huile (ou de protéines) dans la graine ou le capitule (en g d'huile/graine ou capitule accumulée par jour). La seconde approche est basée sur la connaissance des équilibres dans la graine qui permet d'estimer dans le modèle un composé à partir d'un autre.

Plusieurs critères sont à prendre en considération pour créer un module d'accumulation d'huile par rapport à l'accumulation de la matière sèche des graines, comme:

- la corrélation entre la proportion d'huile et la proportion en protéines,
- la proportion globale d'huile et de protéines varie de 60 à 75% selon les conditions de température,
- la proportion de protéines est une fonction de l'INN (indice de nutrition azotée) au début de la floraison (F1),
- la proportion d'huile est une fonction de la durée de surface foliaire,
- ainsi que les modifications d'accumulation identifiées en réponse au stress hydrique et aux températures supérieures à 20°C.

Concernant la teneur en acides gras insaturés, les deux typologies de génotypes sont à introduire séparément dans la conception d'un module de qualité. Concernant les génotypes standard, notre étude a permis de mettre en évidence une corrélation significative entre la teneur en acides gras insaturés et la température à partir de la floraison. Cet effet « température » relève que deux phases d'évolution de la composition sont déterminantes pour la teneur en acides gras finale. Il est apparu

que la teneur en eau pourrait servir d'indicateur physiologique précoce permettant de déterminer la teneur en acides gras insaturés.

Perspectives

En tant qu'outil d'évaluation, voire de pilotage des conduites culturales, l'utilisation de modèle pour l'analyse des interactions génotype*milieu*conduites culturales constitue une perspective intéressante. Une première étape serait de valider les données sur d'autres sites, d'autres situations et d'autres climats, de manière à compléter le schéma d'accumulation des composés biochimiques en conditions agri-environnementales. Dans un second temps, les relations entre indicateurs physiologiques suggérés (INN et durée de surface foliaire) et composition de la graine devront être vérifiées pour concevoir un module de qualité.

Cette étude a montré une bonne marge de manœuvre pour atteindre des seuils quantitatifs par le choix judicieux de génotypes et d'itinéraires techniques adaptés à une composition des récoltes déterminée. D'un point de vue agronomique, la sélection de génotypes produisant spécifiquement plusieurs composés d'intérêt en situation de contrainte hydrique constitue une perspective intéressante pour la sélection. Cette démarche doit être associée à la performance des hybrides permettant d'obtenir des rendements optimums.

D'un point de vue physiologique, l'étude de l'effet d'un stress hydrique sur l'accumulation des acides gras présente des acquis qui méritent d'être approfondis. En effet, une cinétique ciblée sur les stades précoces du développement permettrait de décrire avec plus de précision l'arrêt de l'évolution de la composition en acides gras de la graine en fonction du niveau de stress hydrique. L'étude de l'activité des enzymes Δ^9 et Δ^{12} désaturases associée à la caractérisation de l'expression de leurs gènes permettrait de préciser des hypothèses de régulation de ces enzymes sous l'effet d'un stress hydrique intense.

Les phytostérols représentent des constituants de la graine encore mal exploités. L'accumulation dans la graine devra être précisée, notamment en début de formation des graines, ainsi que l'effet des contraintes agri-environnementales. Les données acquises ont révélé que 25% des phytostérols totaux présents dans la graine entière appartiennent à la fraction coque. Ceci suggère des possibilités intéressantes de valorisation des coques pour des applications industrielles nécessitant un décorticage préalable. Cette donnée devra être étendue à d'autres génotypes et d'autres situations culturales. D'un point de vue physiologique, l'étude de l'effet des stress hydrique et thermique sur la présence et l'activité de l'enzyme stérol méthyl transférase 2 représente une voie de recherche

intéressante dans la connaissance du rôle des phytostérols dans les mécanismes impliqués dans la protection de l'embryon contre les stress. Cette voie de recherche laisse entrevoir également la possibilité de contrôler la teneur en phytostérols à travers la modification de la présence ou de l'activité de ces enzymes.

D'un point de vue génomique, l'analyse réalisée au cours de cette étude a permis de mettre en évidence une expression différentielle des principaux gènes impliqués dans le métabolisme de base. Afin d'avoir une vision plus détaillée des gènes de qualité de la graine modifiés en réponse aux contraintes agri-environnementales, cette analyse pourrait être ciblée spécifiquement sur les gènes du métabolisme lipidique et complétée par des gènes impliqués dans le métabolisme des phytostérols.

Les connaissances agro-physiologiques permettent d'adapter la culture aux objectifs des industries de transformation. Dans ce domaine, l'amélioration des techniques analytiques peut permettre d'envisager la valorisation de composés présents en faibles teneurs, extraits de la graine entière ou de la fraction coque et d'étendre ces analyses à un nombre important d'échantillons.

Enfin, l'utilisation des matières premières végétales se développe de plus en plus dans le secteur industriel. La maîtrise des itinéraires techniques basés sur la qualité des récoltes constitue une voie d'amélioration naturelle des seuils en constituants d'intérêt industriel et constitue une perspective de recherches intéressante pouvant être étendue à d'autres cultures oléoprotéagineuses.

En conclusion, l'approche intégrative alliant caractérisations agro-physiologique, génomique et lipochimique permet d'améliorer la connaissance des interactions génotype*environnement pour une production de qualité, et, aussi de dégager des éléments de gestion de la culture de tournesol susceptibles d'orienter les synthèses vers les constituants d'intérêt industriel.

Références bibliographiques

- Abidi S.L., 2001. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography*, 935, 173-201.
- Abidi S.L., List G.R., et Rennick K.A., 1999. Effect of genetic modification on the distribution of minor constituents in canola oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76, 463-467.
- Ackerson R.C., 1984. Regulation of soybean embryogenesis by abscissic acid. *Journal of Experimental Botany*, 35, 403-413.
- Agreste, 2004. Statistiques agricoles.
- Aguero M.E., Luquez J., Pereyra V.R., et Aguirrezabal L., 2000. Stability of high oleic sunflower hybrids for grain yield and oil and oleic acid content in the sunflower sowing region of Argentina. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, I A*, 85-90.
- Aguirrezabal L., Lavaud Y., Dosio G.A.A., Izquierdo N.G., Andrade F.H., et Gonzalez L.M., 2003. Intercepted solar radiation during seed filling determines sunflower weight per seed and oil concentration. *Crop Science*, 43, 1, 152-161.
- AMSOL, 2002. Le marché du tournesol.
- Anastasi U., Cammarata M., et Abbate V., 2003. Yield potential and oil quality of sunflower (oleic and standard) grown between autumn and summer. *Italian Journal of Agronomy*, 4, 23-36.
- Antolin G., Tinaut F.V., Briceno Y., Castano V., Perez C., et Ramirez A.I., 2002. Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology*, 83, 111-114.
- Aronel V. et Kader J.C., 1990. Lipid transfert in plant. *Experiencia*, 46, 579-585.
- Asami T. et Yoshida S., 1999. Brassinosteroid biosynthesis inhibitors. *Trends in Plant Science*, 4, 9, 348-353.
- Baldini M., Giovanardi R., Thamasebi-Enferadiand S., et Vannozzi G.P., 2002. Effects of water regime on fatty acid accumulation and final fatty acid composition in the oil of standard and high oleic sunflower hybrids. *Italian Journal of Agronomy*, 6, 2, 119-126.
- Baldini M., Giovanardi R., et Vannozzi G., 2000. Effects of different water availability on fatty acid composition of the oil in standard and high oleic sunflower hybrids. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, I A*, 79-84.
- Baldini M., Vannozzi G.P., Bervillé A., et Tersac M., 1999. Yield relationships under drought in sunflower genotypes obtained from a wild population and cultivated sunflowers in rain-out shelter in large pots and field experiments. *Helia*, 22, 81-96.
- Bange M.P., Hammer G.L., et Rickert K.G., 1997. Environmental control of potential yield of sunflower in the subtropics. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48, 2, 231-240.

- Barranco T., 2004. Qualité de l'akène de tournesol: effet génotype *conduite culturale sur la teneur en phytostérols extraits de l'huile. *DEA Sciences des Agroressources, Institut National Polytechnique de Toulouse*, pp. 54.
- Bau H.M., Mohtadi-Nia D.J., Mejean L., et Debry G., 1983. Preparation of colorless sunflower protein products: effect of processing on physicochemical and nutritional properties. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 60, 6, 1141-1148.
- Bauchot A.D. et Merrien A., 1988. Teneur en protéines des graines de tournesol et état protéique foliaire: revue bibliographique. *Informations techniques CETIOM*, 101, 18-28.
- Benvenis P., 1985. Sterol Biosynthesis. *Annual Reviews of Physiology*, 37, 275-308.
- Berot S. et Briffaud J., 1983. Parameters for obtaining concentrates from rapeseed and sunflower meal. *Qualitas Plantarum Plant Foods for Human Nutrition*, 33, 2, 237-242.
- Berry E.M. et Rivlin R.S., 1997. Dietary fatty acid in the management of diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 4, 991-997.
- Blanchet R., 1987. Principaux caractères agronomiques et physiologiques déterminant la production des graines de tournesol. *Revue Française des Corps Gras*, 2, 75-80.
- Blanchet R., 1989. Physiologie agronomique du tournesol. *Rapports d'activité, INRA station d'agronomie. Castanet-Tolosan 31326*, 21-26.
- Blanchet R., Gelfi N., Dufourcq D., Hernandez M., et Decau J., 1986. Nitrogen nutrition and yield production in sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Agrochimica*, 30, 6, 481-489.
- Blanchet R. et Merrien A., 1982. Influence of water supply on assimilation, yield components and oil-protein production of sunflower. *In: Proc. Sunflower workshop, ECC plant protein programme, Athens, Greece*, 185-201.
- Blanchet R., Merrien A., Gelfi N., Cavalie G., Courtiade B., et Puech J., 1982. Estimation and comparative changes of net assimilation in canopies of maize (*Zea mays* L.), sunflower (*Helianthus annuus* L.) and soyabean (*Glycine max* L. Merrill) during development. *Agronomie*, 2, 2, 125-132.
- Blanchet R., Piquemal M., Cavalie G., Hernandez M., et Quinones H., 1988. Influence de contraintes hydriques sur la répartition des assimilats entre les organes du tournesol. *In: Proc. XII International Sunflower Conference, Novi-Sad, Yugoslavia*, 124-129.
- Blanchet R., Texier V., Gelfi N., et Rollier M., 1990. Articulation des divers processus d'adaptation à la sécheresse et comportements globaux du tournesol. *In: Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation, Points Science du CETIOM, Paris*, p.32-44.
- Blokhina O., Virolainen E., et Fagerstedt K.V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annal of Botany, London*, 91, 179-194.
- Bonjean A., 1993. Le tournesol. *Les Editions de l'environnement, Paris*, pp 242.
- Borredon M.E. et Gaset A., 2000. Quelques exemples de valorisation non-alimentaire du tournesol. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France*, 38-39.

- Bouniols A., Puech J., Mondières M., et Hernandez M., 1981. Effet d'une privation d'azote à différents stades du développement du soja (*Glycine max* L. Merrill) : conséquences sur la mise à fleurs, sur la production fructifère et sur la teneur en protéines des graines récoltées. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences, Paris*, 293, 97-102.
- Browse J., 1997. Synthesis and storage of fatty acids. In: Cellular and Molecular Biology of Plant Seed Development, ed. Larkins B.A. and Vasil J.K., Kluwer Academic Press, p.407-440.
- Bureau J., 1994. Développer les connaissances sur les produits pour maintenir la compétitivité. *Oléoscope*, In: Dossier l'utilisation des oléagineux dans l'alimentation animale, 10-11.
- Cahoon E.B., Cranmer A.M., Shanklin J., et Ohlrogge J.B., 1994. Delta 6 Hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble delta 6 palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 44, 27519-57526.
- Canclon P., 1971. Chemical composition of sunflower seed hulls. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 48, 629-632.
- Cantagallo J.E., Chimenti C.A., et Hall A.J., 1997. Number of seeds per unit area in sunflower correlates well with a photothermal quotient. *Crop Science*, 37, 1780-1786.
- Cantisano S., Martinez-Force E., et Garces R., 2000. Enzymatic studies of high stearic acid sunflower seed mutants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38, 377-382.
- Canvin D.T., 1965. The effect of temperature on the oil content and fatty acid composition of the oils from several oil seed crops. *Canadian Journal of Botany*, 43, 63-69.
- Cao Y.Z. et Huang A.H.C., 1986. Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and others species. *Plant Physiology*, 82, 813-820.
- Champolivier L. et Merrien A., 1996. Evolution de la teneur en huile et sa composition en acides gras chez deux variétés de tournesol (oléique ou non) sous l'effet de températures différentes pendant la maturation des graines. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 3, 140-144.
- Chappell J., 2002. The genetics and molecular genetics of terpene and sterol origami. *Plant Physiology*, 5, 151-157.
- Cheesbrough T.M., 1990. Decreased growth temperature increases soybean stearoyl-acyl carrier protein desaturase activity. *Plant Physiology*, 93, 555-559.
- Chenesseau A.C., Piquemal M., Borderies G., Merrien A., et Cavalie G., 1984. Transferts des photosynthétats chez le tournesol. In: Proc. XI International Sunflower Conference, Mar Del Plata, Argentina, 51-56.
- Cherif A., Dubacq J., Mache R., Oursel A., et Trémolières A., 1975. Biosynthesis of α -linolenic acid by desaturation of oleic and linoleic acids in several organs of higher and lower plants and in algae. *Phytochemistry*, 14, 703-706.
- Chimenti C.A., Giuliano J., et Hall A., 2004. Osmotic adjustment, its effects on yield maintenance under drought in sunflower. In: Proc. XVI International Sunflower Conference, Fargo, USA, 1, 261-266.

- Chimenti C.A., Hall A., et Sol Lopez M., 2001. Embryo-growth rate and duration in sunflower as affected by temperature. *Field Crops Research*, 69, 81-88.
- Chimenti C.A. et Hall A.J., 1994. Responses to water stress of apoplastic water fraction and bulk modulus of elasticity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes of contrasting capacity for osmotic adjustment. *Plant and Soil*, 166, 101-107.
- Collakova E. et DellaPenna D., 2003. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiology*, 133, 930-940.
- Côme D. et Corbineau F., 1998. Semences et germination. *In: Physiologie végétale II: Croissance et développement*, ed.Hermann and P.Mazliak, p. 185-313.
- Connor D.J. et Hall A.J., 1997. Sunflower physiology. *In: Sunflower Technology and Production, Agronomy Monograph*, ed.A.A.Schneiter and A.A.Seiler, American Society of Agronomy, p.113-182.
- Connor D.J. et Jones T.R., 1985. Response of sunflower to strategies of irrigation II. Morphological and physiological responses to water stress. *Field Crops Research*, 12, 91-103.
- Connor D.J., Jones T.R., et Palta J.A., 1985. Response of sunflower to strategies of irrigation I. Growth, yield and the efficiency of water-use. *Field Crops Research*, 10, 15-36.
- Connor D.J. et Sadras V.O., 1992. Physiology of yield expression in sunflower. *Field Crops Research*, 30, 333-389.
- Courtiade, B., 1983. La ribulose biphosphate carboxylase oxygénase. Thèse Université Paul Sabatier, Toulouse, pp.63.
- Cresti M., Blackmore S., et Went J.L., 1992. Atlas of sexual reproduction in flowering plants. *ed.Springer-Verlag, Berlin*, p.23.
- D'Amato A. et Giordano I., 1992. Effect of climate on the response of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in relation to sowing time in a southern environment of Italy. *In: Proc. XIII International Sunflower Conference, Pisa, Italy, I*, 106-112.
- De la Vega A.J. et Hall A.J., 2002a. Effects of planting date, genotype, and their interactions on sunflower yield: II.Components of oil yield. *Crop Science*, 42, 1202-1210.
- De la Vega A.J. et Hall A.J., 2002b. Effects of planting date, genotype, and their interactions on sunflower yield: I. Determinants of oil-corrected grain yield. *Crop Science*, 42, 1191-1201.
- Delplanque B., 2000. Intérêt nutritionnel des tournesols. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France*, 17-24.
- Delplanque B., Le Roy B., Combe N., Mendy F., Fenart E., Entressangles B., Thaminy A., Syeda F, et Tanguy S., 2000. Intérêt des huiles combinées à base de tournesol oléique et colza en nutrition humaine: définition des limites optimales de l'apport en acide oléique après stabilisation des apports en acides linoléique et alpha-linolénique. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France*, 14-19.

- Demir C. et Cetin M., 1999. Determination of tocopherols, fatty acids and oxidative stability of pecan, walnut and sunflower oils. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 95, 278-282.
- Demurin Y., 1993. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds. *Helia*, 16, 59-62.
- Demurin Y., Skoric D., et Karlovic D., 1996. Genetic variability of tocopherol composition in sunflower seeds as a basis of breeding for improved oil quality. *Plant Breeding*, 115, 33-36.
- Diener A.C., Haoxia L., Zhou W., Whoriskey J., Nes W.D., et Fink G.R., 2000. Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell*, 12, 6, 853-870.
- Dobarganes M.C., Marquez-Ruiz G., et Perez-Camino M., 1993. Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 678-681.
- Dolde D., Vlahakis C., et Hazebroek J., 1999. Tocopherols in breeding lines and effects of planting location, fatty acid composition and temperature during development. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 76, 349-355.
- Dorrell G.D. et Vick B., 1997. Properties and processing of oilseed sunflower. In: Sunflower production and technology. Ed.Schneiter, A.A, Agronomy monographe No.35 ASA, CSSA and SSSA, Madison,WI,USA, p.708-745.
- Dosio G.A.A., Aguirrezabal L.A.N., Andrade F.H., et Pereyra V.R., 2000. Solar Radiation Intercepted during Seed Filling and Oil Production in Two Sunflower Hybrids. *Crop Science*, 40, 1637-1644.
- El Asri M., Essahat A., Bouniols A., et Mondières M., 2000. Rendement et qualité des graines du tournesol cultivé sous contrainte hydrique. Résultats des essais en coopération au Maroc et dans le Sud-Ouest de la France. In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, I C, 127-132.
- Evrard J., 2003. Protéines et lipides : des technologies adaptées aux usages actuels et futurs. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 10, 1, 57-60.
- Fernandez D.E. et Staehelin L.A., 1987. Does gibberellic acid induce the transfert of lipase from protein bodies to lipid bodies in barley aleurone cells. *Plant Physiology*, 85, 487-496.
- Fernandez-Martinez J.M., Dominguez-Jimenez J., et Jimenez-Ramirez A., 1995. Breeding for high oleic content in sunflower oil. *Helia*, 11-15.
- Fernandez-Martinez J.M., Jimenez A., Dominguez J., Garcia J.M., Garces R., et Mancha M., 1989. Genetic analysis of th high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 41, 39-51.
- Fernandez-Martinez J.M., Jimenez-Ramirez A., Dominguez-Jimenez J., et Alcantara M., 1986. Temperature effect on the oleic and linoleic acids of three genotypes in sunflower. *Grasas y Aceites*, 37, 236-331.
- Fernandez-Martinez J.M., Mancha M., Osorio J., et Garces R., 1997. Sunflower mutant containing high levels of palmitic acid in high oleic background. *Euphytica*, 97, 113-116.

- Fernandez-Martinez J.M., Munoz J., et Gomez-Arnau J., 1993. Performance of near-isogenic high and low oleic acid hybrids of sunflower. *Crop Science*, 33, 6, 1158-1163.
- Fernandez-Moya V., Martinez-Force E., et Garces R., 2002. Temperature effect on a high stearic acid sunflower mutant. *Phytochemistry*, 59, 33-37.
- Fick G.H., 1984. Inheritance of high oleic acid in the seed of sunflower. *In: Proc. XI International Sunflower Conference*, Bismarck, ND, USA, 9-12.
- Fick G.N., 1975. Heritability of oil content in sunflowers. *Crop Science*, 15, 77-78.
- Fick G.N., 1983. Genetics and breeding of sunflower. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 60, 1252-1255.
- Flagella Z., Giuliani M.M., Rotunno T., Di Caterina R., et De Caro A., 2004. Effect of saline water on oil yield and quality of a high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrid. *European Journal of Agronomy*, 21, 2, 267-272.
- Flagella Z., Rotunno T., Di Caterina R., De Simone G., Ciciretti L., et De Caro A., 2000. Effect of supplementary irrigation on seed yield and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown in a sub-arid environment. *In: Proc. XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, I C, 139-144.
- Flagella Z., Rotunno T., Tarantino T., Di Caterina R., et De Caro A., 2002. Changes in seed yield and oil fatty acid composition of high oleic sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids in relation to the sowing date and the water regime. *European Journal of Agronomy*, 17, 221-230.
- Flénet F., Bouniols A., et Fiorini C., 1994. Sunflower response to timing of water stress application. *Agricoltura Mediterranea*, 124, 95-105.
- Flénet F., Bouniols A., Sarkkinen E.S., et Saraiva C., 1996. Sunflower response to a range of soil water contents. *European Journal of Agronomy*, 1-7.
- Flénet F., Marette K., et Bouniols A., 1997. Partitioning of stored and current assimilates in sunflower as influenced by timing of water stress. *Agricoltura Mediterranea*, 127, 306-312.
- Folmer B.M., 2003. Sterol surfactant: from synthesis to applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 103, 99-119.
- Franck P.F.H., De Ree J.N., Roelofsfsen B., et Op den Kamp J.A.F., 1984. *Biochemistry Biophysica Acta*, 778, 405-411.
- Garcés R., Alvarez-Ortega R., Cantisan S., et Martinez-Force E., 2000. Biochemical control of high palmitic acid biosynthesis. *In: Proc. XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, I A, 7-12.
- Garcés R., Garcia J.M., et Mancha M., 1989. Lipid characterization in seeds of a high oleic acid sunflower mutant. *Phytochemistry*, 28, 10, 2597-2600.
- Garcés R. et Mancha M., 1989. Oleate desaturation in seeds of two genotypes of sunflower. *Phytochemistry*, 28, 2593-2595.

- Garcés R. et Mancha M., 1991. *In vitro* oleate desaturase in developing sunflower seeds. *Phytochemistry*, 30-7, 2127-2130.
- Garcia-Diaz M.T., Martinez-Rivas J.M., et Mancha M., 2002. Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Physiologia Plantarum*, 114, 13-20.
- Geneau C., Rouilly A., Silvestre F., et Rigal L., 2004. Manufacturing process of injection-molded agromaterial from sunflower oil cake. *In: XVI International Sunflower Conference, Fargo, USA, II*, 799-804.
- Gentzbittel L., Mouzeyar S., Mestries E., Vear F., Tourveille de Labrouhe D., et Nicolas P., 1998. Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 96, 519-525.
- Gimenez C., Mitchell V.J., et Lawlor D.W., 1992. Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. *Plant Physiology*, 98, 524.
- Gimeno V., Fernandez-Martinez J.M., et Fereres E., 1989. Winter planting as a means of drought escape in sunflower. *Field Crops Research*, 22, 307-316.
- Goffner, D., 1989. Contribution à l'étude de la synthèse des protéines dans la graine de tournesol. Thèse Université Paul Sabatier, Toulouse, pp.70.
- Goffner D., Cazalis R., Percie du Sert C., Calmes J., et Cavalie G., 1988. ¹⁴C photoassimilate partitioning in developing sunflower seeds. *Journal of Experimental Botany*, 39, 207, 1411-1420.
- Goodwin T.W., 1980. Biosynthesis of sterols. *In: The Biochemistry of Plants, Vol 4, Lipids: Structure and Function*, Stumpf P.K. and Conn EE, Academic Press, London, p.485-507.
- Goyne P.J., Simpson B.W., Woodruff D.R., et Churchett J.D., 1979. Environmental influence on sunflower achene growth, oil content and oil quality. *Australian Journal of Experimental Agricultural Animal Husbandry*, 19, 82-88.
- Grandmougin-Ferjani A., Schuler-Muller I., et Hartmann M.A., 1997. Sterols modulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiology*, 113, 163-174.
- Gray D.A. et Kekwick R.G.O., 1996. Intracellular location of oleate desaturase and associated constituents in developing sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Plant Science*, 119, 1, 11-21.
- Green A.G., 1986. Effect of temperature during seed maturation on the oil composition of low-linolenic genotypes of flax. *Crop Science*, 26, 961-965.
- Griffiths G., Griffiths W.T., et Stobart A.K., 1998. Delta-9 desaturase activity in developing cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Phytochemistry*, 48, 261-267.
- Guégen J., 1992. Extraction et purification des protéines végétales. *Analysis Magazine*, 20, 35-37.
- Guégen J., 1998. Protéines d'oléagineux: développer des utilisations non-alimentaires. *Oléoscope*, 44, 18-21.

- Guo D.A., Vekatramesh M., et Nes W.D., 1995. Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. *Lipids*, 30, 203, 219.
- Gurr M.I., 1980. The Biotechnology of Plants. Ed. Strumpf P.K. and Conn E.A., Academic Press, New York, p.205-248.
- Hall A.J., Chimenti C.A., Vilella F., et Freier G., 1985. Timing of water stress effects on yield components of sunflower. *In: XI International Sunflower Conference, Mar del Plata, Argentina*, 131-136.
- Hall A.J., Connor D.J., et Whitfield D.M., 1989. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water-stressed sunflower crops I. Estimates using labelled carbon. *Field Crops Research*, 20, 95-112.
- Hall A.J., Whitfield D.M., et Connor D.J., 1990. Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water-stressed sunflower crops II. Estimates from a carbon budget. *Field Crops Research*, 24, 273-294.
- Halliwell B. et Cuttridge J.M.C., 1990. Free radicals and catalytic metal ions. *Methods Enzymes*, 186, 1-16.
- Hancock R.A. et Leeves N.J., 1989. Studies in autoxidation. Part I: the volatile by-products resulting from the autoxidation of unsaturated fatty acid methyl esters. *Progress in Organic Coatings*, 17, 321-336.
- Harris H.C., McWilliam J.R., et Mason W.K., 1978. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29, 1203-1212.
- Harwood J.L., 1988. Fatty acids metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 101-138.
- Harwood J.L., 1998. Plant lipid biosynthesis. Ed. Cambridge University Press, pp 365.
- Hattendorf M.J., Redelfs M.S., Amos B., Stone L.R., et Gwin R.E.J., 1988. Comparative water use characteristics of six row crops. *Agronomy Journal*, 88, 80-85.
- Hatzopoulos P., Franz G., Choy L., et Sung R.Z., 1990. Interaction of nuclear factors with upstream sequences of lipid body membranes protein gene from carrot. *Plant Cell*, 2, 457-467.
- Havaux M., Bonfils J., Lutz C., et Niyogi K., 2000. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf development stage in the npq1 *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiology*, 124, 273-284.
- Heinemann T., Kullack-Ublick G.A., Pietruck B., et Von Bergmann K., 1991. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 40, 59-63.
- Heppard P., Qinnay A.J., Stecca K.L., et Miao G., 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal ω -6 desaturase genes in soybeans. *Plant Physiology*, 110, 311-319.

- Hillion G. et Proriol D., 2003. Synthesis of high-grade lubricant from sunflower oil methyl esters. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 10, 370-372.
- Hoang J., Parmentier J., Ballerini D., Hillion G., Wozniak E., Mages R., Ducos J., et Bewa H., 2003. Evaluation des esters méthyliques de tournesol isomérisés comme substitut de solvants (COV) dans le domaine des peintures et vernis et assimilés. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 10, 387-391.
- Hongtrakul V., Slabaugh MB., et Knapp S.J., 1998. A seed specific delta 12 oleate desaturase gene is duplicated rearranged and weakly express in high oleic sunflower lines. *Crop Science*, 38, 1245-1249.
- Hua Z., 2004. Sunflower needed by the chinese market. *In: Proc. XVI International Sunflower Conference, Fargo, USA, II*, 823-826.
- Huang A.H.C., 1992. Oil bodies and oleosines in seeds. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 43, 177-200.
- Human J.J., Toit D., et Bezuidenhout H.D., 1990. The influence of plant water stress on net photosynthesis and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 164, 4, 231-241.
- Ichihara K., Yamane K., et Hirano E., 1997. Acyl-CoA synthetase in oilseeds: fatty acid structural requirements for activity and selectivity. *Plant Cell Physiology*, 38, 717-724.
- Itzhaki H., Borochoy A., et Mayak S., 1990. Age-related in petal membranes from attached and detached rose flowers. *Plant Physiology*, 94, 1233-1236.
- Ivanov P. et Georgiev I., 1981. Biochemical characteristics of sunflower mutant forms. *In: Proc. Symposium of sunflower breeding, Prague, Tchequoslovaquia*, 256-266.
- Izquierdo N., Aguirrezabal L., Andrade F., et Pereyra V., 2002. Night temperature affects fatty acid composition in sunflower oil depending on the hybrid and the phenological stage. *Field Crops Research*, 77, 115-126.
- Jiang M. et Zhang J., 2002. Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53, 379, 2401-2410.
- Jing M., Folsom A.R., Lewis L., Eckfeldt J.H., et Ma J., 1997. Relation of plasma phospholipid and cholesterol ester fatty acid composition of artery intima-media thickness: the arterosclerosis risk in communities (ARIC) study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 2, 551-559.
- Jones A., Davies H.M., et Voelker T., 1995. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell*, 7, 351-371.
- Jones O.R., 1984. Yield, water-use efficiency, and oil concentration and quality of dryland sunflower grown in the Southern High Plains. *Agronomy Journal*, 76, 229-235.
- Kabbaj A., Vervoort V., Abbott A.G., Tersac M., et Bervillé A., 1996. Polymorphism in *Helianthus* and expression of stearate, oleate and linoleate desaturase genes in sunflower with normal and high oleic contents. *Helia*, 19, 1-18.

- Kamal-Eldin A. et Andersson R., 1997. A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 74, 4, 375-380.
- Kawase M., 1974. Role of ethylene in induction of flooding damage in sunflower. *Plant Physiology*, 31, 29-38.
- Kaya Y., 2004. Confectionery sunflower production in Turkey. *In: Proc. XVI International Sunflower Conference*, Fargo, USA, II, 817-822.
- Kinter M., Spitz D.R., et Roberts R.J., 1996. Oleic acid incorporation protect cultured hamster fibroblast from oxygen-induced cytotoxicity. *Journal of Nutrition*, 126, 12, 2952-2959.
- Kirch H.H., Bartels D., Wei Y., Schnable P., et Wood A., 2004. The aldehyde dehydrogenase gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science*, 9, 371-377.
- Krajcovicova-kudlakova M., Simonsic R., Bederova A., et Klvanova J., 1997. Plasma fatty acid profile and alternative nutrition. *Annal of Nutrition and Metabolism*, 41, 6, 365-370.
- Kreps J.A., Wu Y., Chang H.S., Zhu T., Wang X., et Harper J.F., 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, 130, 2129-2141.
- Kwak J.M., Moon J.H., Murata Y., Kuchitsu K., Leonhardt N., DeLong A., et Schroeder J.I., 2002. Disruption of a guard cell-expressed protein phosphatase 2A regulatory subunit, RCN1, confers abscisic acid insensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 14, 11, 2849-2861.
- La Taille G., 1995. Produire du tournesol oléique à quelles fins? *Oléoscope*, 30, 12-14.
- Lacombe S. et Bervillé A., 2000. Problems and goals in studying oil composition variation in sunflower. *In: Proc. XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, 16-25.
- Lacombe S., Kaan F., Griveau A., et Bervillé A., 2004. The pervenets high oleic mutation: methodological studies. *Helia*, 27, 40, 41-54.
- Lacombe S., Leger S., Kaan F., et Bervillé A., 2002. Genetic, molecular and expression features of the Pervenets mutant leading to high oleic acid content of seed oil in sunflower. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 9, 16-23.
- Lagravère T., Champolivier L., Lacombe S., Kleiber D., Bervillé A., et Dayde J., 2000. Effects of temperature variations on fatty acid composition in oleic sunflower oil (*Helianthus annuus*) hybrids. *In: Proc. XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, I A, 73-78.
- Lagravère T., Kleiber D., et Daydé J., 1998. Conduites culturales et performances agronomiques du tournesol oléique: réalités et perspectives. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 5, 6, 477-485.
- Lagravère T., Kleiber D., Surel O., Calmon A., Bervillé A., et Daydé J., 2004. Comparison of fatty acid metabolism of two oleic and one conventional sunflower hybrids: a new hypothesis. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 190, 223-229.
- Laisney J., 1984. L'huilerie moderne. Ed.Masson, 79-86.

- Lajara JR., Diaz U., et Diaz Quidiello R., 1990. Definitive influence of location and climatic conditions on the fatty acid composition of sunflower seed oil. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 67, 618-623.
- Law M.R., Wald N.J., et Thompson S.G., 1994. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *British Medical Journal*, 308, 367-372.
- Leclercq P., 1969. Une stérilité male cytoplasmic chez le tournesol. *Annales de l'amélioration des plantes*, 19, 99-106.
- Leclercq P., 1970. Sunflower hybrids using male sterility. *In: IV International Sunflower Conference*, Memphis, USA, 123-126.
- Léger C.L., 2000. La vitamine E: état actuel des connaissances, rôle dans la prévention cardiovasculaire, biodisponibilité. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 7, 3, 258-265.
- Lemarié J., 1996. Protéines des oléagineux: quel usages industriels? *Oléoscope*, 44, 11-13.
- Lencrerot P., Decau J., et Puech J., 1977. *Compte Rendu de l'Académie des Sciences, Paris*, 284, 907-910.
- Leon A.J., Lee M., Rufener G.K., Berry S.T., et Mowers R.P., 1995. Use of RFLP markers for genetic linkage of oil percentage in sunflower seed (*Helianthus annuus*). *Crop Science*, 35, 558-564.
- Lopez Pereira M., Trápani N., Piñeiro G., et Hall A., 2004. Responses of sunflower to stand structure and crop population density: effects on leaf area and yield. *In: Proc. XVI International Sunflower Conference*, Fargo, USA, 1, 322-324.
- Luthra R., Munshi S.K., et Sukhija P.S., 1991. Relationship of carbohydrate metabolism with lipid biosynthesis in developing sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, 137, 312-318.
- Maréchal V. et Rigal L., 1999. Characterization of by-product of sunflower culture commercial applications for stalks and heads. *Industrial Crops and Products*, 10, 185-200.
- Martinez-Force E., Alvarez-Ortega R., Cantisan S., et Garces R., 1998. Fatty acid composition in developing high saturated sunflower (*Helianthus annuus*) seeds: maturation changes and temperature effect. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3577-3582.
- Martinez-Rivas J.M., Esteban A.B., Sicardo M.D., Sanchez-Garcia J.A., et Mancha M., 2003. Temperature and oxygen regulation of oleate desaturation in sunflower and safflower seeds. *In: Proc. XI European Conference on Sunflower Biotechnology*, Sevilla, Spain, p.38.
- Matthäus B. et Brühl L., 2001. Comparison of different methods for the determination of the oil content in oilseeds. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 78, 95-102.
- Mattson F.H., Volpenhein R.A., et Arickson B.A., 1977. Effect of plant sterol esters on the absorption of dietary cholesterol. *Journal of Nutrition*, 107, 1139-1146.

- Maury, P., 1997. Adaptation à la sécheresse et photosynthèse chez le tournesol. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, pp.137.
- Mazliak P., 1981. Régulation à court terme et à long terme des enzymes membranaires par la température. *Physiologie Végétale*, 19, 543-563.
- Mc Keon T. et Stumpf P.K., 1982. Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *Journal of Biological Chemistry*, 257, 12141-12147.
- McCarthy A.D. et Hardie D.G., 1984. Fatty acids synthase - an example of protein evolution by gene fusion. *Trends in Biochemical Sciences*, 9, 3-60.
- Mekki B.B., El-Kholy M.A., et Mohammed E.M., 1999. Yield, oil and fatty acids contents as affected by water deficit and potassium fertilization in two sunflower cultivars. *Egyptian Journal of Agronomy*, 21, 67-85.
- Merrien A., 1992. Les points techniques du CETIOM: Physiologie du tournesol. CETIOM, pp 66.
- Merrien A., Blanchet R., et Gelfi N., 1983. Effect of source-sink relationships and of intraspecific competition on changes in net assimilation during the development cycle of sunflower. *Agronomie*, 3, 10, 1045-1051.
- Merrien A., Blanchet R., et Gelfi N., 1981a. Importance of senescence resistance and leaf survival in yield formation in sunflower under water stress. *Informations Techniques CETIOM*, 77, 12-16.
- Merrien A., Blanchet R., et Gelfi N., 1981b. Relationships between water supply, leaf area development and survival, and production in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Agronomie*, 1, 10, 917-922.
- Merrien A., Champolivier L., Raimbault J., et Evrard J., 1993. Tournesol oléique: premiers facteurs de variation de la composition. *Oléoscope*, 15, 17-19.
- Merrien A. et Grandin G., 1990. Comportement hydrique du tournesol. *In: Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation*, Points Science du CETIOM, Paris, p.75-90.
- Miettinen T.A. et Gylling H., 1997. New technologies for healthy foods and nutraceuticals. Ed. Shrewbury, MA, M. Yalpani, ATL press, p.71-90.
- Miettinen T.A. et Vanhanen H., 1994. Serum concentrations and metabolism of cholesterol during rapeseed oil and squalene feeding. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59, 356-363.
- Miller J.F. et Vick B., 2001. Registration of four high linoleic sunflower germplasms. *Crop Science*, 27, 923-926.
- Miller J.F. et Vick B., 1984. ND-01, a high oleic acid sunflower synthetic. *North Dakota Farm Research*, 42, 2, 27-32.
- Miller J.F., Zimmerman D.C., et Vick B., 1987. Genetic control of high oleic acid content in sunflower. *Crop Science*, 27, 923-926.

- Moreau R.A., Whitaker B.D., et Hicks K.B., 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 41, 457-500.
- Morin A., 2003. Le tournesol oléique: une production innovante. *Oléoscope*, 70, 21-23.
- Morizet J., Cruiziat P., Chatenoud J., Picot P., et Leclercq P., 1984. Improvement of drought resistance in sunflower by interspecific crossing with a wild species *Helianthus argophyllus*. Methodology and first results. *Agronomie*, 4, 577-585.
- Morizet J. et Merrien A., 1990. Principaux traits du comportement hydrique du tournesol. In: Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation, Points Science du CETIOM, Paris, p.7-21.
- Mullet J.E. et Whitsitt M.S., 1996. Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation*, 20, 119-124.
- Munne-Bosch S. et Alegre L., 2002. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 21, 31-57.
- Murphy D.J. et Piffanelli P., 1988. Fatty acid desaturases: structure, mechanism and regulation. In: Harwood, 1988. Plant lipid biosynthesis, 95-130.
- Murphy D.J., Woodrow I.E., et Mukherjee K.D., 1985. Substrate specificities of the enzymes of the oleate desaturase system from photosynthetic tissue. *Biochemical Journal*, 225, 267-270.
- Nagao A. et Yamazaki M., 1983. Lipid of sunflower seeds produced in Japan. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 60, 1654-1658.
- Nes W.D., 2000. Sterol methyl transferase: enzymology and inhibition. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529, 63-88.
- Netscher T., 1999. Synthesis and production of vitamin E. In: Lipid Synthesis and Manufacture, Gunstone F.D., Sheffield Academic press, p.250-267.
- Nigon F., Serfaty-Lacrosnière C., Chauvois D., Neveu C., Chapman J., et Bruckert E., 2000. Les phytostérols: une nouvelle approche diététique de l'hypercholestérolémie. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 12, 8, 483-490.
- Nolot J.M. et Debaeke P., 2001. A generic model to manage N in cropping systems differing by water availability. In: Proc. XI Nitrogen Workshop, Reims, France, 9-12.
- Ohlrogge J.B., Kuhn D.N., et Stumpf P.K., 1979. Subcellular localization of acyl carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proceeding of National Academy Science of USA*, 76, 1194-1198.
- Ohlrogge J.B., Browse J., et Somerville C.R., 1991. The genetics of plant lipids. *Biochimica et Biophysica Acta, Lipids and Lipid Metabolism*, 1082, 1, 1-26.
- Okuley J., Lightner J., Fieldman K., Yadav N., Lark E., et Browse J., 1994. Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell*, 6, 147-158.

- Osario J., Fernandez-Martinez J., Mancha M., et Garces R., 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Science*, 35, 739-742.
- Osborne T.B., 1924. The vegetable Proteins. 2^e edn. Ed. Longmans, Green and Co, London, p.p.56-67.
- Ozturk Z.N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C.B., Galbraith D.W., Gozukirmizi N., Tuberosa R., et Bohnert H.J., 2002. Monitoring large scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology*, 48, 551-573.
- Palmer J.H. et Steer B.T., 1985. The generative area as the site of floret initiation in the sunflower capitulum and its integration to predict floret number. *Field Crops Research*, 11, 1-12.
- Palta J.P., Whitaker B.D., et Weiss L.S., 1993. Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of solanum species. *Plant Physiology*, 103, 793-803.
- Panchuk I.I., Volkov R.A., et Schoffl F., 2002. Heat stress and heat shock transcription factor dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129, 838-853.
- Parant B., 1999. Utilisation des oléagineux de nature oléique -colza, tournesol- dans l'industrie des tensioactifs. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 6, 393-395.
- Patil S.D., Pol P.S., Shinde S.H., et Umrani N.K., 1989. Seed yield and quality of some cultivars of summer sunflower at different seeding dates. *Indian Journal of Agronomy*, 34, 430-431.
- Pelletier X., Belbraouet S., Mirabel D., Mordret F., Perrin J.L., Pages X., et Debry A., 1995. A diet moderately enriched in phytosterols lowers plasma cholesterol concentrations in normo-cholesterolemic human. *Annal of Nutrition and Metabolism*, 39, 291-295.
- Perez-Vich B., Fernandez-Martinez J.M., Grondona M., Knapp S.J., et Berry S.T., 2002. Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 2, 338-349.
- Perez-Vich B., Garces R., et Fernandez-Martinez J.M., 2000a. Genetic characterization of sunflower mutant with high content of saturated fatty acids in seed oil. *Helia*, 23, 77-84.
- Perez-Vich B., Garces R., et Fernandez-Martinez J.M., 2000b. Genetic relationships between loci controlling the high stearic and the high oleic acid traits in sunflower. *Crop Science*, 40, 990-995.
- Perez-Vich B., Velasco L., et Fernandez-Martinez J.M., 1998. Determination of seed oil content and fatty acid composition in sunflower through the analysis of intact seeds, husked seeds, meal and oil by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 75, 547-555.
- Petakov D., 1990. Biochemical and economic characteristics of sunflower high oleic lines. In: Proc. International Youth Conference on Genetics, Albena, 369-372.
- Picq G., 1989. Résultats de l'observatoire du tournesol CETIOM. In: Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation, Points Science du CETIOM, Paris, p.105-124.

- Piironen V., Lindsay D.G., Miettinen T.A., Toivo J., et Lampi A.M., 2000. Review. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 939-966.
- Piva G., Bouniols A., et Mondières M., 2000. Effect of cultural conditions on yield, oil content and fatty acid composition of sunflower kernel. *In: XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, I A, 61-66.
- Planchon C., 1990. Adaptation du tournesol à la sécheresse : réponse de la photosynthèse au déficit hydrique. *In: Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation*, 21-31.
- Po Huang C., Nomura A.M.W., Stemmermann G.N., et Chyou P.H., 1996. A perspective study of colon and rectal cancer among Hawaii Japanese men. *Annals of Epidemiology*, 6, 4, 276-282.
- Pouzet A. et Bougeat F., 1985. Description d'une méthode simple et rapide pour l'estimation de la surface foliaire par plante chez le tournesol. *In: Proc. XI International Sunflower Conference*, Mar del plata, Argentina, 21-26.
- Pouzet A. et Delplancke D., 2000. Evolution comparée de la production et de la compétitivité du tournesol dans différentes aires de production. *In: Proc. XV International Sunflower Conference*, Toulouse, France, I A, 1-9.
- Prevost A., 1987. L'huile de tournesol aujourd'hui. *Revue Française des Corps Gras*, 34, 183-192.
- Purdy R.H., 1986. High oleic sunflower: physical and chemical characteristics. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 63, 1062-1066.
- Quelenis N., 2005. Les biolubrifiants. *In: CCI Agroindustrie, Fiche technique*, p.1-6.
- Quiles J.L., Huertas J.R., Ochoa J.J., Battino M., Mataix J., et Manas M., 2003. Dietary fat (virgin olive oil or sunflower oil) and physical training interactions on blood lipids in the rat. *Nutrition*, 19, 363-368.
- Radford B. et Nielsen R., 1982. Winter sown sunflower in the darling downs. *Queensland Journal of Agricultural Animal Science*, 39, 1, 73-80.
- Radin J.W. et Boyer T.S., 1982. Control of leaf expansion by nitrogen nutrition in sunflower. *Plant Physiology*, 69, 771-775.
- Rawson H.M., Dunstone R.L., Long M.J., et Begg J.E., 1984. Canopy development, light interception and seed production in sunflower as influenced by temperature and radiation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 11, 255-265.
- Rawson H.M. et Turner N.C., 1982. Recovery from water stress in five sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars. I. Effects of the timing of water application on leaf area and seed production. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9, 437-448.
- Reau R., Champolivier L., Sauzet G., Ségura R., et Wagner D., 2004. Heliotest: a decision support system for sunflower nitrogen fertilization. *In: XVI International Sunflower Conference*, Fargo, USA, I, 387-392.

- Reid E.E., Thompson P., Lyttle C.R., et Dennis D.T., 1977. Pyruvate deshydrogenase complex from higher plant mitochondria and proplastids. *Plant Physiology*, 59, 841-847.
- Rennie B.D. et Tanner J.W., 1989. Fatty acids composition of oil from soybean seeds grown at extreme temperatures. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 66, 1622-1624.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S., et Mittler R., 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology*, 134, 1683-1696.
- Robelin M., 1967. Action et arrière-action de la sécheresse sur la croissance et la production du tournesol. *Annales Agronomiques*, 18, 579-599.
- Robertson J., Chapman G., et Wilson R., 1978. Relation of days afterflowering to chemical composition and physiological maturity of sunflower seed. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 55, 266-269.
- Robinson R.G., 1970. Sunflower date of planting and chemical composition at various growth stages. *Agronomy Journal*, 62, 665-666.
- Roche J., Essahat A., Bouniols A., El Asri M., Mouloungui Z., Mondières M., et Alghoum M., 2004. Diversified composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds within cultural practices and genotypes (hybrids and population). *Helia*, 27, 40, 73-98.
- Rochester C. et Silver J., 1983. Unsaturated fatty acid synthesis in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds in response to night temperature. *Plant Cell Report*, 2, 229-231.
- Roesler K., Shintani D, Savage L, Boddupalli S, et Ohlrogge J, 1997. Targeting of the Arabidopsis homomeric acetyl-CoA carboxylase to plastids of rapeseeds. *Plant Physiology*, 113, 75-81.
- Rondanini D., Savin R., et Hall A.J., 2003. Dynamics of fruit growth and oil quality of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to brief intervals of high temperature during grain filling. *Field Crops Research*, 83, 79-90.
- Rossi M., 1988. Textured sunflower protein for use as a meat extender. *Lebensmittel - Wissenschaft Und Technologie*, 21, 267-270.
- Roughan P.G. et Slack C.R., 1982. Cellular organisation of glycerolipid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 97-132.
- Rouilly A., Silvestre F., Rigal L., Caruel N., Paux E., Silvestre J., et Morard P., 2000. Utilisation de tourteau de tournesol pour la fabrication de pots de repiquage biodégradables. In: XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, B, 58-63.
- Sadras V.O. et Villalobos F.J., 1996. Physiological characteristics related to yield improvement in sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: Genetic improvement of field crops. Ed.G.Slafer, Marcel Dekker, New York, p.287-320.
- Salas J.J., Martinez-Force E., et Garces R., 2004. Biochemical characterization of a high-palmitoleic acid *Helianthus annuus* mutant. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 373-381.

- Salera E. et Baldini M., 1998. Performance of high and low oleic acid hybrids of sunflower under different environmental conditions. Note II. *Helia*, 21, 28, 55-68.
- Santonoceto C., Anastasi U., Riggi E., et Abbate V., 2003. Accumulation dynamics of dry matter and major fatty acids in sunflower seeds in relation to genotypes and water regimes. *Italian Journal of Agronomy*, 7, 1, 3-14.
- Sarno R., Leto C., Cibella R., et Carrubba A., 1992. Effect of different sowing times on sunflower. In: Proc. XIII International Sunflower Conference, Pisa, Italy, I, 390-409.
- Schaller H., 2003. The role of sterols in plant growth and development. *Progress in Lipid Research*, 42, 163-175.
- Schneiter A.A. et Miller J.F., 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21, 901-903.
- Scholander P.F., Hammel H.T., Bradstreet E.D., et Hemingsen E.A., 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science*, 148, 339-346.
- Seiler G.J., 1983. Effect of genotype, flowering date and environment on oil content and oil quality of wild sunflower seed. *Crop Science*, 23, 1063-1068.
- Simpson B.W., McLeod C.M., et George D.L., 1989. Selection for high linoleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 29, 233-239.
- Singh V., Yadav B.S., et Bhunia S.R., 1997. Effect of planting date and irrigation management on growth and yield of spring sunflower (*Helianthus annuus*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 67, 48-50.
- Skoric D., 1985. Sunflower breeding for resistance to *Diaporthe helianthi/phomopsis helianthi* Munt.-Cvet. *Helia*, 8, 21-24.
- Slack C.R., Bertaud W.S., Shaw B.D., Holland R., Browse J., et Wright H., 1980. Some studies on the composition and surface properties of the oil bodies from oil seed cotyledons. *Biochemistry Journal*, 179, 421-433.
- Slocombe S.P., Kummins I., Jarvis R.P., et Murphy D.J., 1992. Nucleotide sequence and temporal regulation of the seed specific *brassica napus* cDNA encoding a stearyl-acyl carrier protein (ACP) desaturase. *Plant Molecular Biology*, 20, 151-155.
- Slocombe S.P., Piffanelli P., Fairbairn D., Bowra D., Hatzopoulos S., Tsiantis P., et Murphy D.J., 1994. Temporal and tissue specific regulation of *brassica napus* stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Plant Physiology*, 104, 1167-1176.
- Soldatov K.I., 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. In: Proc. VII International Sunflower Conference, Vlaardingen, Netherlands, 352-357.
- Somasekhara K., Krishne Gowda K.T., Chikkadevaiah, et Seenappa K., 2000. Studies on agronomic manipulations for improving the seed yield quality of KBSH-1 sunflower hybrid seed production. In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France, 102-106.

- Sommerville C. et Browse J., 1991. Plant lipids: metabolism, mutants and membranes. *Science*, 252, 80-87.
- Soriano M.A., Orgaz F., Villalobos F.J., et Fereres E., 2004. Efficiency of water use of early plantings of sunflower. *European Journal of Agronomy*, 21, 465-476.
- Steer B.T. et Hocking P.J., 1984. Nitrogen nutrition of sunflower (*Helianthus annuus* L.): Acquisition and partitioning of dry matter and nitrogen by vegetative organs and their relationship to seed yield. *Field Crops Research*, 9, 237-251.
- Steer B.T. et Hocking P.J., 1987. Characters of sunflower genotypes (*Helianthus annuus*) suited to irrigated production. *Field Crops Research*, 15, 369-387.
- Steer B.T., Hocking P.J., Kortt A.A., et Roxburgh C.M., 1984. Nitrogen nutrition of sunflower (*Helianthus annuus* L.): Yield components, the timing of their establishment and seed characteristics in response to nitrogen supply. *Field Crops Research*, 9, 219-236.
- Stitt M. et Ap Rees T., 1979. Capacities of pea chloroplasts to catalyse the oxidative pentos pathway and glycolysis. *Phytochemistry*, 18, 1905-1911.
- Stumpf P.K., 1984. Fatty acid biosynthesis in higher plants. *In: Fatty acid metabolism regulation*, Numa S. Amsterdam: Elsevier, p. 155-199.
- Stymne S. et Appleqvist L.A., 1978. The biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *European Journal of Biochemistry*, 90, 223-229.
- Stymne S. et Stobart A.K., 1987. Triacylglycerol biosynthesis. *In: The biochemistry of plants*. Ed. Stumpf P.K. and Conn E.A., Academic Press, New York, p.175-214.
- Szalay R., Ben C., Muller C., Hewezi T., Schaller H., Petitprez M., Alibert G., et Kallerhof J., 2003. Cloning and expression of HMGR and SMT2 c-DNA in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in immature embryos. *In: Proc. VI European Conference on Sunflower Biotechnology*, Sevilla, Spain,
- Talha M. et Osman F., 1974. Effect of soil water stress on water economy and oil composition in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Agricultural Science Camberra*, 84, 49-56.
- Tapiero H., Townsend D.M., et Tew K.D., 2003. Phytosterols in the prevention of human pathologies. *Biomedecine & Pharmacotherapy*, 57, 321-325.
- Texier V., Blanchet R., et Auret J.M., 1989. Tentative de diagnostic des stress hydriques par simulation CETIOM. *In: Le tournesol et l'eau: adaptation à la sécheresse, réponse à l'irrigation*, Points science du CETIOM, Paris, p.125-139.
- This P., Goffner D., Raynal M., Chartier M., et Delseny M., 1988. Characterization of major storage proteins of sunflower and their accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 26, 125-132.
- Thompson T.E., Fick G.N., et Cedeno J.R., 1979. Maternal control of seed oil percentage in sunflower. *Crop Science*, 19, 619.
- Tourveille de Labrouhe D., Lafon S., Walser P., et Raulic L., 2000. A new race of *Plasmopara halstedii*, sunflower downy mildew. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 7, 404-405.

- Trémolières A., 1998. Les lipides végétaux. Voie de biosynthèse des glucerolipides. Ed. De Boeck Université, pp. 120.
- Trémolières A., Dubacq J.P., et Drapier D., 1982. Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflower and rape: regulation by temperature and light intensity. *Phytochemistry*, 21, 1, 41-45.
- Triboi A.M. et Renard M., 1999. Effect of temperature and water stress on fatty acid composition of rapeseed oil. *In: Proc. International Rapeseed Congress, Canberra, Australie*, 12-16.
- Triboi-Blondel A.M., Bonnemoy B., Falcimagne R., Martignac M., Messaoud J., Philippon J., et Vear F., 2000. The effect of temperature from flowering to maturity on seed composition of high oleic sunflower inbreds and mid oleic hybrids. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France*, 52-55.
- Triki S., Ben Hamida J., et Mazliak P., 1997. Etude du métabolisme des lipides de réserves dans la graine de tournesol en maturation: expériences de marquage au [¹⁴C] acétate. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 4, 6, 451-458.
- Turner N.C., 1981. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant Soil*, 58, 339-366.
- Tzen J.T.C., Lai Y.K., Chan K.L., et Huang A.H.C., 1990. Oleosin isoforms of high and low molecular weights are present in oil bodies of diverse seed species. *Plant Physiology*, 94, 1282-1289.
- Unger P.W., 1986. Growth and development of irrigated sunflower in the Texas High Plains. *Agronomy Journal*, 78, 507-515.
- Unger P.W., 1982. Planting date effects on sunflower head and seed development. *Agronomy Journal*, 74, 389-395.
- Unger P.W., 1980. Planting date effects on growth, yield, and oil of irrigated sunflower. *Agronomy Journal*, 72, 914-916.
- Urie L., 1985. Inheritance of high oleic acid in sunflower. *Crop Science*, 25, 986-989.
- Vance V.B. et Huang A.H.C., 1988. Expression of lipid body protein gene during maize seed development. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 1476-1481.
- Vancreanu A.V., 1977. The sunflower. ed. Mundi-Prensa, Madrid, Espagne, pp. 86.
- Vandenbossche-Maréchal, V., 1998. Fractionnement des tiges et capitules du tournesol. Hydrodistillation d'une huile essentielle odorante, extraction et modification, chimique de pectines, et mise en forme d'agromatériaux biodégradables. Thèse Institut National Polytechnique de Toulouse, pp.212.
- Varès D., Cléomène J., Lacombe S., Griveau A., Bervillé A., et Kaan F., 2000. Triacylglyceride composition in fl seeds using factorial and diallel crosses between sunflower lines. *In: Proc. XV International Sunflower Conference, Toulouse, France*, 107-109.
- Vear F., Bony H., Joubert G., Tourveille de Labrouhe D., Pauchet I., et Pinochet X., 2003. 30 years of sunflower breeding in France. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 10, 1, 66-73.

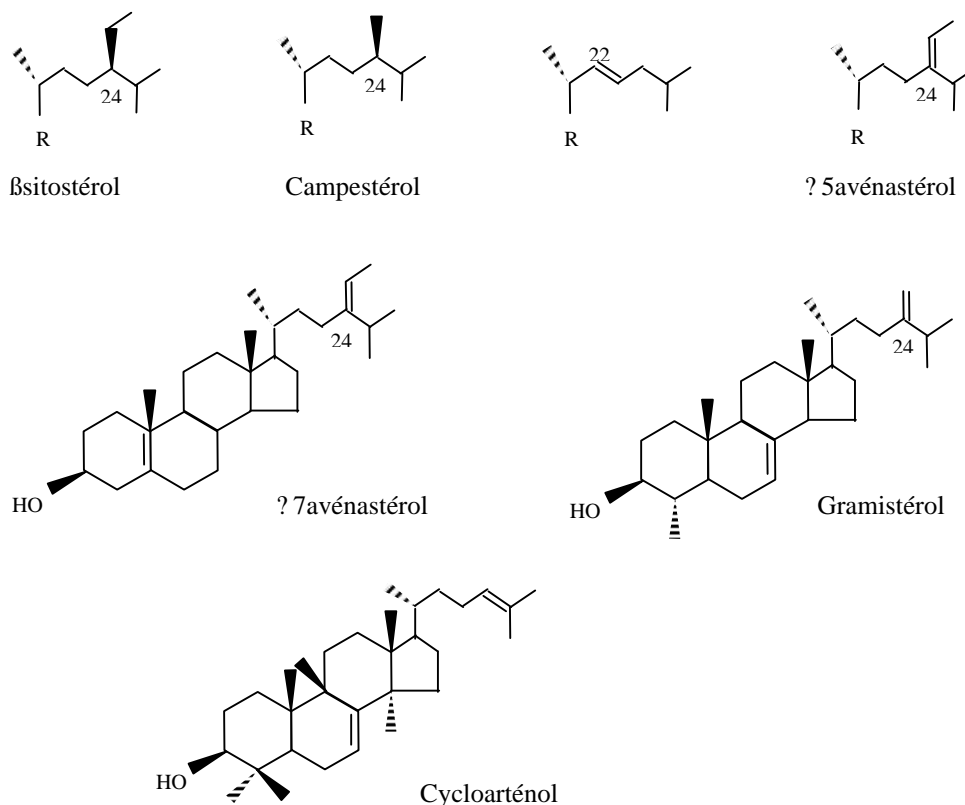
- Vear F. et Tourveille de Labrouhe D., 1988. Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospore infections. *Agronomie*, 8, 503-508.
- Velasco J., Andersen M.L., et Skibsted L.H., 2004. Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry. *Food Chemistry*, 85, 623-632.
- Velasco L. et Fernandez-Martinez J.M., 2003. Identification and genetic characterization of new sources of beta- and gamma-tocopherol in sunflower germplasm. *Helia*, 26, 17-24.
- Vick B. et Miller J.F., 1996. Utilization of mutagens for fatty acid alteration in sunflower. *In: Proc. XVIII Sunflower research workshop. National Sunflower Association, Bismark, ND, USA*, 11-17.
- Villalobos F.J., Hall A.J., Ritchie J.T., et Osman F., 1996. Oilcrop-sun : A development, growth, and yield model of the sunflower crop. *Agronomy Journal*, 88, 403-415.
- Villalobos F.J., Sadras V.O., Soriano A., et Fereres E., 1994. Planting density effects on dry matter partitioning and productivity of sunflower hybrids. *Field Crops Research*, 36, 1-11.
- Vlahakis C. et Hazebroek J., 2000. Phytosterol accumulation in canola, sunflower, and soybean oils: effects of genetics, planting location, and temperature. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 77, 49-53.
- Voelker T., 1996. Plant acyl-ACP thioesterase: chain-length determining enzymes in plant fatty acid biosynthesis. Ed. Setlow, New York Plenum Press, pp. 110.
- Wardlaw G.M. et Snook J.T., 1990. Effects of diets high in butter, corn oil, or high-oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 5, 815-821.
- Xiao W., Sheen J., et Jang J.C., 2000. The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology*, 44, 451-461.
- Yoneyama T., Arai K., et Totsuka T., 1980. Transfer of radioactive carbon after the application of ^{14}C alanine and $^{14}\text{CO}_2$ to sunflower leaves. *Plant Cell Physiology*, 21, 1367-1381.
- Zhu L.H., Van de Peppel A., Li X.Y., et Welander M., 2004. Changes in leaf water potential and endogenous cytokinins in young apple trees treated with or without paclobutrazol under drought conditions. *Scientia Horticulturae*, 99, 133-141.

Annexes

Annexe 1: Principaux acides gras végétaux

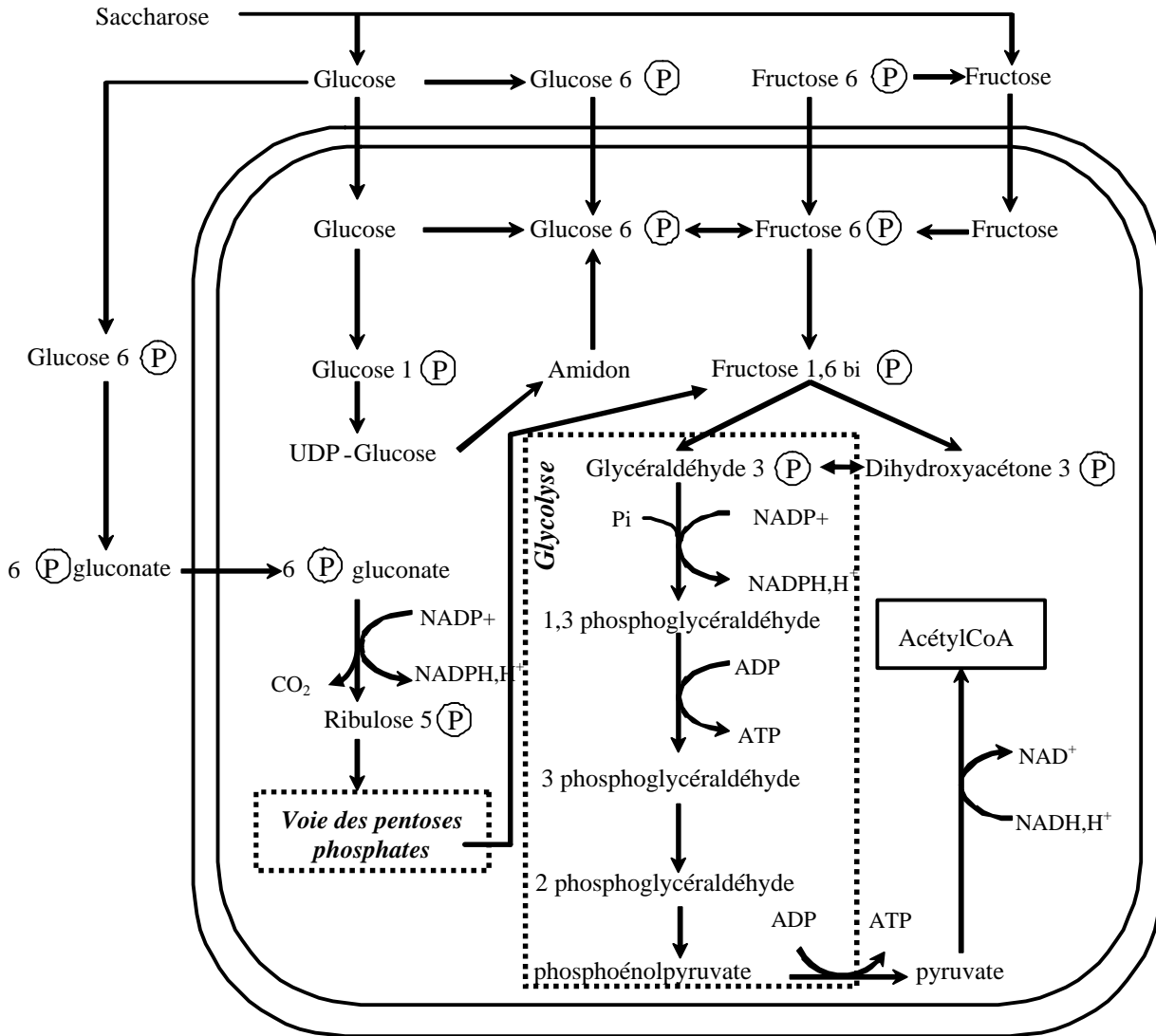
Acides gras saturés	Formule chimique	Formule raccourcie
Acide myristique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	C14:0
Acide palmitique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	C16:0
Acide stéarique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	C18:0
Acide arachidique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	C20:0
Acide béhénique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	C22:0
Acides gras monoinsaturés		
Acide oléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C18:1
Acide érucique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C22:1
Acides gras polyinsaturés		
Acide linoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C18:2
Acide linoléique	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	C18:3

Annexe 2: Exemples de structures des D5-stérols majoritaires des plantes

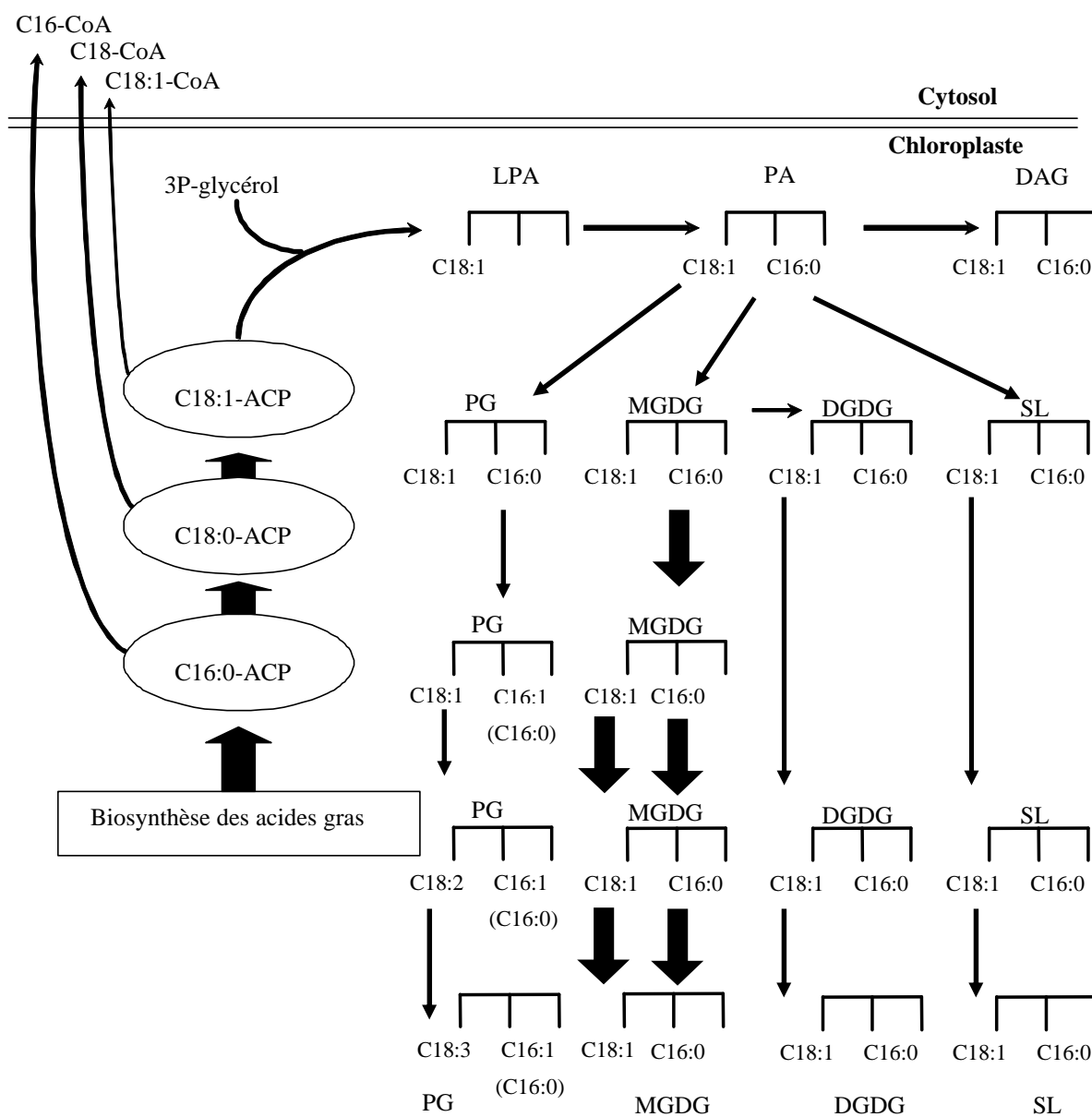


β sitostérol: 24 α -ethylcholest-5-en-3 β -ol, Campestérol: 24 α -methylcholest-5-en-3 β -ol, Stigmastérol: 24 α -ethylcholest-5,22-en-3 β -ol, Δ 5avénastérol: Z-24-ethylidenecholest-5-en-3 β -ol, Δ 7avénastérol: Z-24-ethylidenecholest-7-en-3 β -ol, Gramistérol: 4 α -methyl-24-méthylènecholest-7-ene-3 β -ol, Cycloartérol: 9,19-cyclo-4,4,14 α -triméthylcholest-24-en-3 β -ol d'après Piironen *et al.*, 2000

Annexe 3: Source de carbone de la biosynthèse des acides gras dans les plastes non photosynthétiques (Source: schéma Browse, 1997)



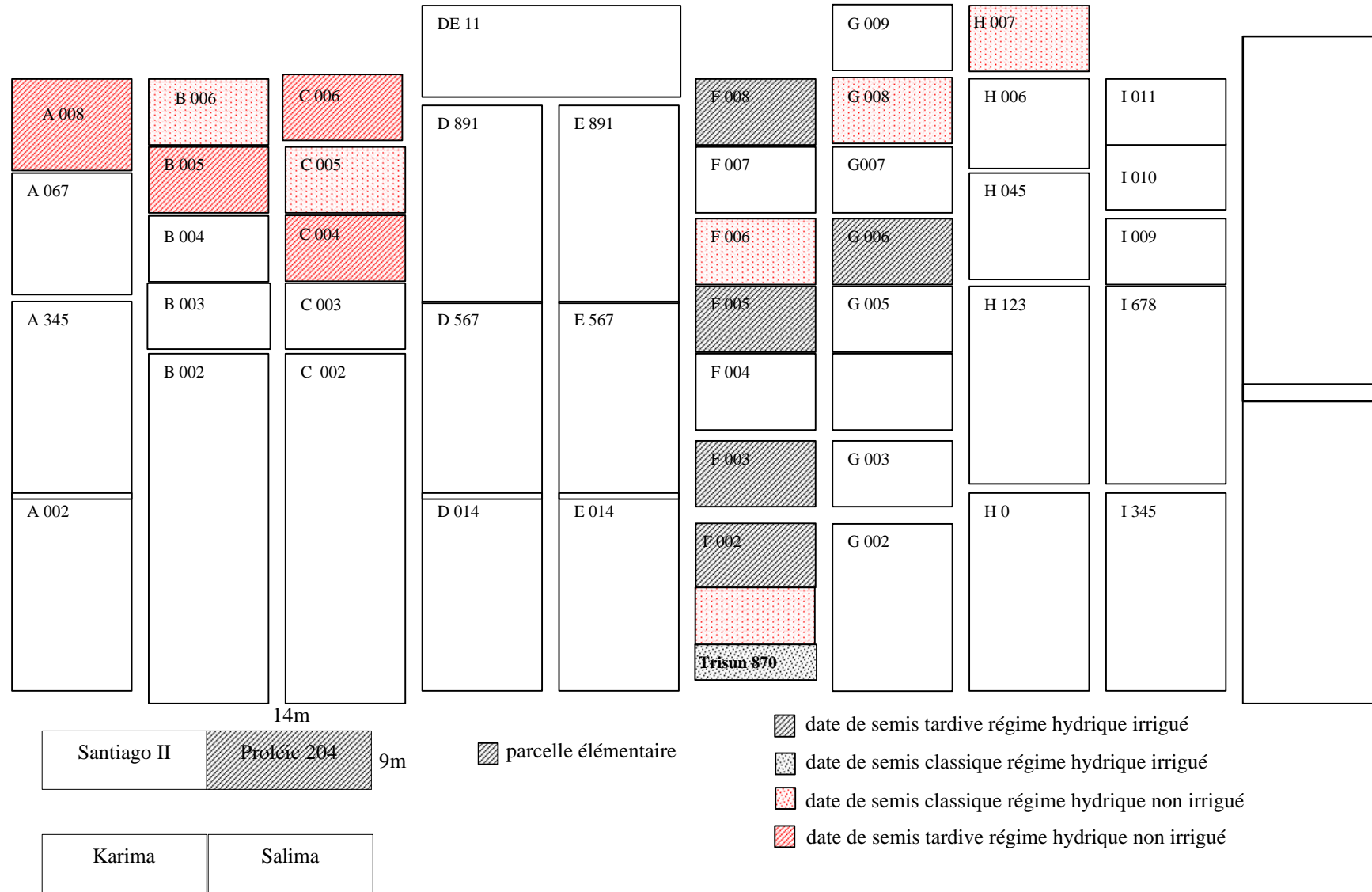
Annexe 4: Voie procaryotique (source: Sommerville *et al.*, 1991)



LPA: acide lysophosphatidique, PA: acide phosphatidique, DAG: diacylglycérol, PG: phosphatidylglycérol, MGDG: monogalactosyldiacylglycérol; DGDG: digalactosyldiacylglycérol, SL: sulfolipides, ACP: acylcarrier protein.

Annexe 5: Dispositif pluriannuel « Rotations-qualité » INRA Toulouse-Auzeville durant l'année 2002

233

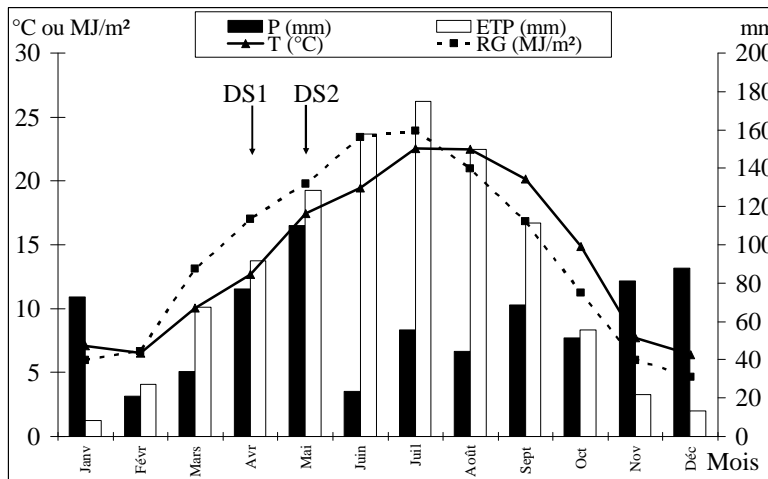


Annexe 6: Composition de la solution nutritive (11még/L) apportée aux plantes cultivées en serre en 2002 (Bouniols *et al.*, 1981)

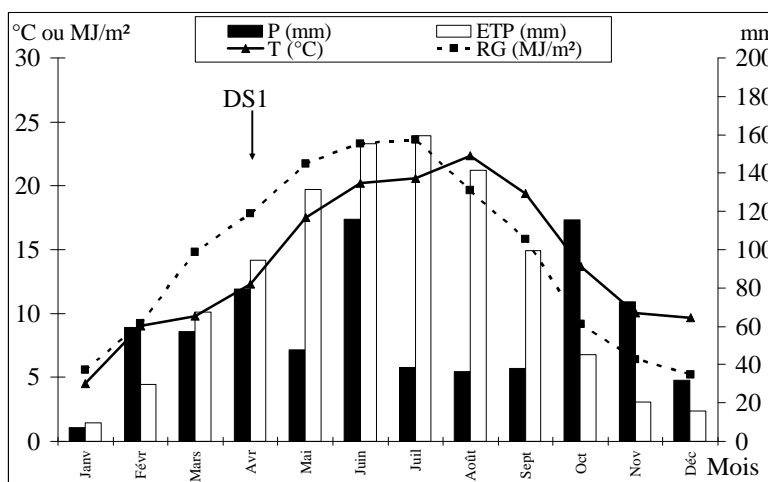
Type de minéraux	Sels	mg/L
Macroéléments	MgSO ₄ , 7H ₂ O	492
	KNO ₃	606
	Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	944
	PO ₄ H ₂ NH ₄	115
Microéléments	H ₃ BO ₃	2.86
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	1.8
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.08
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.22
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.04
	EDTA-Fer	30

Annexe 7: Evolution de la température moyenne (T), des précipitations (P), du rayonnement incident global (RG) et de l'Evapotranspiration potentielle (ETP) mesurés par la station météorologique CIMEL de l'UMR ARCHE (1248) de l'INRA Auzeville durant les années a) 1999, b) 2000, c) 2002, d) 2003, e) 1970-1995 et f) 1995-2005

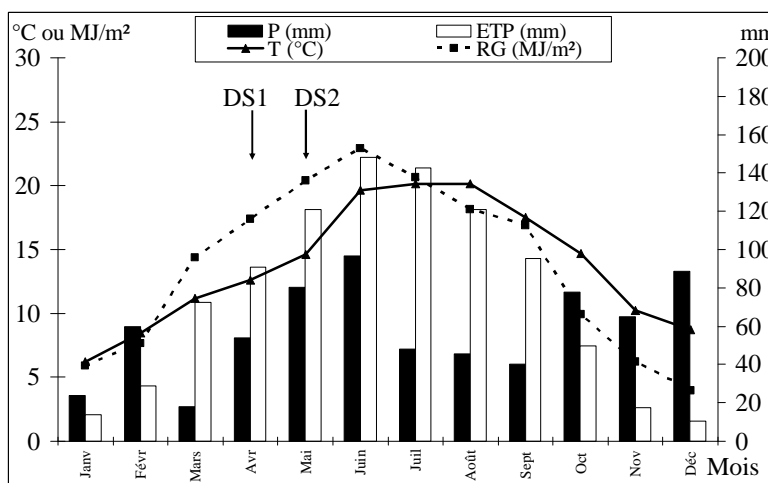
a)



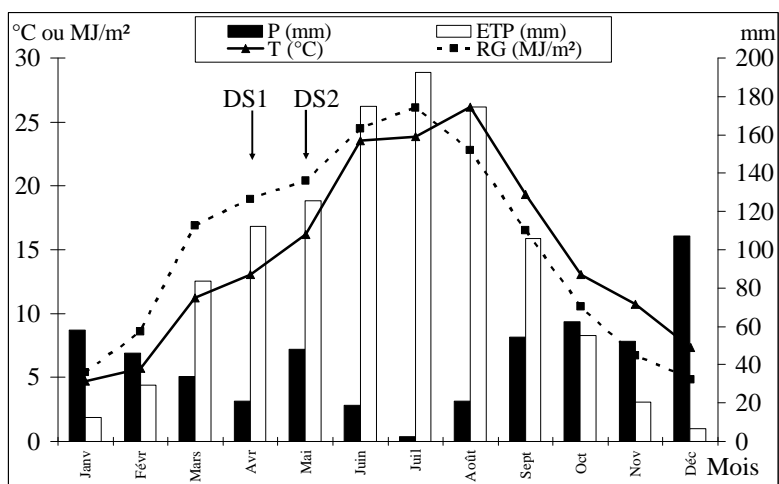
b)



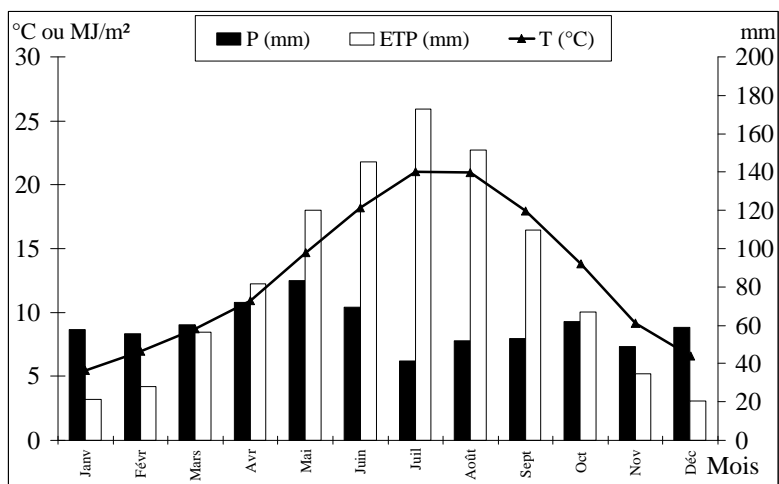
c)



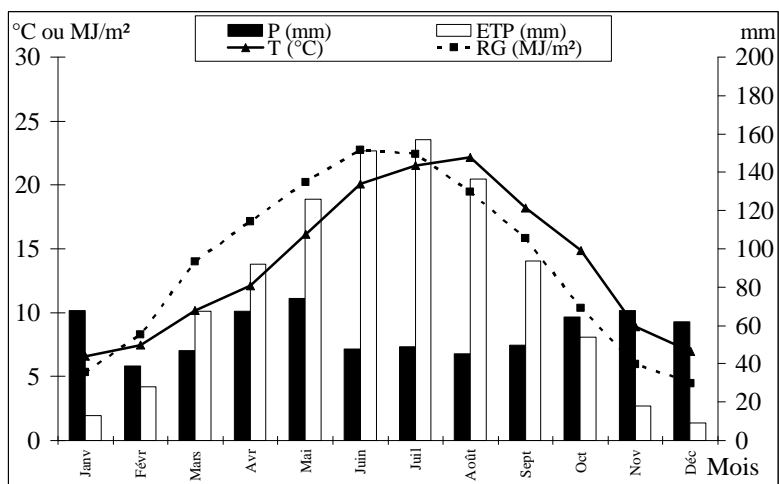
d)



e)



f)

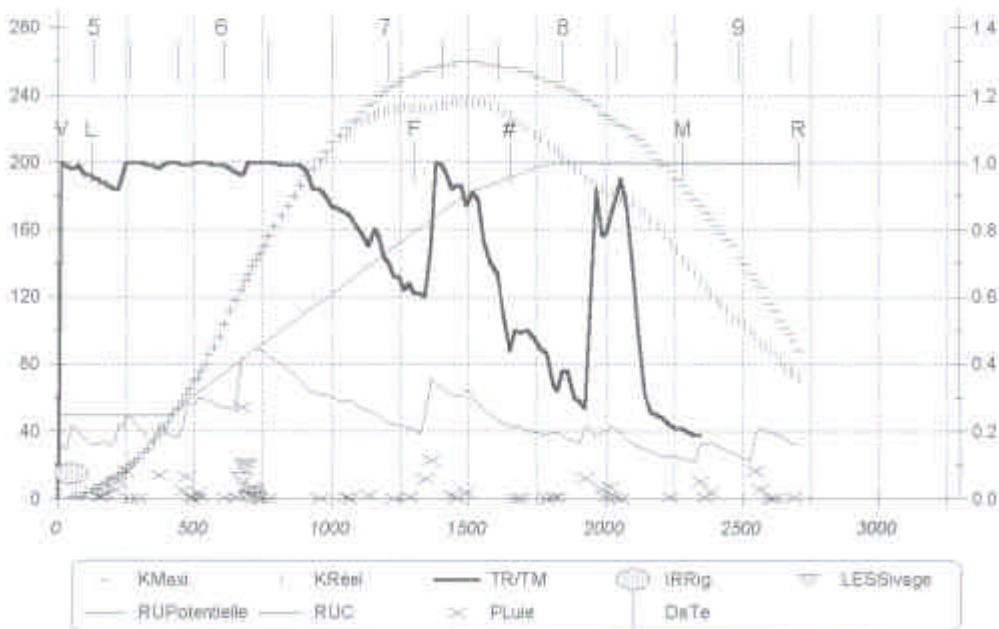


Annexe 8: Bilans hydriques obtenus à partir du logiciel BilH lors des années culturales 2002 et 2003

2002 DS1 NIRR

En végétation (sur somme de °J base 0)

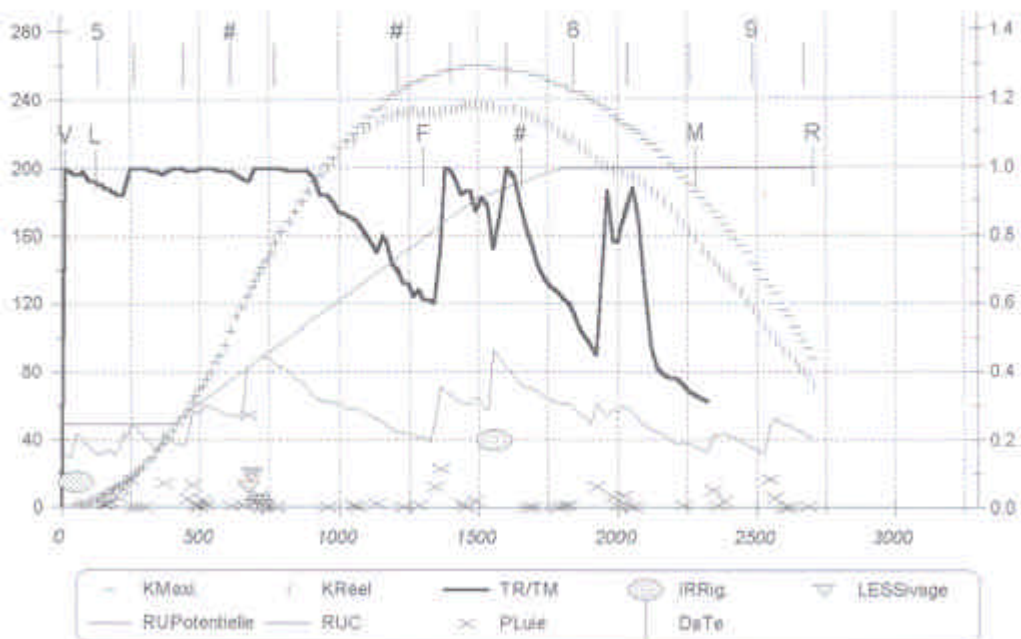
595mm pluie ; 37mm drainés
 15mm irrig ; 286mm évaporés ; 273mm transpirés
 satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 73.1



2002 DS1 IRR

En végétation (sur somme de °J base 0)

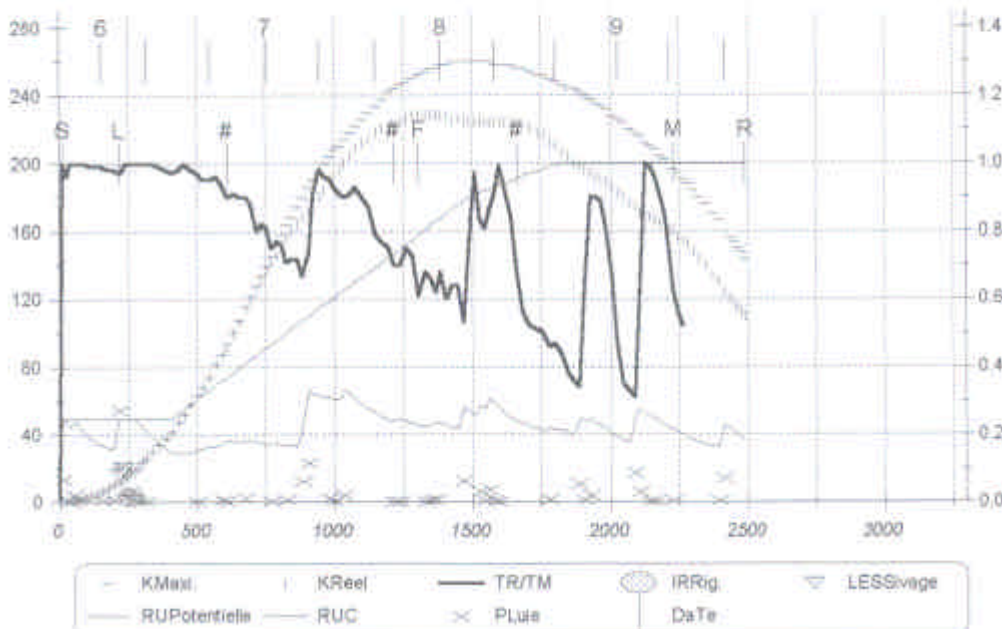
595mm pluie ; 37mm drainés
 55mm irrig ; 284mm évaporés ; 306mm transpirés
 satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 79.0



2002 DS2 NIRR

En végétation (sur somme de *J base 0)

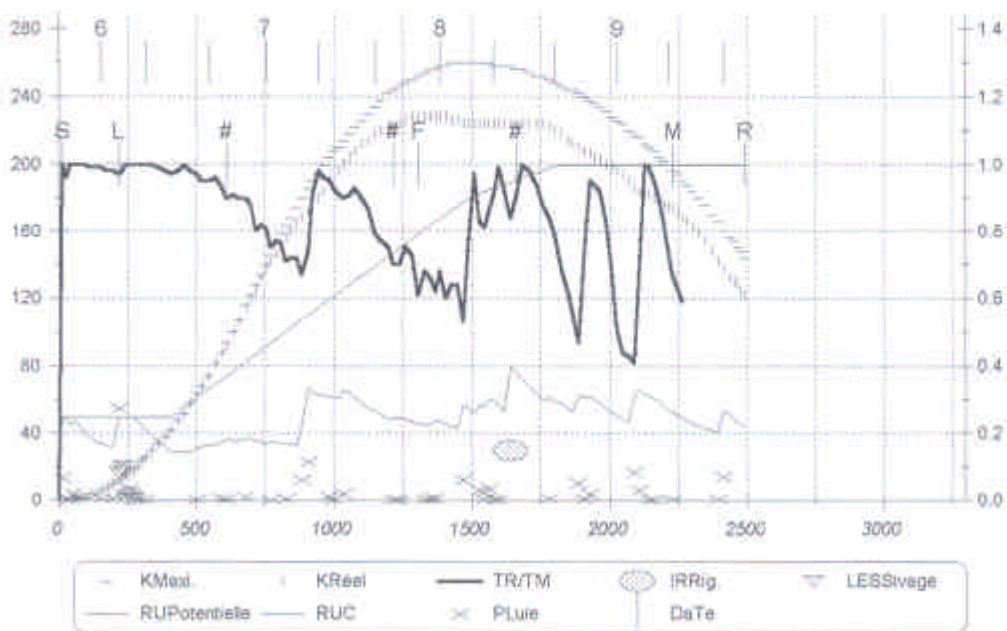
595mm pluie : 42mm drainés
 0mm irrig. : 294mm évaporés : 240mm transpirés
 satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 74.3



2002 DS2 IRR

En végétation (sur somme de *J base 0)

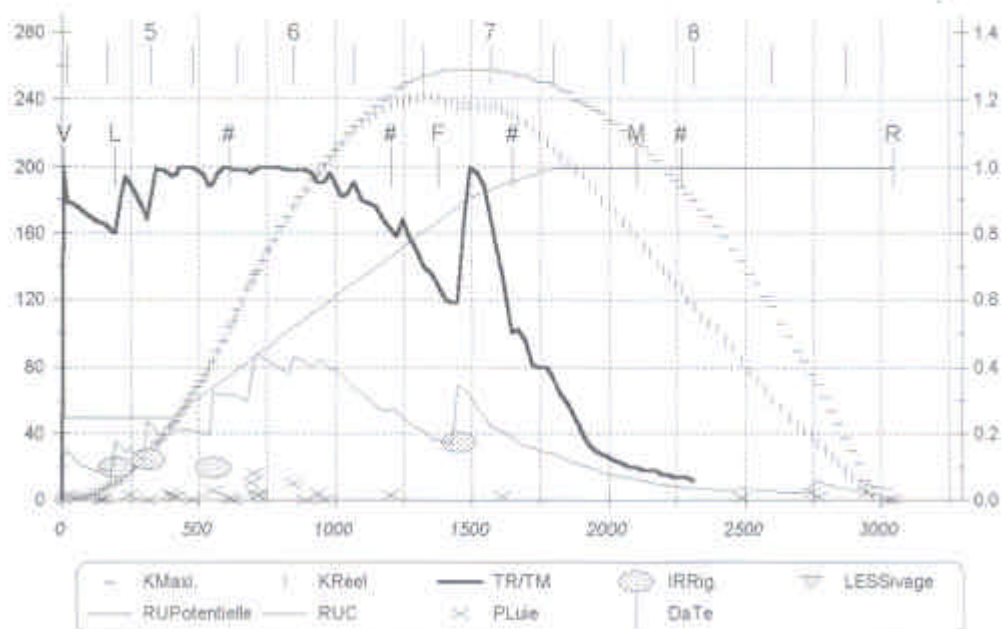
595mm pluie : 42mm drainés
 30mm irrig. : 292mm évaporés : 265mm transpirés
 satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 79.6



2003 DS1 NIRR

En végétation (sur somme de °J base 0)

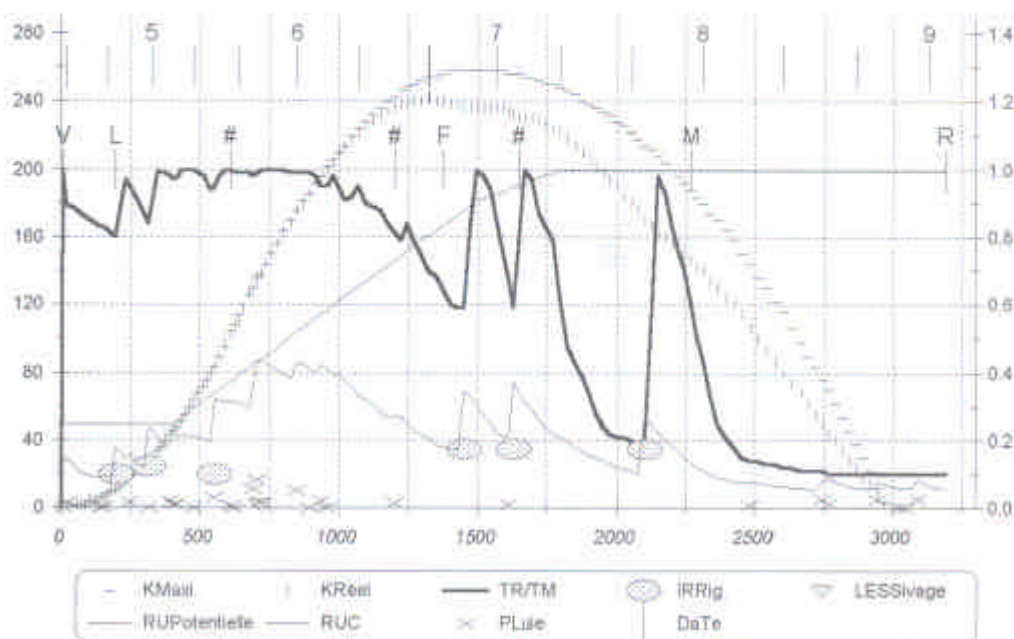
520mm pluie ; 119mm drainés
 100mm irrig ; 278mm évaporés ; 253mm transpirés
 satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 65.0



2003 DS1 IRR

En végétation (sur somme de °J base 0)

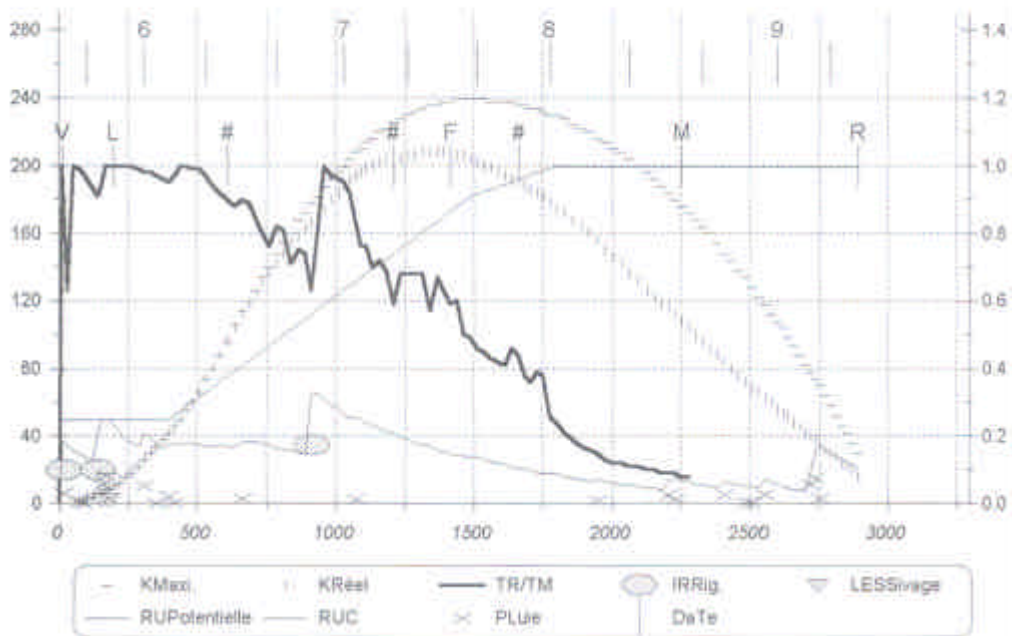
520mm pluie ; 119mm drainés
 170mm irrig ; 288mm évaporés ; 309mm transpirés
 satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 75.1



2003 DS2 NIRR

En végétation (sur somme de °J base 0)

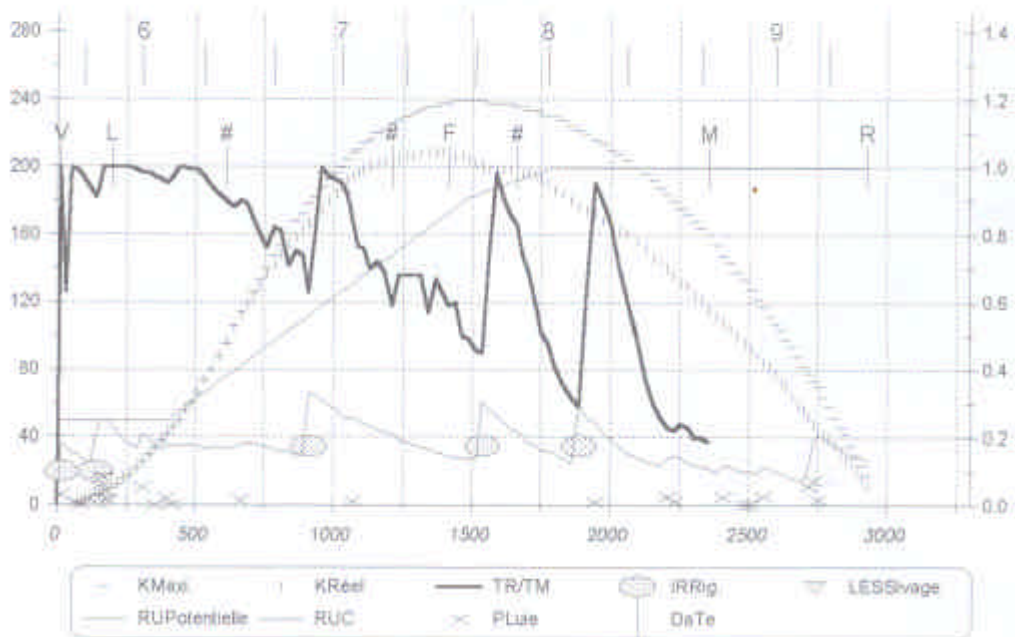
520mm pluie ; 138mm drainés
75mm irrig ; 299mm évaporés ; 189mm transpirés
satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 56.3



2003 DS2 IRR













En végétation (sur somme de °J base 0)

520mm pluie ; 138mm drainés
145mm irrig ; 313mm évaporés ; 238mm transpirés
satisfaction du besoin en eau : TR%TM = 68.8



DS1: date de semis classique, DS2: date de semis tardive, NIRR: régime hydrique non irrigué, IRR: D2i: régime hydrique non irrigué

Annexe 9: Stades phénologiques établis par le CETIOM (Brochure CETIOM, 2002)

Stades repères du tournesol			
Un stade est atteint lorsque 50 % des plantes sont à ce stade. Les codes "lettres" ou "chiffres" sont équivalents.			
Germination-levée		Phase végétative	
 <p>Stade A1 (1.0) Apparition des hypocotyles en crosse.</p>	 <p>Stade A2 (1.1) Emergence des cotylédons et premières feuilles visibles.</p>	 <p>Stade B3-B4 (2.3-2.4) La seconde paire de feuilles opposées apparaît et a environ 4 cm de long ; les pétioles sont visibles du dessus.</p>	 <p>Stade E1 (3.1) Apparition du bouton floral étroitement inséré au milieu des jeunes feuilles : STADE BOUTON ÉTOILÉ.</p>
Phase bouton floral		Floraison	
 <p>Stade E2 (3.2) Le bouton se détache de la couronne foliaire, les bractées sont nettement distinguables des feuilles. Son diamètre varie de 0,5 à 2 cm.</p>	 <p>Stade E4 (3.4) Le bouton est nettement dégagé des feuilles, son diamètre varie de 5 à 8 cm, il demeure horizontal. Une partie des bractées se déploie.</p>	 <p>Stade F1 (4.1) Le bouton floral s'incline ; les fleurs ligulées sont perpendiculaires au plateau.</p>	 <p>Stade F3.2 (4.3) Les trois cercles de fleurons les plus externes ont leurs anthères visibles et dégagées et leurs stigmates déployés. Les trois cercles suivants ont leurs anthères visibles et dégagées.</p>
Maturation			
 <p>Stade M0 (5.0) Chute des fleurs ligulées. Le dos du capitule est encore vert.</p>	 <p>Stade M2 (5.2) Le dos du capitule est jaune. Les bractées sont aux 3/4 brunes. L'humidité de la graine avoisine 20-25 %.</p>	 <p>Stade M3 (5.3) Le dos du capitule est marbré de brun. Les bractées sont brunes. La tige se dessèche. L'humidité de la graine avoisine 15 %.</p>	 <p>Stade M4 (5.4) Tous les organes de la plante sont bruns foncés. L'humidité de la graine avoisine 10 %.</p>

Annexe 10: Conditions de prélèvements au cours des expérimentations menées en 2002 et 2003

Année expérimentale	Conditions expérimentales	Stades de prélèvement	Nombre de plantes prélevées
2002	Contrôlées	M0	12
		M1.1	12
		M1.2	6
		M1.3	6
		M1.3	3
		M2	3
		M4: récolte	3
		M0	9
		M1.1	9
		M1.2	9
2003	Naturelles	M1.3	9
		M1.3	9
		M2	9
		M4: récolte	9
		M0	12
2003	Naturelles	M2	12
		M4: récolte	12

Annexe 11: Conditions d'extraction de l'huile par la technique Accelerated Solvent Extractor (ASE 200⁰ Dionex) d'après Matthäus et Brühl (2001)

Cellule d'extraction	11 ml
Pression	6.67 MPa
Température d'extraction	105 °C
Temps d'extraction	10 min
Nombre de cycle	4
Taux de renouvellement du solvant	60%
Temps de rinçage	1 min
Solvant	cyclohexane

Annexe 12: Protocoles, conditions de dosage et caractéristiques de l'appareil CPG pour le dosage des acides gras

Protocole d'extraction des acides gras à partir de l'huile

100 mg d'huile sont pesés dans un tube à essais.

L'huile est solubilisée dans 5 mL un solvant organique: le Terbutylméthyl éther (TBME).

Après agitation, 150 µL sont prélevés et transférés dans un vial adapté pour l'analyse en CPG.

Protocole d'extraction des acides gras à partir du broyat de graines (FAME, norme ISO 5509: 1990)

400 mg de graines broyées sont placées dans un tube à essais auquel sont rajoutés 5 mL de TBME (Scharlau, ME0552).

Plusieurs agitations sont nécessaires pour bien solubiliser l'huile (60 secondes au vortex suivies de 60 secondes de repos, puis 30 secondes au vortex de nouveau).

Après 60 secondes de repos, l'échantillon est filtré avec un filtre Acrodisc GHP[®] 13mm, munie d'une membrane GHP 0.45µm (Pall, France) à l'aide d'une seringue afin de séparer la phase organique du broyat. 150 µL de ce filtrat sont transférés dans un micro tube pour analyse en CPG.

Protocole de dosage des acides gras en CPG

150 µl du mélange huile/TBME issus de l'extraction d'acides gras sur huile ou du filtrat de l'extraction d'acides gras sur broyat de graines (FAME) sont transestérifiés par un ajout de 50 µl de Triméthylsulfonium hydroxyde (TMSH) (Macherey-Nagel). Cette réaction a lieu au moment de l'injection sous l'effet de la température et forme des esters méthyliques d'acide gras.

Généralement, les composés les plus volatils sont les plus rapidement entraînés du fait de leur tension de vapeur plus élevée. Le calibrage de la méthode d'analyse en CPG se fait via l'interface informatique qui permet de programmer tous les paramètres utiles, et en particulier la température qui permet d'optimiser la séparation des acides gras. Les conditions optimales utilisées sont les suivantes:

- température de l'injecteur: 220°C,
- température de la colonne: 185°C,
- température du détecteur: 220°C,
- pression du gaz vecteur (l'hélium): 200 KPa.

10 µl ont été injectés dans une colonne capillaire apolaire CP select CB de 0,25 mm de diamètre intérieur et 50 m de long d'une CPG Varian GC-3800. Ce chromatographe est équipé d'un passeur d'échantillons et un système d'injection automatique permettant la programmation de 48 échantillons par série.

Annexe 13: Protocoles, conditions de dosage et caractéristiques de l'appareil CPG pour le dosage des phytostérols

Protocole d'extraction des phytostérols

50 µL de solution d'étalon interne de cholestanol à 2 g.L⁻¹ (Dihydrocholesterol, Aldrich Chem. Co.) sont dissous dans du chloroforme. Après évaporation du chloroforme, environ exactement 100 mg d'huile ou 500 mg de graines broyées sont ajoutés au cholestanol.

La saponification est réalisée par ajout de 2 mL (ou 4 mL dans le cas des graines) de KOH 1M dans l'éthanol (TITRINORM™, Prolabo), suivie d'une agitation au vortex et d'un chauffage de 30 minutes (60 min pour la méthode sur graine) à 60°C. Après refroidissement, les ajouts successifs de 1 mL d'eau et 3 mL d'isohexane (Merk), suivis d'une décantation, permettent d'obtenir un biphasé sur lequel la phase supérieure hexanique est prélevée. L'ajout d'isohexane, la décantation, et le prélèvement de l'épiphase, sont répétés 2 fois. Les 2 épiphases sont regroupés et 160 µl sont prélevés dans un microtube en vue de leur analyse en CPG.

Protocole de dosage des phytostérols en CPG

Au moment de l'injection, les phytostérols sont silylés par ajout de 1ml de N-méthyl-N-triméthylsilyl-heptafluorobutyramide (MSHFBA, Macherey-Nagel) mélangé à 50µl de 1-méthylimidazole (Sigma). Le mélange réactionnel est chauffé 5 min à 105°C pour favoriser la silylation. 1µl de dérivés stérol triméthylsilyl éther sont injectés dans une GC Perkin-Elmer équipée d'une colonne CPSIL 5CB 30m (D:0.25mm) et d'un détecteur FID. Le passeur d'échantillons et le système d'injection automatique permettent d'analyser 82 échantillons dans une même série. L'hélium est également le gaz vecteur avec une pression en tête de colonne de 100 kPa. Les conditions de température permettant une séparation optimale sont les suivantes:

Températures du four:

- 160°C (0.5min),
- 10°C/min until 260°C,
- 2.5°C/min until 300°C,
- 25°C/min until 350°C,
- 350°C (1.5min)

Températures de l'injecteur:

- 55°C (0.5min),
- 200°C/min until 320°C,
- 30°C/min until 350°C,
- 350°C (2.5min)

Température du détecteur: 365°C

Annexe 14 : publication soumise à Plant Cell & Environment

Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray

J. Roche^{1*}, T. Hewezi^{2*}, A. Bouniols¹ & L. Gentzbittel²

¹UMR 1248 INRA Centre de Toulouse, Chemin de Borde Rouge, BP 27 31326, Auzeville, Castanet-Tolosan France and ²Laboratoire de Biotechnologies et Amélioration des Plantes (BAP), INP-ENSAT, Pôle de Biotechnologies Végétales, IFR 40, 18 Chemin de Borde Rouge, BP107, Auzeville, 31326 Castanet Tolosan, France

Correspondence: Laurent Gentzbittel. Fax: 33 05 62 19 35 89

e-mail: gentz@ensat.fr

*: These authors participated equally in this work

Abstract

A sunflower cDNA microarrays containing about 800 clones covering major metabolic and signal transduction pathways was used to study gene expression profiles in leaves and immature seeds of drought-tolerant and drought-sensitive genotypes subjected to water-deficit stress under field conditions. Two-step ANOVA normalization and analysis models were used to identify the differentially expressed genes. Forty-four cDNA clones exhibiting different patterns of gene expression in the three investigated genotypes under water deficit conditions have been identified. Two-third of these differentially expressed genes was found to express opposed gene expression profiles in drought-tolerant genotype when compared with drought-sensitive genotypes. This trend of dissimilarities provides suggestion that the difference between tolerant and non-tolerant plants seems to be associated with qualitative but not quantitative mRNA expression changes. Comparison of the expression profiles in leaves and immature seeds in response to water deficit allowed us to identify 82 cDNA clones showing organ-specific variation in expression levels across all genotypes. Genes related to amino acids metabolism, carbohydrates metabolism, PS1 and signal transduction components were induced in immature seeds and repressed in leaves. This implies that vegetative and reproductive tissues response differentially to low water availability-stress. Some new adaptive mechanisms determining the water deficit tolerance have been proposed and discussed.

Introduction

Plant growth and performances are greatly affected by environmental abiotic stress, such as drought, high temperature and salinity. In response to drought, plants undergo significant morphological and metabolic changes that are believed to be adaptive responses by which plants cope with water stress. In sunflower plants, water deficit modifies major physiological processes involved in seed and plant development leading to a reduction in crop yield by shortening the period of assimilate transfer to the seeds (Hall, Whitfield & Connor 1990), and to modifications in biochemical seed composition (Roche *et al.* 2004).

Molecular and physiological observations associated with genetic differences in drought tolerance have been reported in sunflower (Cellier *et al.* 1998). Identification of differences and similarities in gene expression patterns between drought-tolerant and drought-sensitive genotypes is thus required to complete our information concerning the cellular response during water stress. Understanding how plants develop stress response in tissues with different function and activities such as vegetative and reproductive organs is also important. In this context, gene expression studies can give insight into the physiological molecular basis of stress tolerance in plants.

Although sunflower is one of the most important oil crops worldwide, it is still considered as a poorly characterized plant system among the oil crop plants. Some characteristics such as large genome size (3000 Megabase), a most probably duplicated genome, and also difficulties with technical applications of regeneration and genetic transformation have largely limited the molecular analysis of sunflower. The most recent advances towards the characterization of sunflower are the generation of a non-negligible number of public or private EST (Expressed Sequences Tag) (Tamborindeguy *et al.* 2004; Ben *et al.* 2005). This significant collection of EST presents an opportunity to analyse gene expression at genome-scale, which would be useful to improve understanding of many biological and physiological processes.

The analysis of expression patterns of carefully selected genes related to given metabolism or signalling pathways across wide range of environmental stress conditions will increase our knowledge about stress adaptation processes and could led to the identification of key pathways involved in the plant response to water stress. A microarray approach is of particular interest for the simultaneous analysis of the expression profiles of hundreds or thousands of genes. Microarrays can provide reliable data when comparing the expression level of the same mRNA under different conditions, but comparing the relative expression of different genes under the same condition is not evident (Ohlrogge *et al.* 2000). A microarray approach was used intensively to monitor global gene expression in response to water-deficit stress in the model plant *A. thaliana* and in a few number of

well characterized plants such as rice, and maize (Seki *et al.* 2002; Kreps *et al.* 2002; Oono *et al.* 2003; Kawaguchi *et al.* 2004; Rabbani *et al.* 2003; Yu & Setter 2003). It is estimated from transcript profiling that several hundreds of genes may be involved in water stress responses. The products of these genes can be classified into two main categories. The first includes those genes that function directly in the protection of membranes and proteins such as heat shock proteins, chaperon, late embryogenesis abundant proteins, osmoprotectants and free-radical scavengers whereas the second group includes those that control gene expression and signal transduction (Bray 2002; Zhu 2002; Wang, Vinocur & Altman 2003; Seki *et al.* 2003). Comparison of water-deficit regulated genes derived from three different microarray experiments in *A. thaliana* (Seki *et al.* 2002; Kreps *et al.* 2002; Kawaguchi *et al.* 2004) revealed that only a small set of genes was commonly regulated (Bray 2004). Although the same ecotype of *Arabidopsis* was used in these experiments, the observed expression profiles seem to be linked to specific experimental conditions rather than a general response to water stress (Bray 2004). This finding indicates that global gene expression studies conducted under laboratory conditions can not provide a clear picture of water deficit stress under natural growth conditions. Therefore, studying of gene expression in response to water-deficit stress under field conditions is necessary to obtain a clear picture of cellular activities and molecular mechanisms that underlie adaptation response to low water availability stress.

To gain insight into metabolic modifications and the regulatory control of cellular processes that are associated with water-deficit stress in sunflower plants, we constructed a thematic sunflower cDNA microarrays containing about 800 clones representing high sequence similarity with known or predicted *Arabidopsis* genes and covering the major metabolic pathways and signal transduction. This array was used to profile the mRNA abundance in leaves and immature seeds of drought-tolerant and drought-sensitive genotypes subjected to soil water deficit stress under field conditions. We used analysis of variance to identify water deficit-regulated genes and to assess the variation in transcript abundance between genotypes and between vegetative and reproductive organs in response to water-deficit stress.

Material and methods

Plant material

Three genotypes, selected for agronomic quality traits such as oleic acid content and their capacity to tolerate different levels of water deficit stress, were used in this study. These include Santiago II, a standard hybrid presenting classical oleic acid content and provided by North Company Krups (now Syngenta group), Proleic 204, an oleic hybrid from Rustica (now Euralis Soltis), and Ichraq, a sunflower population from INRA-Morocco commonly used in water-scarce resources areas.

Field set up and cultural practices

Experiments were conducted at INRA Auzeville-Toulouse-France on Rotations-Quality device under controlled irrigated and non irrigated conditions. Sunflower plants were sown at 7.1×10^4 plants/ha the 7th of April 2003. The development of the crop was defined by the main phenological stages of the crop (VE, R1, R5.1, R6, R8, R9 described by Schneiter & Miller 1981) that were observed weekly. Irrigation with automatic sprinklers was applied after flowering (R5.1) until R6 stage in order to satisfy approximately 70 % of sunflower water requirements. Irrigation amount was determined by a meteorological approach considering variations of cultural coefficients with sunflower phenological stages (Picq 1989) and based on transpiration potential (TP), rainfall, mean temperature and total solar radiation (Table 1) collected from the meteorological station of INRA in order to determinate water deficits corresponding to water availability in soil.

Water stress measurements

Leaf water potential (LWP) and water deficit (WD), as indicators of plant and soil water availability respectively, were used to characterize water stress (Table 2). LWP was measured using a pressure chamber (Scholander *et al.* 1965) according to Turner (1981) with a measurement limit of -6 MPa, on the fully expanded youngest and mature leaf corresponding to 18th foliar row, in well-lighted condition at mid-day (1.00 – 3.00 PM). LWP measurements were made at three phenological stages (R5.1, R6, R8). WD was calculated for each treatment and genotype and used as a water status soil indicator. At flowering (R5.1 stage), the three genotypes exhibited almost similar values of LWP. Water-deficit stress applied after flowering is associated with a decrease of LWP at R6 stage, reflecting a water stress in all genotypes (table 2). Similarly, the water deficits values between irrigated and stressed treatments indicate a difference of water soil status during seed filling period (Table 2).

Tissues samples

Two weeks after flowering (R6), leaf samples as well as immature embryos were collected, at the same time, from the three genotypes under irrigated and stressed conditions. For each treatment, samples from 8 different individuals were pooled on one sample. Two independent biological samples for each treatment were used for RNA extraction and probe synthesis.

Microarrays preparation

The sunflower Expressed Sequences Tag (EST) clones were selected from different cDNA libraries (Tamborindeguy et al., 2004; Ben et al., 2005) based on sequence homology to already known or predicted *Arabidopsis thaliana* genes involved in main primary metabolic pathways and signal transduction. Using BLASTX programme, sequences with significant similarities (E value $< 1.0 \times 10^{-10}$ or BLAST score > 100) were selected. The selected cDNA clones were incubated into 96-well microplates containing 200 μ l of culture medium (LB) with 100 mg l⁻¹ Ampicillin for 37°C or 31°C and 200 rpm in a shaking incubator. 5 μ l of bacterium suspension was transferred into thermowell 96-well plates containing 95 μ l of MilliQ water. The plates were then heated to 95°C for 10 min in a laboratory oven, followed by centrifugation at 1200 g for 3 min to remove the cellular debris. 8 μ l of the supernatant were used to amplify the cDNA insert using primers pairs specific for the vector ends. For amplification of clones in pSport1, PCR4 and pGMT the universal M13 forward 5' GTTTTCCCAGTCACGACGTTG 3' and M13 reverse 5' TGAGCGGATAACAATTTTCACACAG 3' were used. For inserts in pTriplEx2, the forward and reverse oligonucleotides were 5' TCCGAGATCTGCACGAGC 3' and 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' respectively. The PCR reaction was performed in 100 μ l containing 10 μ l 10X buffer, 2.5 mM of MgCl₂, 200 μ M of dNTP and 0.2 μ M of each primer and 3 units of Taq DNA polymerase (Qiagene, France). DNA samples were denaturated at 95°C for 2 min followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 30 sec, 52°C for 30 sec and 72°C for 2 min followed by a final extension step at 72°C for 7 min. The size and quality of all PCR products were tested by agarose gel electrophoresis. PCR samples showing double bands were removed or replaced by another cDNA clones belonging to the same contig. The PCR solutions were then concentrated by evaporation using vacuum speed at 70°C for 1 h30 and the products were then suspended in 40 μ L of water to obtain a concentration of approximately 300-500 ng μ l⁻¹. Finally, the concentrated PCR products were arrayed onto Hybond N+ nylon membrane (Amersham, France) using the MicroGrid II (Biorobotics LTD, Cambridge, U.K.) with 6 microarraying pins. A 12x12 gridding pattern and a distance of 0.5 mm between spots were used. The spotting was performed at the "Centre de Ressources-Génotypage, Séquencage" of Toulouse, France. To increase the reliability of signal, each PCR sample was arrayed twice in a random way to yield a total of 1726 data points. After spotting the nylon membranes were placed

facing up onto Whatman paper moistened with denaturation solution (1.5 M NaCl and 0.5 M NaOH) followed by neutralization solution (1.5 M NaCl and 1 M Tris HCl, pH 7.4) for 20 min each. The treated membranes were then dried at 80°C for 2 h followed by UV crosslinked with a UV Stratalinker 1800.

RNA extraction and probes preparation

Total RNA was extracted from leaves and immature seeds as described by Verwoerd, Dekker & Hoekema (1989). Single-stranded probes were synthesized from DNase-treated RNA using Advantage RT-for-PCR Kit (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). The reaction mixture containing 10 µg of total RNA and 40 pmol oligo (dT₁₈) was heated at 70°C for 2 min. Then, 8 µl of 5X reaction buffer, 2 µl of dNTP mix (0.625 mM dATP, 0.625 mM dTTP, 0.625 mM dGTP and 0.625 µM dCTP), 4 µl of [³³P] dCTP (40 µCi), 1 µl (1 unit) of RNase inhibitor and 2 µl (400 unites) of MMLV Reverse transcriptase were added. The reaction was incubated at 42°C for 1h. An additional 200 units of MMLV Reverse transcriptase were added and the mixture was incubated for another 60 min at 42°C followed by heating at 94 °C for 5 min to stop the synthesis reaction and to destroy any DNase activity. To remove unincorporated labelled nucleotides, the radiolabelling reaction was purified by passing the reaction mixture through Probe Quant G-50 Micro Columns (Amersham). The purified radiolabelled cDNA was then used for hybridization. Hybridization was performed in a buffer containing 0.5% SDS, 5X SSC, 0.1% each of Ficoll 400, Polyvinylpyrrolidone and Albumine Bovine Fraction and 100 µg ml⁻¹ of Salmon sperm DNA (Sigma, France) at 65°C for 24 h. Membranes were washed twice with buffer containing 0.1% SSC and 0.1% SDS at 65°C for 15 min each. The membranes were then exposed to Fuji film imaging plate as a radioactive energy sensor. The radioactive intensity of the spots were captured using Bio-Imaging Analyzer BAS-5000 (Fujifilm) with density gradation of 16 bit/pixel at a resolution of 25 µm/pixel. Signals and background quantification were performed using ArrayGauge V.1.3 (Fujifilm) and the numeric values were used for statistical analysis.

Data normalization and ANOVA analysis

We used analysis of variance (ANOVA) models, to both estimate relative gene expression and to account for other sources of variation in microarray data (Wolfinger *et al.* 2001; Kerr, Martin & Churchill 2000). A two-pass general linear model as described by Wolfinger *et al.* (2001) was used to normalize the data and then to detect differentially expressed genes. We subjected the log₁₀-

transformed scores for all spot measures (y_{ijklm} being the measured intensity for gene x subject to water treatment i , in the genotype j in the organ k for the spot m on array l) to a normalization model based on a four-way ANOVA, of the form

$$y_{ijklm} = \hat{\mu} + Tr_i + Tm_j + Gn_k + Tr_i \cdot Tm_j + Tr_i \cdot Gn_k + Tm_j \cdot Gn_k + Tr_i \cdot Tm_j \cdot Gn_k + S_l(T_i \cdot Tm_j \cdot Gn_k) + \hat{\mu}_{ijklm}$$

where Tr_i is the water treatment effect (irrigated, non-irrigated ie $i=1 ; 2$), Tm_j is the genotype effect (Ichraq, SantiagoII and Proleic204 ie $j=1 ; 2 ; 3$), Gn_k is the organ effect (leaves and immature seeds ie $k=1 ; 2$), S_l is the membrane effect within combination of the factors and $\hat{\mu}_{ijklm}$ is the stochastic errors. The residuals from this model can be regarded as a crude indicator of relative expression level and are referred to as 'normalized expression levels'. We retained as 'above background genes' the genes for which the normalized expression levels of the two spots on a given slide are above the maximum of the empirical distribution of normalised expression levels for the control spots. The gene-specific models were of the form

$$r_{ijklm} = G_x + G_x \cdot Tr_i + G_x \cdot Tm_j + G_x \cdot Gn_k + G_x \cdot Tr_i \cdot Tm_j + G_x \cdot Tr_i \cdot Gn_k + G_x \cdot Tm_j \cdot Gn_k + \hat{\mu}_{ijklm}$$

where r_{ijklm} is the normalized expression levels of gene x . The $G_x \cdot Tr_i$, $G_x \cdot Tm_j$ and $G_x \cdot Gn_k$ effects quantify the overall variability of a gene as a function of the treatment, the genotype or the organ respectively. The effects of particular interest are the $G_x \cdot Tr_i \cdot Tm_j$ and $G_x \cdot Tr_i \cdot Gn_k$ interactions, measuring the gene expression level in genotypes and organs as a function of water deficit treatment respectively. A test for heterogeneous variances for the normalized expression levels among tissues was done using the Levene test, for each gene-model. The Bonferroni method was used to conservatively reduce errors due to multiple tests (at alpha=0.05 or 0.1). 'Volcano plots' of significance against magnitude of effects were drawn for each main effect. Computations were made on a PC running GNU/Linux (Suse 9.0) and R 1.9.0 statistical system.

Real-Time RT-PCR

The expression abundance of 11 and 8 EST showing significant water stress x genotypes interaction and water stress x organs interaction respectively were tested to confirm the results obtained from microarray experiments. First strand cDNA was reverse transcribed from 5 μ g of DNase-treated RNA as described before. Gene-specific primers was designed using the Primer Express software, version 2.0 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). The reaction was performed in 20 μ l containing 10 μ l 2X Syber Green Mastermix (Applied Biosystems), 300 nM of each primer and 1 μ l of 5 fold-diluted RT products. The PCR reactions were run in ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) using the following programme: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Following PCR amplification, the

reactions were subjected to temperature ramp to create the dissociation curve, measured as changes in fluorescence measurements as a function of temperature, by which the non-specific products can be detected. The dissociation programme was 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec followed by 20 min of slow ramp from 60°C to 95°C. Three replicates of each reaction were performed and *Actin*, as putative constitutively expressed gene, was used as internal control for normalization. Quantifying the relative changes in gene expression was performed using $2^{-\Delta\Delta CT}$ method as described by Livak & Schmittgen (2001).

Results

Construction of the thematic microarray and experimental design

Using the BLASTX programme, we carefully selected 785 sunflower EST showing significant homology (E value $< 1.0 e^{-10}$ and/or BLAST score > 100) to already known or predicted genes in *Arabidopsis thaliana*. The selected clones were divided into two main categories. The first category contains clones covering the main primary metabolic pathways including fatty acid biosynthesis and metabolism (26 clones), fatty acid desaturation (5 clones), glycerolipid metabolism (27), tocopherol biosynthesis (11 clones), amino acid metabolism (174 clones) carbohydrate metabolism (117 clones) and energy metabolism (74 clones) whereas the second category contains clones related to signal transduction and regulation including protein kinases (173 clones), protein phosphatases (45 clones), receptors (25 clones) and transcription factors (108 clones). The full list of the selected EST as well as their putative functions is found in the supplemented data.

24 different radiolabelled probes corresponding to 3 genotypes, two conditions (stressed and control treatments), two tissues (leaves and immature seeds) and two biological repeats were synthesized and used to hybridize with the nylon filters.

The normalization of the data was performed using ANOVA method, according to the experimental variations, *i.e.* the genotype effects, location effects and tissue effects that were found to be highly significant (data not shown). The residuals from this model which represent normalized expression values were used in second models (gene models) to estimate genotypes, tissue and water stress effects as well as interaction effects, on the expression level for each gene on the array. Over the range of standardised expression values, the correlation between the two biological repeats were found to be very high (r^2 ranges from 0.55 to 0.87) indicating that measurements of gene expression levels are highly reproducible and that no artefactual differences due to sample heterogeneities are detected.

For genes showing only genotype-specific variation in expression profiles across all factors, the genotypes main effect was partitioned into two contrasts, Ichraq *vs.* Santiago II (standard drought tolerant genotype *vs.* the standard elite genotypes); and Proleic 204 *vs.* Ichraq and Santiago II (oleic elite genotype *vs.* the standard genotypes).

Drought-tolerant genotype vs. non tolerant one

At a p -value cut off of 10^{-4} , chosen to account for multiple-test comparisons and to ensure a low false-discovery rate, 31 cDNA clones showing variations in expression levels between tolerant genotype (Ichraq) and the non-tolerant genotype (Santiago II) across all treatments have been identified. These differentially expressed genes are presented as 'volcano plots' of significance against magnitude of effects in Figure 1. After excluding 28 EST that showed significant interaction effects, only 3 cDNA clones appeared to exhibit significant differences in the transcriptional activity exclusively between the tolerant and non-tolerant genotypes. Two of them were found to be induced in the tolerant genotype whereas the third clone displayed preferential expression patterns in Proleic 204 and Santiago II (Table 3).

Oleic genotype vs. standard genotypes

After withdrawing 11 cDNA clones showing significant interaction effects, 12 ESTs showing significant variability of mRNA expression among oleic hybrid (Proleic 204) and standard hybrids (Ichraq and Santiago II) at a p -value less than 10^{-4} have been identified. The majority of these genes (10) are induced in the standard hybrids while the remaining 2 clones were found to be repressed in Santiago II and Ichraq. These regulated genes were distributed throughout different functional categories and are provided in Table 3 together with their putative functions. We can notice that 6 out of the 10 clones up-regulated in standard hybrids, are potentially involved in amino acid metabolism. These clones may code for enzymes involved in glycolysis and the citrate cycle.

Effect of water stress treatment on global gene expression

ANOVA analysis identified 29 EST exhibiting overall significant variations in transcript abundance between stressed and control treatments irrespective the genotypes or organ tissues (Figure 3). Of these, 25 clones exhibited significant treatment \times genotypes interactions or treatment \times organs interaction and will be discussed later. The 4 remaining clones potentially code for omega-6 fatty acid desaturase, cytochrome b6/f complex subunit IV, and enzymes involved in glutathione metabolism (HO0002G11F, EC:2.5.1.18) and tryptophan metabolism (DH0AQA14ZC04RM, EC:1.2.1.-) (Table 4). The first three clones were up-regulated at the same level under non-irrigated conditions whereas the fourth one was found to be down-regulated. The significant effect of these genes denotes that the expression pattern is regulated by water deficit by the same way in both

vegetative and reproductive tissues of the three genotypes. This suggests that these genes are a part of the general water deficit responses in sunflower plants. The low number of genes exhibiting overall significant effects in response to water stress reflect the fact that most of the water-deficit regulated genes are specific to organ tissues or genotypes and will be discussed as interaction effects (see below).

Opposed transcriptome activities occur between tolerant and non-tolerant genotypes under water stress

The ANOVA interaction analysis is a powerful tool to identify more complex gene expression patterns. This method is designed to discover putative differential trends in response to one factor as a function of a second factor. For example, ANOVA interactions analysis is able to test whether the three genotypes (factor 1) present the same trend or not, of the expression values of a given gene, under water stress conditions, when compared to controlled conditions (factor 2). It allowed us to identify 44 cDNA clones that exhibited different patterns of gene expression in the three investigated genotypes irrespective the organ tissues but as a function of the water stress conditions (Table 5). Microarray analysis reveals that the three genotypes regulate differentially the same set of genes. As given in table 5, there are contrasted expression patterns between Ichraq and Proleic 204 for 30 cDNA of the 44 showing significant treatment x genotype interaction. Similarly, 29 EST exhibited contrasted expression activities between Ichraq and Santiago II whereas only 10 clones were found to express opposed gene expression profile in Proleic 204, when compared to Santiago II. The results indicate that a large part of the response of genotypes to water stress is not ubiquitous and genetic background plays an important role in the determination of plant response to water stress. From these 44 cDNA clones, 11 clones are new water deficit regulated genes and may encode enzymes putatively involved in the metabolism of amino acid, carbohydrate, glycerolipid and in the biosynthesis of tocopherol as well as genes involved in transduction signalling. Interestingly, out of these 44 differentially expressed genes, 9 were found to have the same trend of expression profile under stressed condition in the three genotypes whatever the organ tissues. Although the transcription activities of these clones are down-regulated, the degree of repression is higher in the tolerant genotype (Ichraq) than the non-tolerant ones. This suggests that water deficit tolerance may be a consequence of low activity of these genes or the accumulation of these transcripts could overlap with suitable cellular response to water deficit.

Two cDNA clones thought to be involved in metabolism of tyrosine (DH0AB49ZG04RM1, EC: 4.1.2.-) and tryptophan (DH0AB59ZC02RM1, EC: 1.2.1.-) were induced in Ichraq under stressed conditions. However, the expression of these clones was found to be either down-regulated or unchanged in the two other genotypes. These results indicate clearly the importance of the biosynthesis of these amino acids in tolerant sunflower genotypes to adapt to water deficit stress. Two isoforms putatively encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC: 1.2.1.12), which is involved in gluconeogenesis pathway were observed with distinct expression profiles in the genotypes. One transcript (DH0AB68ZH04RM1) was repressed in the tolerant genotype Ichraq whereas the second (DH0ALL9ZD02ZZM1) was expressed in the tolerant genotype and repressed in Proleic 204 and Santiago II. The results, which monitor the presence of different isoforms of the same enzyme encoded by different genes with genotype-specific expression patterns, suggest divergent roles of these isoforms in water deficit adaptation.

Another clone involved in glycolysis (DH0AL23ZC07ZM1, EC: 4.1.2.13) as well as clones putatively encoding L-ascorbate peroxidase 1, succinyl-CoA ligase alpha-chain, which are involved in ascorbate and citrate cycle respectively, were also found to be induced in Ichraq genotype and repressed in Santiago II and Proleic 204. Our analysis also reveals that all cDNA clones putatively involved in tocopherol biosynthesis and having significant treatment x genotype interactions, were induced in Ichraq. The opposite expression patterns of these clones in the sensitive genotypes suggest that vitamin E accumulation may play a role in water deficit tolerance.

Comparing the expression behaviour of the transcripts encoding different signalling components between Ichraq, on one hand, and both Proleic 204 and Santiago II on the other hand, revealed that water deficit activates signalling pathways in the tolerant genotype that are different from those activated in non-tolerant genotypes (Table 5). For example, phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP), putative NPK1-related protein kinase 2, guanine nucleotide- binding protein, putative casein kinase II catalytic b unit and MYB family transcription factor were induced in Ichraq and repressed in Proleic 204 and Santiago II. In contrast, genes potentially encoding to hexokinase 1, cell division control protein kinase, laminin receptor-like protein, photoreceptor-interacting protein and auxin response transcription factor were found to be up-regulated in Proleic 204 and Santiago II and down-regulated in Ichraq.

The vegetative and reproductive tissues show different gene expression pattern in response to water-deficit stress

At a p -value cut off of 10^{-4} , we identified 82 cDNA clones showing significant organ \times treatment interaction (genes whose expression differentiate between seed and leaf tissues as a function of water stress treatment across all genotypes) (Table 6). Of these, 35 have not been reported previously as water-deficit regulated genes. Clones thought to be involved in biosynthesis of phenylalanine (DH0AB41ZF07RM1, EC:1.11.1.7), tryptophan (DH0AB44ZG08RM1, EC:1.11.1.6), glutathione (DH0AB51ZE06RM1, EC:1.1.1.42), glycine (DH0AB52ZD12RM1, EC:2.6.1.45), methionine (DH0AB61ZA10RM1, EC:2.5.1.6), glutamate (DH0AB003ZA05RM1, EC:2.6.1.2) and histidine (DH0AB003ZF02RM1, EC:1.14.13.-) exhibited immature seed-increased expression patterns under non-irrigated conditions compared with irrigated conditions. Similarly, 4 cDNA clones putatively implicated in the transfer of serine (DH0AB50ZC03RM1) isoleucine (DH0AB57ZG05RM1), threonine (DH0AB63ZH07RM1) and methionine (DH0AL3ZD09ZM1) during protein biosynthesis were found to be induced in the embryonic tissues. The high number of EST (16) that are involved in amino acid metabolism and showing statistically significant increase in the levels of mRNA accumulation in immature seeds suggests an important role of the nutrition level in the reproductive organs to water stress tolerance.

mRNA accumulation of 4 clones putatively encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC:1.2.1.12) and fructose-bisphosphate aldolase (EC:4.1.2.13) which involved in glycolysis pathway were induced in immature seeds by water stress treatment. In contrast, clones potentially encode enzymes involved in the metabolism of galactose (DH0AG16ZF10RM1, EC:3.2.1.26) and fructose (DH0AGB30ZD03RM1 and DH0AGB30ZD03RM1, EC:3.1.3.11) were up-regulated in leaves and unchanged in the seeds samples under water-deficit stress.

In energy metabolism, we found that the expression patterns of cDNA clones related to PSI and PSII were in opposite direction. With the exception of two clones putatively encoding PSII 43KDa protein and PSI P700 apoprotein, PSI-related clones were induced in seeds and repressed in leaves whereas PSII-related clones were induced in leaves and unchanged significantly in immature seeds. These expression patterns indicate that PSI and PSII were not co-ordinately regulated under water deficit conditions.

Of 38 clones that are potentially involved in signalling and transcription regulation and showed significant change in the level of genes expression in the two organs under water deficit conditions, 34 were induced in immature seeds. These clones potentially encode receptors, protein kinases, phosphatases, and a number of transcription factors belonging to different families. In leaves, only 4 clones encoding adenylate kinase, alpha chain of casein kinase II, adenylate kinase and isoform 2 of phosphatase X were showed enhanced expression patterns in stressed plants compared with the control treatment.

Experimental validation of some differentially expressed genes

To confirm microarray results, 19 clones of the differentially expressed genes showing either significant water stress x genotypes interaction (11 clones) or water stress x organs interaction (8 clones), were selected from different expression profiles and functional categories, and subjected to quantitative real-time RT-PCR analysis. The expression level of these genes was tested in all conditions using the same RNA samples that were used for microarray hybridization. As shown in Table 7 and 8, the results obtained from quantitative RT-PCR were in good agreement with those generated by microarray analysis. In all cases, genes that showed high expression level in microarray experiments showed high expression level in quantitative RT-PCR analysis.

Discussion

Although analysis of gene expression array has already provided insight into genes involved in responses to water stress in several plant species, no microarray analysis have been performed to compare the expression profiling in drought-adapted and drought-sensitive genotypes. This kind of experiment is important not only to determine similarities and dissimilarities in response between different genotypes but also to improve understanding of the mechanisms by which tolerant and non-tolerant water deficit genotypes respond to scarce water availability stress. Since, under natural conditions, multiple environmental effects occur simultaneously, the response of plants to a stress such as water deficit is usually a result of the interaction of the stress factor with other environmental factors. Analysis of genes expression under field conditions of tolerant genotype compared to non tolerant ones may be physiologically relevant and will give more elements on tolerance response to water-deficit stress.

To analyse the response of sunflower plants to water-deficit stress under field conditions, we developed and used a thematic cDNA microarray composed of genes carefully selected to cover the major primary metabolic pathways and transduction signalling. The expression profiles of these selected genes were studied in three sunflower genotypes having different levels of drought tolerance under control and drought treatments which have been determined precisely by two physiological measurements, leaf water potential and water deficit characterization. These genotypes were also selected for their different seed quality traits in terms of oil and fatty acids contents which provide an additional interesting agronomical value. Two-step ANOVA normalization and analysis models were used to identify the differentially expressed genes. In contrast to fold change-based microarrays analysis by which all experimental variations for all genes are considered to be equivalent and quantitative estimates of false positive or false negative are lacking, the analysis of variance method which takes into account all sources of variability affecting gene expression values, permits ranking of differentially expressed genes according to their significance threshold using *p*-value scores. Moreover, using ANOVA which is based on commonly understood statistical theories, changes in gene expression as small as 1.2-fold can be detected as highly significant (Jin *et al.* 2001). As we monitored, volcano plot representation of significance against magnitude of effects revealed that many clones may have low variance and be highly significant whereas clones tending to have a higher variance of the gene expression (more than 2-fold change) can be artefacts and consequently not significant.

Genes independently affected by both water stress and genetic background are related to cell detoxification and membrane fluidity

A three-way analysis of variance method allowed us to identify genes showing exclusive genotype main effect (genes expression differing between genotypes and not affected by water-deficit stress) as well as genes exhibiting water-deficit stress main effect (genes expression differing between stressed and control plants but not affected either by genotypes or by organ tissues). More interesting, genes showing significant main effects of both genotypes and water-deficit stress should play a direct role in the mediation of plant response to water stress. In this view, a gene encoding aldehyde dehydrogenase (ALDH) was found to have significant negative water-deficit stress main effect and to be expressed more highly in tolerant genotype (Ichraq) than the other two. Aldehydes which are intermediates involved in several primary metabolism pathways including carbohydrates, vitamins, steroids, amino acids and lipids (Kirch *et al.* 2004) can be generated in response to different environmental cues such as drought, salinity, low temperature and heat shock (Barclay & Mckersie 1994; Bartels 2001). Thus, the transcript accumulation of ALDH in tolerant genotype could detoxify drought-generated aldehydes and maintain aldehyde concentration at non toxic levels (Kirch *et al.* 2004). Different families of ALDH-encoding genes were found to be induced by various abiotic stress treatments in several plant species (Chen *et al.* 2002; Rabbani *et al.* 2003; Rishsky *et al.* 2004; Kirch *et al.* 2004) suggesting an usual role in stress response. Similarly, a gene encoding omega-6 fatty acid desaturase which have positive significant water-deficit stress effects was found to be down-regulated in Proleic 204 compared to the standard genotypes (Ichraq and Santiago II). Fatty acid desaturase is the primary route of production of polyunsaturated lipids within membrane lipids in both vegetative tissues and developing seeds by conversion of oleic acid into linoleic acid. Two different oleic desaturation systems are reported in sunflower. The first one is seed specific whereas the second one is consecutively expressed in whole plant tissues (Lagravère *et al.* 2004). In oleic genotypes, the seed-specific system is affected due to the oleic mutation. Therefore, the down-regulation of omega-6 fatty acid desaturase in Proleic 204 seems to affect the second system of fatty acid desaturase and it may be one of many ways by which Proleic 204 responds to water deficit. In contrast, up-regulation of this gene in standard genotypes under water stress conditions permit plants to synthesis more unsaturated fatty acid of the membrane lipids which may confer greater membrane fluidity allowing plants to maintain membrane function under lower water availability. These expression patterns are consistent with our biochemical characterisation that showed an increase of oleic acid content in seeds under water-deficit stress in standard genotypes (Roche *et al.* 2005). Genes encoding fatty acid desaturation were found to be

regulated by different types of abiotic stress including low temperatures (Kodama *et al.* 1995; Berberich *et al.* 1998; Provart *et al.* 2003) and drought (Ozturk *et al.* 2002; Rizhsky *et al.* 2004). These results provided direct evidence for the contribution of the unsaturation of fatty acids to biotic stress tolerance.

The difference between tolerant and non-tolerant genotypes under water stress seems to be associated with major qualitative changes in gene expression patterns rather than overall quantitative modifications of expression levels

Comparison of gene expression profiling of water deficit-regulated genes in the three genotypes revealed that only 9 EST had the same trend of expression which was repressed by water stress treatment. These clones encode peroxidase (EC:1.11.1.7), enolase (EC:4.2.1.11), protein kinases, protein phosphatase and two transcription factors belonging to WRKY and AP2 domain super families. These genes were previously shown to be associated with water stress in others plant species in other studies (Seki *et al.* 2002; Rabbani *et al.* 2003; Rizhsky, Liang & Mittler 2002; Rizhsky *et al.* 2004; Boominathan *et al.* 2004). In contrast to the expression patterns reported here, the expression of enolase, casein kinase and serine/threonine protein kinase was found to be positively regulated (Seki *et al.* 2001; Rizhsky, Liang & Mittler 2002; Watkinson *et al.* 2003; Rizhsky *et al.* 2004; Boominathan *et al.* 2004). This opposite observation may be due to the differences in experimental conditions (field experiments *versus* laboratory conditions), drought-induction conditions and plant species.

Contrary to the low number of genes showing similar expression in the three genotypes, we identified 25 genes with contrasted expression behavior in drought-tolerant and drought-sensitive genotypes. The majority of these genes (18) was positively regulated in Ichraq and distributed among different functional categories. Of these, there were three tocopherol biosynthesis-related genes. Enhanced tocopherol accumulation occurs in response to a variety of abiotic stresses including drought, high solar radiation and salt, (Munne-Bosch & Alegre 2002; Collakova & DellaPenna 2003). Since many of the proposed tocopherol functions in animals and plants are related to their antioxidant properties, the enhanced expression of tocopherol-related EST sequences indicating a potential role of tocopherol in the protection of plant tissues from oxidative damage by scavenging and quenching various reactive oxygen species induced as a sequence of water stress. Another example of cDNA clones putatively encoding antioxidant enzymes with increased

expression level of mRNA in tolerant genotype was two isoforms putatively encoding cytosolic L-ascorbate peroxidase (EC:1.11.1.11) (APX). APX is one of the most important antioxidant enzymes of plants that detoxifies hydrogen peroxide, generated in response to number of environmental stress (Kubo *et al.* 1995; Yoshimura 2000; Rizhsky, Liang & Mittler 2002; Kreps 2002; Ozturk *et al.* 2002; Panchuk, Volkov & Schoffl 2002). Thus, it seems possible that APX have a dual protecting function and regulate hydrogen peroxide-dependent stress signaling pathways.

The contribution of glycolysis to water stress tolerance has been reported (Bartels & Salamini 2001). The steady-state levels of transcripts potentially encoding key enzymes of glycolysis pathway were found to be up-regulated in response to water stress, e.g. the transcripts for fructose-bisphosphate aldolase (EC:4.1.2.13) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (EC:1.2.1.12) in tolerant genotype. Increased expression of glycolytic genes suggests that primary carbon metabolism is one of the pathways responding to changing in water availability. Different types of genes were found to be sugar-regulated at the transcriptional level. Among these, there are genes that are involved in stress responses in different plant species (Rolland, Moore & Sheen 2002). The induction of these transcripts points out a potential role of sugar pathway in water deficit response in drought-tolerant sunflower genotypes.

A number of kinase genes were positively regulated by water deficit in Ichraq. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC:4.1.1.49) was one of the genes with the largest increase (4.78-fold). Phosphoenolpyruvate carboxykinase is an enzyme present in many plant tissues and its function is not yet fully known. However, its strong transcription under water stress conditions in sunflower plants as well as in *Arabidopsis thaliana* as reported by Rizhsky *et al.* (2004) may provide a clue to a possible role in the regulation of water stress response. Casein kinase II catalytic b unit (EC:2.7.1.37) was also identified as a water deficit induced gene at high level (4.08-fold change) in Ichraq. One of the functions usually attributed to casein kinase is as a key regulator of gene transcription through the phosphorylation of transcription factors (Allende & Allende 1995; Lee, Lloyd & Roux 1999; Hidalgo *et al.* 2001). These observations raised the possibility that casein kinase II may be involved in the regulation of drought-regulated genes. In this context, our results are of interest as they represent the first demonstration for the transcriptional activation of a potential plant casein kinase II by a stress-induced water deficit. Further work is needed to elucidate the mechanism by which protein casein kinase II regulates the activity of drought regulated genes. Down-regulation of another cDNA clone encoding casein kinase in tolerant genotype suggests that at least two different pathways exist for the signalling of drought regulated by casein kinases.

Although down-regulation of cell division-regulated genes under low water availability is well documented in different plants species (Setter & Flannigan 2001; Yu & Setter 2003), but the process by which water stress affects cell division is not fully understood. Protein kinases have been suggested as cell division regulators during environmental stress. A cDNA clone with high sequence similarity to *Arabidopsis* gene encoding to cell division controls 2 protein (*cdc2* kinase), which plays key roles in regulating eukaryotic cell cycle (For review see Lees 1995; Doonan & Fobert 1997), has been identified in our microarray analysis as water deficit-repressed gene in Ichraq. Similar results were also reported in wheat leaves under water stress (Schuppler *et al.* 1998). Another down-regulated protein kinase-related gene in Ichraq genotype, was a cDNA clone putatively encoding hexokinase 1 (HXK1; EC:2.7.1.1). In addition to the central role that hexose phosphorylation plays in carbon metabolism, hexokinases appear to be involved in signal transduction processes linked to sugar sensing that control diverse genes and processes related to developmental stages and environmental conditions (Xiao, Sheen & Jang 2000). Similarly, Dai *et al.* (1999) reported that overexpression of *Arabidopsis* hexokinase-encoding gene *AtHXK1* in tomato has an effect on different aspects of plant growth including reduced chlorophyll content, reduced photosynthesis rates and accelerated senescence. Taken together, these results suggest that down-regulation of these genes in the tolerant genotype may help plants to avoid the harmful effects of dehydration on plant growth and development. However, in non-tolerant genotypes, increased expression level of these genes could route plants to increase growth rate associated with rapid progression of development and early flowering which is in agreement with our observation under field conditions and flowering date genotypes.

Transcription factors are one of the important regulatory genes that play a key role in the regulation of water deficit response. The microarray approach has enabled us to identify two transcription factors belonging to Myb family with opposite expression patterns under water stress condition. This finding indicates that members of the same family of transcription factors could control water deficit-regulated genes differentially. An interesting response to water deficit was also observed for a putative auxin-response transcription factor that was down-regulated more than 5-fold change in the tolerant genotype under stressed conditions compared with control treatment. It is well known that the plant hormone auxin plays key roles in regulating cell division, extension, and differentiation. Thus, this finding enforces the previous suggestion that decreased cell division rates and other aspect of plant growth are among the mechanisms developed by tolerant genotypes to adapt to low water availability. Taken together, the comparison of drought-regulated gene expression in the tolerant sunflower genotypes with non-tolerant ones provides suggestion that the

difference between tolerant and non-tolerant plants seems to be associated with expression patterns rather than quantitative expression.

Immature seeds develop specific responses to water stress compared to leaves

Comparison of the expression profiles in leaves and immature seeds in response to water deficit could be fruitful to improve our understanding of tissue-specific response to dehydration stress as well as the possible interaction between signalling components and major primary metabolic pathways. It is not surprising that the response of leaves and immature seeds to water stress is extremely different. Our microarray analysis allowed us to identify 39 genes with contradictory expression behaviour in leaves and immature seeds irrespective whatever the genotypes, reflecting the differences in cellular activities between vegetative tissues and reproductive organs in response to low water availability-stress. Accumulation of mRNA encoding enzymes involved in amino acids metabolism throughout the dehydration response has been reported in different plant species using microarray approach (Watkinson *et al.* 2003; Rabbani *et al.* 2003; Yu & Setter 2003; Rizhsky *et al.* 2004). Also, the total amount of amino acids was found to be increased more than 2.5 fold in whole barley plants subjected to drought compared with control treatment (Ozturk *et al.* 2002). Here, we found increased expression of a large number of EST related to amino acid metabolism in immature seeds under water deficit compared with leaves. Due to the high demand of carbon and nitrogen in developing seeds, the accumulation of amino acids may be an additional source for carbon and nitrogen under dehydration conditions (Lawlor 2002). Moreover, our biochemical analysis showed an increase of total protein content in seeds in response to water stress compared to control treatment (Roche *et al.* 2005).

The high steady-state levels of transcripts potentially encoding beta-fructosidase (EC:3.2.1.26) and fructose-1,6 bisphosphatase (EC:3.1.3.11) in leaf tissues compared with seeds could lead to the accumulation of sugars in vegetative tissues as an adapted response to dehydration. An increase in acid invertase was observed in leaves of maize plants subjected to drought coinciding with the rapid accumulation of glucose and fructose (Trouverie *et al.* 2003). Although different metabolic pathways could lead to synthesis and accumulation of sugars in plant tissues under water stress, the accumulation of sugars in vegetative tissues, rather than reproductive tissues, seems to be a common event in different plants species (Kameli & Losel 1996; Thomas & James 1999; Iannucci *et al.* 2002; Qifu *et al.* 2004). In contrast, in seeds, the induction of transcripts putatively encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, fructose-bisphosphate aldolase (EC: 4.1.2.13) and cytosolic triose phosphate isomerase (EC: 5.3.1.1) may enable the plant to increase its capacity to use ATP and NADPH in carbon assimilation under stressed conditions. It has been reported that a

reduction of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity is related to the decrease of capacity to use ATP and NADPH in carbon assimilation (Price *et al.* 1995).

It is well documented that the expression of genes encoding components of PSI and PSII are decreased by water-deficit stress (Cohen *et al.* 1999; Seki *et al.* 2002; Rizhsky, Liang & Mittler 2002; Watkinson *et al.* 2003; Oono *et al.* 2003). A new finding derived from our microarray results that cDNA clones related to PSI and PSII were found to be uncoordinated and exhibit opposite expression patterns in the two tissues. The non-coordinated activity of PSI and PSII under water deficit seems essential for sunflower plants to regulate their photosystem contents in response to change in environmental conditions. Similarly, in Cyanobacterium, mRNA levels of genes encoding subunits of PSI were rapidly decreased upon exposure to high solar radiation whereas responses of PSII transcripts were not coordinated (Muramatsu & Hihara, 2003). In seeds, clones related to PSI were found to be induced whereas clones related to PSII were unchanged or weakly repressed. It is well known that PSI can function alone in non-green developing seeds. The function of PSI in seeds may improve seed survival during water deficit by production of ATP required for many biological processes implicated in embryos development. Remarkably, the upregulation of genes coding for subunits of PSI in seeds was accompanied by the upregulation of three ESTs putatively encoding peroxidase. The high expression of peroxidase-encoding genes may serve to protect PSI complex by scavenging hydrogen peroxide, one of the major cause of damage to PSI (Tjus *et al.* 2001).

Since different regulatory pathways determine the expression of the whole set of water deficit-regulated genes, knowledge of regulatory genes and understanding their mode of action will improve our information concerning drought tolerance-mechanisms. Interestingly, one of the two protein kinases showing decreased expression in seeds under water deficit compared to leaves was an EST with strong homology to *Arabidopsis* adenylate kinase (At2g37250). *Arabidopsis* mutant deficient in adenylate kinase (At2g37250) was found to have elevated amino acid biosynthesis and enhanced growth rate (Carrari *et al.* 2005). These results which are in agreement with our finding that all amino acid related-EST showing significant treatment x organ interaction was upregulated in immature seeds, suggest a role for the adenylate kinase in the coordination of metabolism and growth under water stress conditions. Another interesting finding is that alpha and beta subunits of casein kinase II, a heterotetrameric enzyme comprised of two catalytic (α) and two regulatory (β) subunits (Pinna 1990; Allende & Allende 1995) and belonging to serine/threonine protein kinase

family, were found to express in opposite direction in both tissues. This data suggests distinct regulatory roles of α and β subunits in controlling drought signal transduction in sunflower plants

The only clone belonging to protein phosphatase category and exhibiting increased transcription activity in leaves comparing with seeds under low water-stress was a cDNA clone putatively encoding serine/threonine protein phosphatase X (PPX). Although the spatial and temporal pattern of expression of PPX in *Arabidopsis* were found to be similar in different developmental stages and organs (Pérez- Callejon *et al.* 1993; Pujol *et al.* 2000) suggesting a fundamental role in cell regulation, these results shed light into a possible role of PPX in drought tolerance in vegetative tissues.

The sensitivity of our microarray hybridization and analysis allowed us to identify 12 transcription factors affected by water stress and up-regulated in seeds. The finding that these transcription factors belong to different families and exhibit different levels of induction suggests that they may be involved in different cellular processes during water stress. From these seeds up-regulated transcription factors, there are two belonging to Apetala2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF) family. AP2/ERF proteins are the second largest transcription factor family in plants. Although recent molecular studies on gene regulation in different plant species under water deficit have identified a number of these proteins controlling the expression of dehydration-inducible genes (Shen *et al.* 2003; Sakuma *et al.* 2002; Kizis & Pagès 2002; Xue & Loveridge 2004), the biological functions of the majority of these proteins are still unknown. Members of AP2/ERF family were also induced in barley embryos during seed maturation under drought (Xue & Loveridge 2004) and in maize during embryogenesis (Kizis & Pagès 2002). Additionally, three putative basic region/leucine zipper motif (bZIP) transcription factors were up-regulated in seeds. In plants, (bZIP) transcription factors regulate diverse biological processes including pathogen defence, solar radiation and stress signalling, flower development and seed maturation (Jakoby *et al.* 2002). It is likely that the activity of these transcription factors enables plants to control stress signalling during seed development under water deficit. Moreover, three other transcription factors that have not been described previously as water deficit-regulated genes were found to be induced in seeds. These genes include transcription initiation factor IIF beta subunit, transcriptional activation factor TAFII32 and TFIIH basal transcription factor complex helicase XPB subunit. The up-regulation of these putative transcription factors involved in the initiation of transcription process could allow plants to accumulate efficient transcripts of target genes even in the presence of potential transcription inhibitors induced by water-deficit stress.

The gene expression patterns derived from this study provide an initial characterization of major metabolic pathways and signalling transduction networks during sunflower response to soil water deficit stress under field conditions. Detailed analysis of the differentially expressed genes could be of great interest to improve sunflower yield under drought conditions.

References

- Allende J.E. & Allende C.C. (1995) Protein kinase CK2: an enzyme with multiple substrates and puzzling regulation. *FASEB Journal* **9**, 313-323.
- Barclay K.D. & Mckersie B.D. (1994) Peroxidation reactions in plant membranes-effects of free fatty acids. *Lipids* **29**, 877-882.
- Bartels D. & Salamini F. (2001) Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* **127**, 1346-1353.
- Bartels D. (2001) Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance? *Trends in Plant Science* **6**, 284-286.
- Ben C., Hewezi T., Jardinaud M.F., Bena F., Ladouce N., Moretti S., Tamborindeguy C., Liboz T., Petitprez M. & Gentzbittel L. (2005) Comparative analysis of early embryonic sunflower cDNA libraries. *Plant Molecular Biology* **57**, 255-270.
- Berberich T., Harada M., Sugawara K., Kodama H., Iba K. & Kusano T. (1998) Two maize genes encoding omega-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Molecular Biology* **36**, 297-306.
- Boominathan P., Shukla R., Kumar A., Manna D., Negi D., Verma PK. & Chattopadhyay D. (2004) Long Term Transcript Accumulation during the Development of Dehydration Adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology* **135**, 1608-1620.
- Bray E.A. (2002) Classification of genes differentially expressed during water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data. *Annals of Botany* **89**, 803-811.
- Bray E.A. (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis Thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **55**, 407, 2331-2341.
- Carrari F., Coll-Garcia D., Schauer N., Lytovchenko A., Palacios-Rojas N., Balbo I., Rosso M. & Fernie A.R. (2005) Deficiency of a plastidial adenylate kinase in *Arabidopsis* results in elevated photosynthetic amino acid biosynthesis and enhanced growth. *Plant Physiology* **137**, 70-82.

- Cellier F., Conéjéro G., Breitler J.C. & Casse F. (1998) Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. *Plant Physiology* **116**, 319-328.
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.-S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps, J.A. Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X. & Zhu T. (2002) Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* **14**, 559–574.
- Cohen A., Moses M.S., Plant A.L. & Bray E.A. (1999) Multiple mechanisms control the expression of abscisic acid (ABA)-requiring genes in tomato plants exposed to soil water deficit. *Plant, Cell and Environment* **22**, 989-998.
- Collakova E. & DellaPenna D. (2003) The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress. *Plant Physiology* **133**, 930-940.
- Dai N., Schaffer A., Petreikov M., Shahak Y., Giller Y., Ratner K., Levine A. & Granot D. (1999) Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* **11**, 1253-1266.
- Doonan J. & Fobert P. (1997) Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 824-830.
- Hall A.J., Whitfield D.M., & Connor D.J. (1990) Contribution of pre-anthesis assimilates to grain-filling in irrigated and water-stressed sunflower crops II. Estimates from a carbon budget. *Field Crops Research* **24**, 273-294.
- Hidalgo P., Garretón V., Berríos C.G., Ojeda H., Jordana X. & Holuigue L. (2001) A nuclear casein kinase 2 activity is involved in early events of transcriptional activation induced by salicylic acid in tobacco. *Plant Physiology* **125**, 396-405.
- Iannucci A., Russo M., Arena L., Fonzo N & Martiniello P. (2002) Water deficit effects on osmotic adjustment and solute accumulation in leaves of annual clovers. *European Journal of Agronomy* **16**, 111-122.
- Jakoby M., Weisshaar B., Droge-Laser W., Vicente-Carbajosa J., Tiedemann J., Kroj T. & Parcy F. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* **7**, 106-111.

- Jin W., Riley R.M., Wolfinger R.D., White K.P., Passador-Gurgel G. & Gibson G. (2001) The contribution of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics* **29**, 389-395.
- Kameli, A. & Losel D.M. (1996) Growth and sugar accumulation in durum wheat plants under water stress. *New Phytologist* **132**, 57-62.
- Kawaguchi R., Girke T., Bray E.A., Bailey-Serres J.N. (2004) Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **38**, 823-839.
- Kerr M.K., Martin M. & Churchill G.A. (2000) Analysis of variance for gene expression microarray data. *Journal of Computational Biology* **7**, 819–837.
- Kirch H.H., Bartels D., Wei Y., Schnable P. & Wood A., (2004) The aldehyde dehydrogenase gene superfamily of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* **9**, 371-377.
- Kizis, D. & Pagès, M. (2002) Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway. *The Plant Journal* **30**, 679-689.
- Kodama H., Horiguchi G., Nishiuchi T., Nishimura M. & Iba K. (1995) Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Physiology* **107**, 1177-1185.
- Kreps J.A., Wu Y., Chang H.-S., Zhu T., Wang X. & Harper J.F. (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* **130**, 2129-2141.
- Kubo A., Saji H., Tanaka K. & Kondo N. (1995) Expression of *Arabidopsis* cytosolic ascorbate peroxidase gene in response to ozone or sulfur dioxide. *Plant Molecular Biology* **29**, 479-489.
- Lagravère T., Kleiber D., Surel O., Calmon A., Bervillé A. & Dayde J. (2004) Comparison of Fatty Acid Metabolism of Two Oleic and One Conventional Sunflower Hybrids: A New Hypothesis. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**, 223-229
- Lawlor D.W. (2002) Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: stomate vs. metabolism and role of ATP. *Annals of Botany* **89**, 871-885.

- Lee Y., Lloyd A.M. & Roux S.J. (1999) Antisense expression of the CK2 α -subunit gene in Arabidopsis: effects on light-regulated gene expression and plant growth. *Plant Physiology* **119**, 989-1000.
- Lees E. (1995) Cyclin dependent kinase regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 773-780.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. **25**, 402-408.
- Munne-Bosch S. & Alegre L. (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**, 31-57.
- Muramatsu M. & Hihara Y. (2003) Transcriptional regulation of genes encoding subunits of photosystem I during acclimation to high-light conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Planta* **216**, 446-453.
- Oono Y., Seki M., Nanjo T., Narusaka M., Fujita M., Satoh R., Satou M., Sakurai T., Ishida J., Akiyama K., Iida K., Maruyama K., Satoh S., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2003) Monitoring expression profiles of Arabidopsis gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **34**, 868-887.
- Ozturk Z.N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C.B., Galbraith D.W., Gozukirmizi N., Tuberosa R. & Bohnert H.J. (2002) Monitoring large scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* **48**, 551-573.
- Panchuk I.I., Volkov R.A. & Schoffl F. (2002) Heat stress and heat shock transcription factor dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 838-853.
- Pérez-Callejon E., Casamayor A., Pujol G., Clua E., Ferrer A. & Ario J. (1993) Identification and molecular cloning of two homologues of protein phosphatase X from Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology* **23**, 1177-1185.
- Picq G. (1989) Résultats de l'observatoire du tournesol. Ed. CETIOM, 105-124.
- Pinna L.A. (1990) Casein kinase 2: an "eminence grise" in cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1054**, 267-284.
- Price G.D., Evans J.R., von Caemmerer S., Yu J.-W. & Badger M.R. (1995) Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂

assimilation via a reduction in ribulose biphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta* **195**, 369-378.

Provarat, N.J., Gil P., Chen W., Han B., Chang H.-S., Wang X. & Zhu T. (2003) Gene expression phenotypes of Arabidopsis associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiology* **132**, 893-906.

Pujol G., Baskin T.I., Casamayor A., Cortadellas N., Ferrer A. & Ario J. (2000) The Arabidopsis thaliana PPX/PP4 phosphatases: molecular cloning and structural organization of the genes and immunolocalization of the proteins to plastids. *Plant Molecular Biology* **44**, 499-511.

Qifu M., Turner D.W., Levy D., & Cowling W. A. (2004) Solute accumulation and osmotic adjustment in leaves of Brassica oilseeds in response to soil water deficit. *Australian Journal of Agricultural Research* **55**, 939-945.

Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA get-blot analyses. *Plant Physiology* **133**, 1755-1767.

Rizhsky L., Liang H. & Mittler R. (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* **130**, 1143-1151.

Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. & Mittler R. (2004) When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**, 1683-1696.

Roche J., Bouniols A., Mouloungui Z., Barranco T. & Cerny M. (2005) Biodisponibility of sunflower seed oil components under environmental crop conditions. *European Journal of Lipid Science Technology*, In press.

Roche J., Essahat A., Bouniols A., El Asri M., Mouloungui Z., Mondières M. & Alghoum M. (2004) Diversified composition of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds within cultural practices and genotypes (hybrids and populations). *Helia* **27**, 73-98.

Rolland F., Moore B., & Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* **14**, S185-S205.

Sakuma Y., Liu Q., Dubouzet J.G., Abe H., Shinozaki K. & Yamaguchi-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.

Schneiter A.A. & Miller J.F. (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Science* **21**, 901-903.

Scholander P.F., Hammel H.T., Bradstreet E.D. & Hemingsen, E.A. (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* **148**, 339-346.

Schuppler U., He P.H., John P.C.L. & Munns R. (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* **117**, 667-678.

Seki M., Kameiy A., Yamaguchi-Shinozakiz K. & Shinozaki K. (2003) Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 194-199.

Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y. & Shinozaki K. (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**, 61-72.

Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Akiyama K., Taji T., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Kawai J., Hayashizaki Y. & Shinozaki K. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **31**, 279-292.

Setter T.L. & Flannigan B.A. (2001) Water deficit inhibits cell division and expression of transcripts involved in cell proliferation and endoreduplication in maize endosperm. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1401-1408.

Shen Y.-G., Zhang W.-K., He S.-J., Zhang J.-S., Liu Q. & Chen S.-Y. (2003) An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 923-930.

Tamborindéguy C., Ben C., Liboz T. & Gentzbittel L. (2004) Sequence evaluation of four specific cDNA libraries for developmental genomics of sunflower. *Molecular Genetics and Genomics* **271**, 367-375.

Thomas, H. & James, A. R. (1999) Partitioning of sugars in *Lolium perenne* (perennial ryegrass) during drought and on rewatering. *New Phytologist* **142**, 295-305.

- Tjus S.E., Scheller H.V., Andersson B. & Moller B.L. (2001) Active oxygen produced during selective excitation of photosystem I is damaging not only to photosystem I, but also to photosystem II. *Plant Physiology* **125**, 2007-2015.
- Trouverie J., Thévenot C., Rocher J.-P., Sotta B. & Prioul J.-L. (2003) The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *Journal of Experimental Botany* **54**, 2177–2186.
- Turner N.C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* **58**, 339-366.
- Verwoerd T.C, Dekker B.M.M. & Hoekema A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Research* **17**, 2362-2362.
- Wang W., Vinocur B. & Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1-14.
- Watkinson J., Allan I., Sioson A., Vasquez-Robinet C., Shukla M., Kumar D., Ellis M., Heath L.S., Ramakrishnan N., Chevone B., Watson L.T., van Zyl L., Egertsdotter U., Sederoff R.R. & Grene R. (2003) Photosynthetic Acclimation Is Reflected in Specific Patterns of Gene Expression in Drought-Stressed Loblolly Pine. *Plant Physiology* **133**, 1702-1716.
- Wolfinger R. D., Gibson G., Wolfinger E.D., Bennet L., Hamade H., Bushel P., Afshira C. & Paules R.S. (2001) Assessing gene significance from cDNA microarray expression data via mixed models. *Journal of Computational Biology* **8**, 625-637.
- Xiao W., Sheen J. & Jang J.C. (2000) The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. *Plant Molecular Biology* **44**, 451-461.
- Xue G.P. & Loveridge C.W. (2004) HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably to a CT-rich element. *Plant Journal* **37**, 326-339.
- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T. & Shigeoka S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiology* **123**, 223-233.
- Yu L. & Setter T.L. (2003) Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit. *Plant Physiology* **131**, 568-582.
- Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **53**, 247-27.

Table 1: Climate indicators during sunflower crop development

Climate indicators	Physiological phases			
	S-VE	VE-R1	R1-R5.1	R5.1-R9
Mean temperature (°C)	17.1	21.1	24.1	23.3
Total solar radiation (MJ/m ²)	20.3	22.7	26.5	22.8
Rainfall (mm)	13.6	10.1	0.6	10.0
PET (mm)	41.4	50.3	62.8	55.1

Emergence=VE, bud visible=R1, beginning of flowering=R5.1, physiological maturity=R9, according to Schneiter and Miller, 1981

Table 2: Water stress indicators (leaf water potential and soil water deficit) within phenological stages of crop growth

Genotypes	Phenological stages	Water stress indicators			
		LWP		WD	
		R5.1	R6	R5.1	R6
Santiago II	Watered	-1.47±0.17	-1.74±0.07	-96	-12
	Not watered	-1.47±0.17	-2.38±0.07	-96	-52
Ichraq	Watered	-1.71±0.22	-1.68±0.06	-90	-23
	Not watered	-1.71±0.22	-2.74±0.70	-90	-103
Proleic 204	Watered	-1.73±0.05	-1.66±0.20	-90	-23
	Not watered	-1.73±0.05	-2.66±0.04	-90	-69

LWP: Leaf Water Potential in MPa, WD: Water Deficit in mm. R5.1: flowering onset stage, R6: ripening onset stage

Table 3 Genes showing significant genotypes main effects

Contrast	Sequence name	p value	Putative orthologue	Annotation	Functional Category	Fold change
Ichraq vs Santiago II	DH0AQA14ZC04RM1	5.60E-05	At1g54100	aldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.-]	Amino acids metabolism	1.76
	DH0AGB12ZD12RM1	3.84E-05	At1g20260	vacuolar H+ -ATPase subunitB. putative [EC:3.6.3.14]	Energy metabolism	-1.93
	DH0ALL10ZA09ZZM1	9.45E-05	At1g09030	CCAAT-binding transcription factor subunit A	Transcription factors	1.48
Proleic 204 vs Santiago II and Ichraq	DH0AMM3ZD01ZZM1	7.49E-07	At5g35360	acetyl-CoA carboxylase. biotin carboxylase subunit (CAC2) [EC:6.3.4.14]	Fatty acids biosynthesis	-1.68
	DH0ALL12ZG03ZZM1	2.56E-05	At3g12120	omega-6 fatty acid desaturase: endoplasmic reticulum (FAD2)/ delta-12 desturase [EC:1.14.99.-]	Fatty acids desaturation	-2.14
	DH0AF22ZC10ZM1	4.93E-07	At1g13440	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	Amino acids metabolism	-1.78
	DH0AMM24ZC02ZZM1	5.32E-06	At4g35090	catalase 2 [EC:1.11.1.6]	Amino acids metabolism	-1.73
	DH0AMM28ZF01ZZM1	3.72E-07	At1g65930	isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42]	Amino acids metabolism	-2.13
	HaCotR004B01	2.51E-05	At5g19550	aspartate aminotransferase. cytoplasmic isozyme 1 / transaminase A (ASP2) [EC:2.6.1.1]	Amino acids metabolism	-1.78
	HaCot005E03	6.31E-05	At1g30120	pyruvate dehydrogenase E1 component beta subunit [EC:1.2.4.1]	Amino acids metabolism	-1.81
	DH0ALL29ZE12ZZM1	4.56E-05	At1g59900	e1 alpha subunit of the pyruvate dehydrogenase complex (PDC) [EC:1.2.4.1]	Aminoacids metabolism	-1.49
	DH0AMM15ZB11ZZM1	1.49E-05	At5g01320	pyruvate decarboxylase [EC4.1.1.1]	Carbohydrate metabolism	-1.69
	HO0001C15	6.23E-05	At1g64190	6-phosphogluconate dehydrogenase family protein [EC1.1.1.44]	Carbohydrate metabolism	-1.71
DH0AB48ZD09RM1	4.35E-05	At1g32060	phosphoribulokinase (PRK) [EC:2.7.1.19]	Energy metabolism	1.76	
DH0AC36ZB03RM1	3.94E-08	At2g34650	protein kinase PINOID (PID)	Protein kinase	1.88	

Fold change was computed as 10 power to the difference between normalized expression values. Functional category based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database

Table 4 Genes showing significant water-deficit stress main effect

Sequence name	p value	Putative orthologue	Annotation	Functional Category	Fold change
DH0AGB16ZD02RM1	3.89E-05	At3g12120	omega-6 fatty acid desaturase: endoplasmic reticulum (FAD2)/ delta-12 desturase [EC:1.14.99.-]	Fatty acids desaturation	1.60
HO0002G11F	2.05E-05	At2g29450	glutathione S-transferase [EC:2.5.1.18]	Amino acids metabolism	1.60
DH0AQA14ZC04RM1	1.05E-04	At1g54100	aldehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.-]	Amino acids metabolism	-1.59
DH0AGB3ZF04RM1	6.66E-05	NP_051089.1	cytochrome b6/f complex subunit IV	Energy metabolism	1.61

The Fold-change values represent changes of mRNA abundance in stressed plants vs. control and computed as 10 power to the difference between normalized expression values. Functional category based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database

Table 5 Genes showing significant genotype x water-deficit stress interaction

Sequence name	P value	Putative orthologue	Annotation	Functional Category	Ichraq	Fold change	
						Proleic 204	Santiago II
DH0ALL29ZF03ZZM1	1.29E-05	U02949	cytosolic triose phosphate isomerase [EC:5.3.1.1]	Glycerolipids metabolism	-3.19	1.01	-1.46
DH0AFF27ZF01ZZM1	4.30E-05	At1G23800	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein[EC:1.2.1.3]	Fatty acids biosynthesis and metabolism	1.82	-1.74	-1.47
DH0AB006ZF09FM1	5.96E-05	AF188066	isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl pyrophosphate isomerase (ipiAt1) [EC:5.3.3.2]	Tocopherol biosynthesis	2.01	-1.18	-1.17
DH0ALL25ZA03ZZM1	3.37E-05	At1g64970	gamma-tocopherol methyltransferase [EC:2.1.1.95]	Tocopherol biosynthesis	1.90	-1.38	-1.12
DH0AMM7ZF07ZZM1	1.29E-06	U47324	isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase (IPPI) [EC:5.3.3.2]	Tocopherol biosynthesis	2.65	-1.34	-1.27
DH0AB49ZG07RM1	7.49E-06	At3g43800	glutathione S-transferase [EC:2.6.1.2]	Amino acids metabolism	1.91	1.37	-1.88
DH0AB49ZG04RM1	8.60E-06	At3g04520	threonine aldolase [EC:4.1.2.-]	Amino acids metabolism	2.19	1.00	-1.59
DH0AB49ZH03RM1	1.27E-07	At1g05240	peroxidase [EC:1.11.1.7]	Amino acids metabolism	-4.71	-1.12	-1.58
DH0AB59ZC02RM1	5.90E-05	At1g09940	glutamyl-tRNA reductase 2 / GluTR (HEMA2). [EC:1.2.1.-]	Amino acids metabolism	2.15	1.01	-1.30
DH0AL15ZD01ZM1	5.47E-05	At2g36530	enolase [EC:4.2.1.11]	Amino acids metabolism	-3.08	-1.02	-1.45
DH0AMM23ZB09ZZM1	1.21E-04	At4g33680	aminotransferase class I and II [EC:2.6.1.1]	Amino acids metabolism	1.96	-1.29	-1.86
DH0AMM32ZC09ZZM1	2.23E-05	At4g31990	aspartate aminotransferase. chloroplast / transaminase A (ASP5) (AAT1) [EC:2.6.1.1]	Amino acids metabolism	2.28	-1.25	-1.27
DH0AL23ZC07ZM1	2.82E-05	At2g01140	fructose-bisphosphate aldolase [EC:4.1.2.13]	Carbohydrate metabolism	2.22	-1.85	-1.20
DH0ALL17ZH10ZZM1	1.29E-05	At1g07890	L-ascorbate peroxidase 1. cytosolic (APX1) [EC:1.11.1.11]	Carbohydrate metabolism	1.90	-1.19	-1.69
DH0ALL30ZA06ZZM1	1.92E-05	At1g07890	L-ascorbate peroxidase 1. cytosolic (APX1) [EC:1.11.1.11]	Carbohydrate metabolism	2.29	-1.46	-1.31
DH0ALL30ZD02ZZM1	3.66E-05	At5g08300	succinyl-CoA ligase (GDP-forming) alpha-chain. mitochondrial [EC:6.2.1.4]	Carbohydrate metabolism	2.77	-1.24	-1.14
QHB16G23	4.12E-06	At5g57220	cytochrome P450 [EC:1.4.-.-]	Carbohydrate metabolism	-4.23	1.09	-1.39
DH0ALL9ZD02ZZM1	2.49E-05	At1g13440	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [EC:1.2.1.12]	Carbohydrate metabolism	2.00	-1.38	-1.10
DH0AB68ZH04RM1	6.01E-05	At1g42970	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B [EC:1.2.1.12]	Carbohydrate metabolism	-3.65	1.07	1.16

Table 5 continued

Sequence name	P value	Putative orthologue	Annotation	Functional Category	Ichraq	Fold change	
						Proleic 204	Santiago II
DH0AMM12ZA02ZZM1	1.93E-05	At1g64200	H ⁺ - transporting ATPase protein. putative [EC:3.6.3.14]	Energy metabolism	2.74	-1.88	-1.47
DH0AGB22ZH04RM1	4.52E-05	NP_051039.1	psbA; PSII 32 KDa protein	Energy metabolism	1.17	-1.38	2.42
HACotR016B05	7.67E-06	At4g37870	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP) [EC:4.1.1.49]	Protein kinase	4.78	-1.04	-1.54
HaDpIR101G03	2.65E-05	At3g58640	protein kinase family protein	Protein kinase	1.99	-1.58	-1.05
HaDpIR204G02	4.13E-08	At3g25960	putative pyruvate kinase [EC:2.7.1.40]	Protein kinase	-3.31	1.05	-1.00
HaDpIR108D06	3.13E-06	At3g58640	protein kinase family protein	Protein kinase	-3.41	-1.18	-1.11
HM0005A12	9.93E-05	At4g37840	hexokinase 1 (HXK1) [EC:2.7.1.1]	Protein kinase	-1.49	1.06	2.25
HaDpIR201D09	4.19E-05	At1g04440	casein kinase [EC:2.7.1.-]	Protein kinase	-2.85	-1.15	-1.21
DH0AB60ZE01RM1	2.49E-05	At1g12110	putative NPK1-related protein kinase 2	Protein kinase	1.65	1.03	-1.78
DH0AL5ZB09ZM1	6.77E-07	At3g18130	guanine nucleotide- binding protein/activated protein kinase C receptor RACK1	Protein kinase	2.57	-1.26	-1.32
DH0AL3ZB03ZM1	2.23E-09	At2g23070	putative casein kinase II catalytic b unit [EC:2.7.1.37]	Protein kinase	4.08	-1.13	-1.15
DH0ALL12ZB01ZZM1	8.29E-05	At2g44680	casein kinase II beta chain. putative	Protein kinase	-3.47	1.46	-1.06
DH0ALL28ZG05ZZM1	2.60E-05	At1g20930	cell division control protein. putative. cdc2 kinase [EC:2.7.1.-]	Protein kinase	-3.36	1.64	1.13
DH0ANA13ZB05FM1	1.52E-06	At1g10940	serine/threonine protein kinase. putative [EC:2.7.1.-]	Protein kinase	-3.75	-1.05	-1.08
DH0AQA11ZF09RM1	9.49E-10	At4g31170	protein kinase family	Protein kinase	-4.31	-1.14	-1.14
DH0ANA3ZB06FM1	8.01E-06	At1g03960	protein phosphatase 2A	Protein phosphatase	-3.59	-1.08	-1.24
DH0AB44ZC07RM1	4.62E-05	At1g72370	laminin receptor-like protein	Receptor	-3.17	1.52	1.46
DH0AFF22ZF08ZZM1	1.06E-04	At5g47800	photoreceptor-interacting protein- related	Receptor	-4.78	1.25	1.38
DH0AQA10ZH03RM1	6.08E-06	At2g18770	signal recognition particle receptor beta subunit	Receptor	-1.98	-1.10	1.31
HaDpIR107A05	1.08E-07	At4g31800	WRKY family transcription factor	Transcription factor	-3.35	-1.00	-1.15
HM0008C02	2.75E-06	At3g52270	transcription initiation factor II F. beta subunit. putative	Transcription factor	-3.15	1.01	-1.30
DH0AB001ZA12RM1	3.05E-05	At1g68550	AP2 domain transcription factor	Transcription factor	-3.46	-1.44	-1.34
DH0AC002ZF08FM1	6.81E-05	At2g46830	MYB-related transcription factor	Transcription factor	-2.17	1.13	1.06
DH0AC028ZC03FM1	5.07E-06	At1g74840	MYB family transcription factor	Transcription factor	2.26	-1.20	-1.09
DH0AQA20ZH10RM1	1.98E-06	At2g28350	auxin response transcription factor	Transcription factor	-5.12	1.01	1.21

The Fold-change values represent changes of mRNA abundance in stressed plants vs. control and computed as 10 power to the difference between normalized expression values for each genotype. Functional category based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database.

Table 6 Genes showing significant water-deficit stress x organ interaction

Sequence name	P value	Putative orthologue	Annotation	Functional Category	Fold change	
					Seeds	Leaves
DH0ALL29ZF11ZZM1	2.55E-06	At3g11950	UbiA prenyltransferase family protein	Tocopherol biosynthesis	1.54	-2.84
DH0AB41ZF07RM1	1.82E-05	At5g40150	peroxidase ATP26a [EC:1.11.1.7]	Amino acids metabolism	2.06	-2.01
DH0AB44ZG08RM1	5.60E-06	At4g35090	catalase 2 [EC:1.11.1.6]	Amino acids metabolism	3.10	-6.79
DH0AB51ZE06RM1	4.62E-06	At5g14590	putative / NADP+ isocitrate dehydrogenase [EC:1.1.1.42]	Amino acids metabolism	1.70	-3.77
DH0AB49ZH03RM1	1.79E-10	At1g05240	peroxidase [EC:1.11.1.7]	Amino acids metabolism	1.05	-4.31
DH0AB50ZC03RM1	2.50E-05	At5g27470	seryl-tRNA synthetase / serine--tRNA ligase [EC:6.1.1.11]	Amino acids metabolism	1.94	-2.71
DH0AB57ZG05RM1	7.08E-08	At5g49030	tRNA synthetase class I (I. L. M and V) [EC:6.1.1.5]	Amino acids metabolism	2.01	-2.06
DH0AB52ZD12RM1	5.04E-06	At2g13360	serine-glyoxylate aminotransferase [EC:2.6.1.45]	Amino acids metabolism	2.05	-2.49
DH0AB61ZA10RM1	9.97E-05	At1g02500	S-adenosylmethionine synthetase 1 (SAM1) [EC:2.5.1.6]	Amino acids metabolism	1.96	-3.05
DH0AB63ZH07RM1	7.11E-08	At5g26830	threonyl-tRNA synthetase / threonine--tRNA ligase (THRRS) [EC:6.1.1.3]	Amino acids metabolism	1.86	-2.68
DH0AF23ZB01ZM1	7.50E-05	At1g68850	peroxidase. putative. identical to peroxidase ATP23a [EC:1.11.1.7]	Amino acids metabolism	2.54	-2.43
DH0AL3ZD09ZM1	1.86E-05	At4g13780	methionine--tRNA ligase [EC:6.1.1.10]	Amino acids metabolism	1.12	-2.63
DH0AL5ZH07ZM1	1.25E-05	At5g11520	aspartate aminotransferase. chloroplast / transaminase A (ASP3) [EC:2.6.1.1]	Amino acids metabolism	2.05	-3.58
DH0ALL28ZD08ZZM1	1.46E-06	At5g04590	sulfite reductase / ferredoxin (SIR) [EC:1.8.7.1]	Amino acids metabolism	2.29	-3.52
DH0AB003ZA05RM1	8.00E-06	At1g70580	glutamate:glyoxylate aminotransferase 2 (GGT2) [EC:2.6.1.2]	Amino acids metabolism	2.04	-2.95
DH0AB003ZF02RM1	4.30E-07	At3g24200	monooxygenase family protein [EC:1.14.13.-]	Amino acids metabolism	2.05	-3.19
DH0AB44ZC02RM1	6.11E-08	At4g38690	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase [EC:3.1.4.3]	Amino acid metabolism	2.31	-2.97
DH0AL15ZD01ZM1	5.08E-10	At2g36530	enolase [EC:4.2.1.11]	Carbohydrate metabolism	1.29	-3.54
DH0AB68ZH04RM1	2.43E-08	At1g42970	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B [EC:1.2.1.12]	Carbohydrate metabolism	1.76	-3.62
DH0AB61ZC08RM1	4.60E-05	At1g42970	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B [EC:1.2.1.12]	Carbohydrate metabolism	1.87	-3.46
DH0AB45ZG05RM1	2.03E-06	At2g21330	fructose-bisphosphate aldolase [EC:4.1.2.13]	Carbohydrate metabolism	2.47	-4.32
DH0AB58ZE11RM1	6.16E-05	At2g21330	fructose-bisphosphate aldolase [EC:4.1.2.13]	Carbohydrate metabolism	1.95	-2.85
QHB16G23	3.27E-07	At5g57220	cytochrome P450 [EC:1.4.-.-]	Carbohydrate metabolism	1.12	-3.44
DH0AG16ZF10RM1	2.33E-05	At1g62660	beta-fructosidase (BFRUCT3) / beta-fructofuranosidase / invertase. vacuolar [EC:3.2.1.26]	Carbohydrate metabolism	-1.09	2.21
DH0AGB30ZD03RM1	5.54E-06	At3g54050	fructose-1.6-bisphosphatase [EC:3.1.3.11]	Carbohydrate metabolism	1.00	2.74
DH0AGB9ZC11RM1	7.41E-05	At3g54050	fructose-1.6-bisphosphatase [EC:3.1.3.11]	Carbohydrate metabolism	-1.01	2.17
DH0ALL29ZF03ZZM1	9.43E-12	At3g55440	cytosolic triose phosphate isomerase [EC: 5.3.1.1]	Carbohydrate metabolism	1.41	-3.92

Table 6 continued

Sequence name	P value	Putative orthologue	Annotation	Functional Category	Fold change	
					Seeds	Leaves
DH0AB007ZG11FM1	3.73E-06	At3g55800	sedoheptulose-1.7-bisphosphatase [EC:3.1.3.37]	Energy metabolism	1.76	-2.94
DH0AB43ZD11RM1	1.60E-05	At1g30380	photosystem I reaction center subunit psaK	Energy metabolism	1.65	-1.97
DH0AB47ZE06RM1	2.69E-08	At3g55800	sedoheptulose- bisphosphataseprecursor [EC:3.1.3.37]	Energy metabolism	2.35	-4.11
DH0AB51ZH06RM1	3.57E-08	At1g52230	photosystem I reaction center subunit VI. chloroplast. putative / PSI-H. putative (PSAH2)	Energy metabolism	1.92	-3.38
DH0AB52ZG04RM1	5.09E-06	At1g03130	photosystem I reaction center subunit II	Energy metabolism	2.67	-5.04
DH0AB53ZG10RM1	5.72E-06	NP_051055.1	psbC;PSII 43KDa protein	Energy metabolism	2.40	-3.93
DH0AB54ZC06RM1	3.88E-06	At4g12800	photosystem I reaction center subunit XI	Energy metabolism	1.96	-3.57
DH0AB59ZE07RM1	1.39E-08	At5g14740	carbonic anhydrase 2 / carbonate dehydratase 2 (CA2) (CA18) [EC:4.2.1.1]	Energy metabolism	1.39	-3.42
DH0AC008ZF07FM1	1.32E-07	NP_051065.1	ATPase epsilon subunit [EC:3.6.3.14]	Energy metabolism	-1.45	3.29
DH0AMM4ZC12ZZM1	5.27E-08	NP_051045.1	ATPase I subunit [EC:3.6.3.14]	Energy metabolism	1.21	-4.45
HaCotR004A11	4.81E-09	At2g07671	type H+- transporting ATPase subunit c [EC:3.6.3.14]	Energy metabolism	-1.22	3.10
HO0011K21	2.98E-05	At2g07671	type H+- transporting ATPase subunit c [EC:3.6.3.14]	Energy metabolism	-1.23	2.25
DH0AGB11ZD07RM1	9.29E-07	NP_051084.1	psbB; PSII 47KDa protein	Energy metabolism	-1.12	3.71
DH0AGB22ZH04RM1	1.23E-06	NP_051039.1	psbA; PSII 32KDa protein	Energy metabolism	-1.38	2.22
DH0AGB14ZC07RM1	1.85E-05	NP_051059.1	psaA; PSI P700 apoprotein A1	Energy metabolism	-1.08	2.28
DH0AGB14ZH06RM1	1.62E-09	NP_051084.1	psbB; PSII 47KDa protein	Energy metabolism	-1.10	5.62
DH0AGB16ZH10RM1	6.62E-07	NP_051076.1	psbE; PSII cytochrome b 559	Energy metabolism	-1.06	2.62
HaDplR105A10	2.92E-07	At2g32850	protein kinase family protein	Protein kinase	2.34	-4.00
HaDplR204G02	4.94E-08	At3g25960	pyruvate kinase [EC:2.7.1.40]	Protein kinase	1.15	-2.48
HaDplR108D06	2.52E-07	At3g58640	protein kinase family protein	Protein kinase	1.04	-2.82
DH0AB55ZC04RM1	5.79E-05	At2g37250	adenylate kinase related	Protein kinase	-1.09	2.21
DH0AB51ZE08RM1	7.03E-06	At3g27440	uridine kinase/uracil phosphoribosyl transfer	Protein kinase	2.45	-4.69
DH0AB64ZH03RM1	3.01E-06	At3g18130	guanine nucleotide- binding protein/ activated protein kinase C receptor RACK1	Protein kinase	3.12	-3.94
DH0AB66ZF11RM1	1.53E-06	At4g09320	nucleoside- diphosphate kinase [EC:2.7.4.6]	Protein kinase	1.79	-2.30
DH0AL3ZC10ZM1	2.55E-06	At1g24030	protein kinase family	Protein kinase	1.28	-2.94
DH0AL3ZB03ZM1	1.17E-07	At2g23070	casein kinase II alpha chain putative [EC:2.7.1.37]	Protein kinase	-1.19	2.56
DH0ALL12ZB01ZZM1	4.86E-08	At2g44680	casein kinase II beta chain putative	Protein kinase	1.89	-3.51

Table 6 continued

Sequence name	P value	Putative orthologue	Annotation	Functional Category	Fold change	
					Seeds	Leaves
DH0ALL29ZG05ZZM1	4.53E-06	At1g77720	protein kinase family	Protein kinase	1.70	-2.33
DH0ALL28ZC08ZZM1	1.89E-06	At3g18040	mitogen-activated protein kinase	Protein kinase	2.28	-3.60
DH0ALL29ZE03ZZM1	1.25E-09	At1g20950	putative pyrophosphate- dependent phosphofructokinase alpha subunit [EC:2.7.1.90]	Protein kinase	1.48	-4.27
DH0AMM35ZH05ZZM1	7.74E-06	At5g50370	adenylate kinase [EC:2.7.4.3]	Protein kinase	-1.03	2.45
DH0ANA13ZB05FM1	2.89E-06	At1g10940	serine/threonine protein kinase. putative [EC:2.7.1.-]	Protein kinase	1.04	-2.73
DH0AQA11ZF09RM1	2.73E-09	At4g31170	protein kinase family	Protein kinase	-1.01	-3.09
DH0AB59ZH02RM1	4.14E-06	At1g09160	protein phosphatase 2C	Protein phosphatase	2.45	-4.53
DH0AFF24ZC06ZZM1	3.55E-05	At3g44620	protein-tyrosine-phosphatase- likeprotein [EC:3.1.3.48]	Protein phosphatase	1.51	-2.93
DH0ALL29ZE09ZZM1	1.87E-05	At4g39120	Inositol monophosphatase -like protein	Protein phosphatase	2.05	-3.59
DH0ALL29ZB06ZZM1	5.86E-05	At5g09650	inorganic pyrophosphatase-like protein	Protein phosphatase	2.39	-3.94
DH0AMM5ZC12ZZM1	5.73E-07	At5g55260	serine/threonine protein phosphatase PP-X isoform 2 [EC:3.1.3.16]	Protein phosphatase	-1.13	2.59
DH0ANA3ZB06FM1	1.25E-06	At1g03960	protein phosphatase 2A -related	Protein phosphatase	1.02	-2.90
DH0AB44ZC07RM1	3.81E-06	At1g72370	putative 40S ribosomal protein SAeptor-like protein	Receptor	1.93	-2.43
DH0AB45ZF05RM1	7.21E-05	At4g08920	flavin-typeblue- light photoreceptor	Receptor	2.25	-2.51
DH0AFF22ZF08ZZM1	1.22E-04	At5g47800	photoreceptor-interacting protein- related	Receptor	1.53	-3.02
DH0AB41ZD03RM1	6.24E-06	At1g63430	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase putative	Receptor	2.49	-2.47
HaDpIR107A05	7.69E-10	At4g31800	WRKY family transcription factor	Transcription factor	1.18	-2.92
HaDpIR201C09	6.44E-07	At4g32880	HD-Zip transcription factor Athb-8	Transcription factor	2.19	-3.84
HM0008C02	1.09E-08	At3g52270	transcription initiation factor II F. beta subunit	Transcription factor	1.14	-2.89
HaDpIR106H02	8.24E-08	At1g24590	AP2 domain transcription factor. putative	Transcription factor	1.28	-3.47
DH0AB52ZF06RM1	2.35E-07	At2g40950	bZIP family transcription factor	Transcription factor	1.68	-3.30
DH0AB56ZB06RM1	3.72E-06	At4g23750	AP2 domain transcription factor	Transcription factor	2.38	-1.77
DH0AB64ZF08RM1	4.22E-08	At5g41360	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPB subunit	Transcription factor	2.20	-3.96
DH0AB67ZG08RM1	9.91E-07	At1g43160	AP2 domain transcription factor RAP 2.6	Transcription factor	2.29	-4.56
DH0AL7ZE11ZM1	3.45E-08	At1g54140	transcriptional activation factor TAFII32- related	Transcription factor	1.95	-3.35
DH0ALL24ZE11ZZM1	1.22E-09	At1g21740	bzip-related transcription factor	Transcription factor	1.71	-4.97
DH0ANA3ZA12FM1	2.58E-06	At2g30380	MYB family transcription factor -related	Transcription factor	1.88	-3.18
DH0AQA20ZH10RM1	3.43E-08	At2g28350	auxin response transcription factor	Transcription factor	1.56	-4.05

The Fold-change values represent changes of mRNA abundance in stressed plants vs. control and computed as 10 power to the difference between normalized expression values for each organ. Functional category based on Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database

Table 7 Real-Time PCR results of selected genes found to have significant genotypes x water stress interaction by microarray analysis

Sequence name	Annotation	Functional Category	Ichraq	Fold change	
				Proleic 204	Santiago II
DH0AB68ZH04RM1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B [EC:1.2.1.12]	Carbohydrate metabolism	-1.21	1.40	4.57
DH0AMM23ZB09ZZM1	aminotransferase class I and II [EC:2.6.1.1]	Amino acids metabolism	2.38	-1.21	-1.19
DH0AL23ZC07ZM1	fructose-bisphosphate aldolase [EC:4.1.2.13]	Carbohydrate metabolism	5.66	-2.69	-1.66
DH0ALL30ZD02ZZM1	succinyl-CoA ligase (GDP-forming) alpha-chain. mitochondrial [EC:6.2.1.4]	Carbohydrate metabolism	4.22	-2.68	-1.57
DH0AMM12ZA02ZZM1	H ⁺ - transporting ATPase protein. putative [EC:3.6.3.14]	Energy metabolism	2.72	-3.08	-1.47
DH0AGB22ZH04RM1	psbA; PSII 32 KDa protein	Energy metabolism	3.19	-8.11	2.34
DH0AFF27ZF01ZZM1	Aldehyde dehydrogenase (NAD) family protein[EC:1.2.1.3]	Fatty acids metabolism	13.00	-7.91	-1.32
DH0ALL25ZA03ZZM1	gamma-tocopherol methyltransferase [EC:2.1.1.95]	Tocopherol biosynthesis	1.96	-3.06	1.01
DH0AB60ZE01RM1	putative NPK1-related protein kinase 2	Protein kinase	2.99	-2.39	-1.35
DH0AL3ZB03ZM1	putative casein kinase II catalytic b unit [EC:2.7.1.37]	Protein kinase	6.66	-1.48	-1.22
DH0AC028ZC03FM1	MYB family transcription factor	Transcription factor	1.98	-1.02	-1.39

The Fold-change values represent changes of mRNA abundance in stressed plants vs. control for each genotype across the two organs. The expression level was normalized using β -actin as an internal control.

Table 8 Real-Time PCR results of selected genes found to have significant organs x water stress interaction by microarray analysis

Sequence name	Annotation	Functional Category	Fold change	
			Seeds	Leaves
DH0AB68ZH04RM1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B [EC:1.2.1.12]	Carbohydrate metabolism	2.05	-1.13
DH0AL15ZD01ZM1	enolase [EC:4.2.1.11]	Amino acids metabolism	1.26	-1.13
DH0ALL28ZD08ZZM1	sulfite reductase / ferredoxin (SIR) [EC:1.8.7.1]	Amino acids metabolism	1.17	-1.17
DH0AGB22ZH04RM1	psbA; PSII 32KDa protein	Energy metabolism	-1.72	1.63
DH0ALL29ZF03ZZM1	cytosolic triose phosphate isomerase [EC: 5.3.1.1]	Carbohydrate metabolism	1.30	-1.57
DH0ALL29ZF11ZZM1	tocopherol polyprenyl transferase (homo gentsiate phytyl transferase)	Tocopherol biosynthesis	1.11	-1.48
DH0AL3ZB03ZM1	putative casein kinase II catalytic b unit [EC:2.7.1.37]	Protein kinase	1.57	1.53
DH0ANA3ZB06FM1	protein phosphatase 2A -related	Protein phosphatase	1.79	-2.35

The Fold-change values represent changes of mRNA abundance in stressed plants vs. control for each organ across all genotypes.

The expression level was normalized using β -actin as an internal control.

Figure legends

Figure 1

Volcano plot of significance of differences between adapted (Ichraq) and non-adapted genotype (Santiago II) versus magnitudes of differences. Genes are indicated by black circles with the differences between normalized expression values for Ichraq versus Santiago II contrast (X-axis) plotted against the \log_{10} of the inverse p -values from the ANOVA (Y-axis). The bottom and top horizontal lines denote thresholds for $p= 1.2 \cdot 10^{-4}$ and $p= 5.8 \cdot 10^{-5}$ respectively. A total of 31 genes were significantly different between adapted and non-adapted genotype across all the samples in the experiments; the majority of these genes (28) was found to have interaction effects.

Figure 2

Volcano plot of significance of differences between high oleic (Proleic 204) and standard (Ichraq and Santiago II) genotypes. For each cDNA clone, the differences between normalized expression values for oleic versus standard genotypes contrast are plotted against the negative \log_{10} of the P values from the gene model. The bottom and top horizontal lines denote thresholds for $p= 1.2 \cdot 10^{-4}$ and $p= 5.8 \cdot 10^{-5}$ respectively. Genes are indicated by black circles with highly significant ones toward the top. A total of 23 genes showed significant variability of mRNA expression between oleic hybrid and standard ones, across all the samples in the experiments. Among these, 11 cDNA clones were found to have significant interaction effect.

Figure 3

Volcano plot of significance against expression differences between water deficit and control treatments. For each genes, the negative \log_{10} of the P -value from gene model are plotted against the differences between normalized expression values for samples subjected to water-deficit stress and control, across all experiments. Genes are indicated by black circles with highly significant ones toward the top. The first and second horizontal lines denote thresholds for $p= 1.2 \cdot 10^{-4}$ and $p= 5.8 \cdot 10^{-5}$ respectively. 29 EST exhibited significant variations in transcripts activity between stressed and control treatments. Among these clones. 25 exhibited interaction effect.

Figure 1

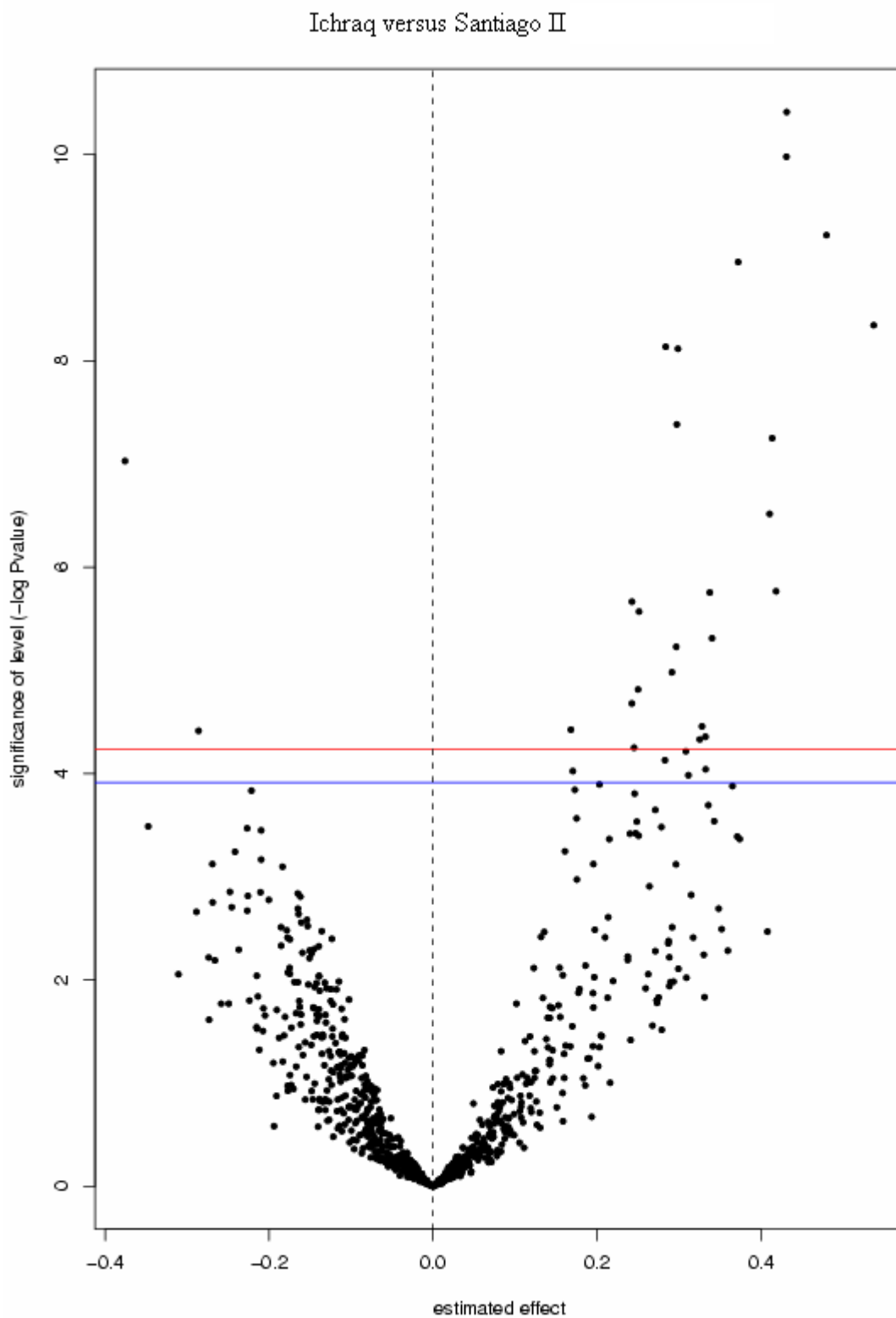


Figure 2

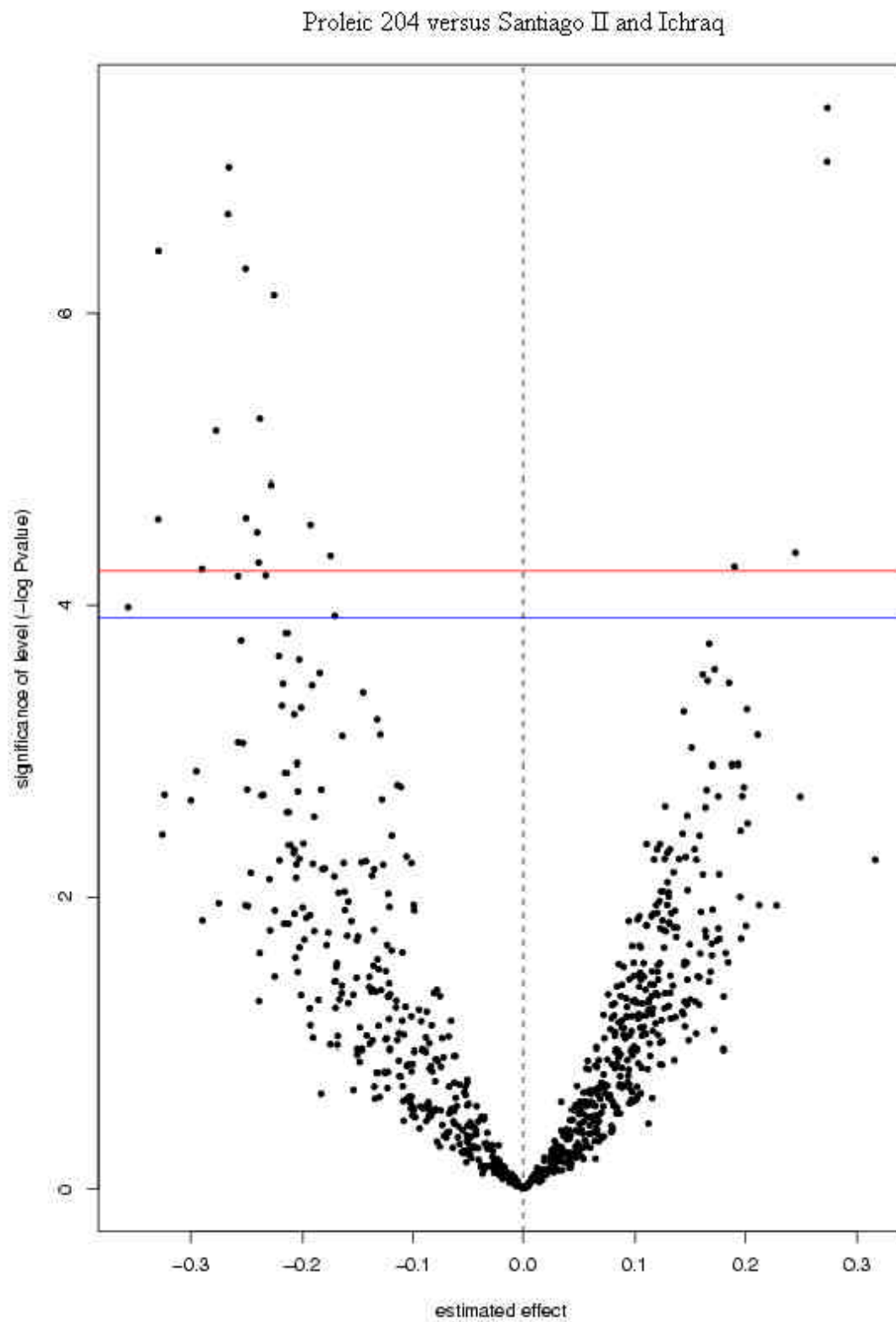
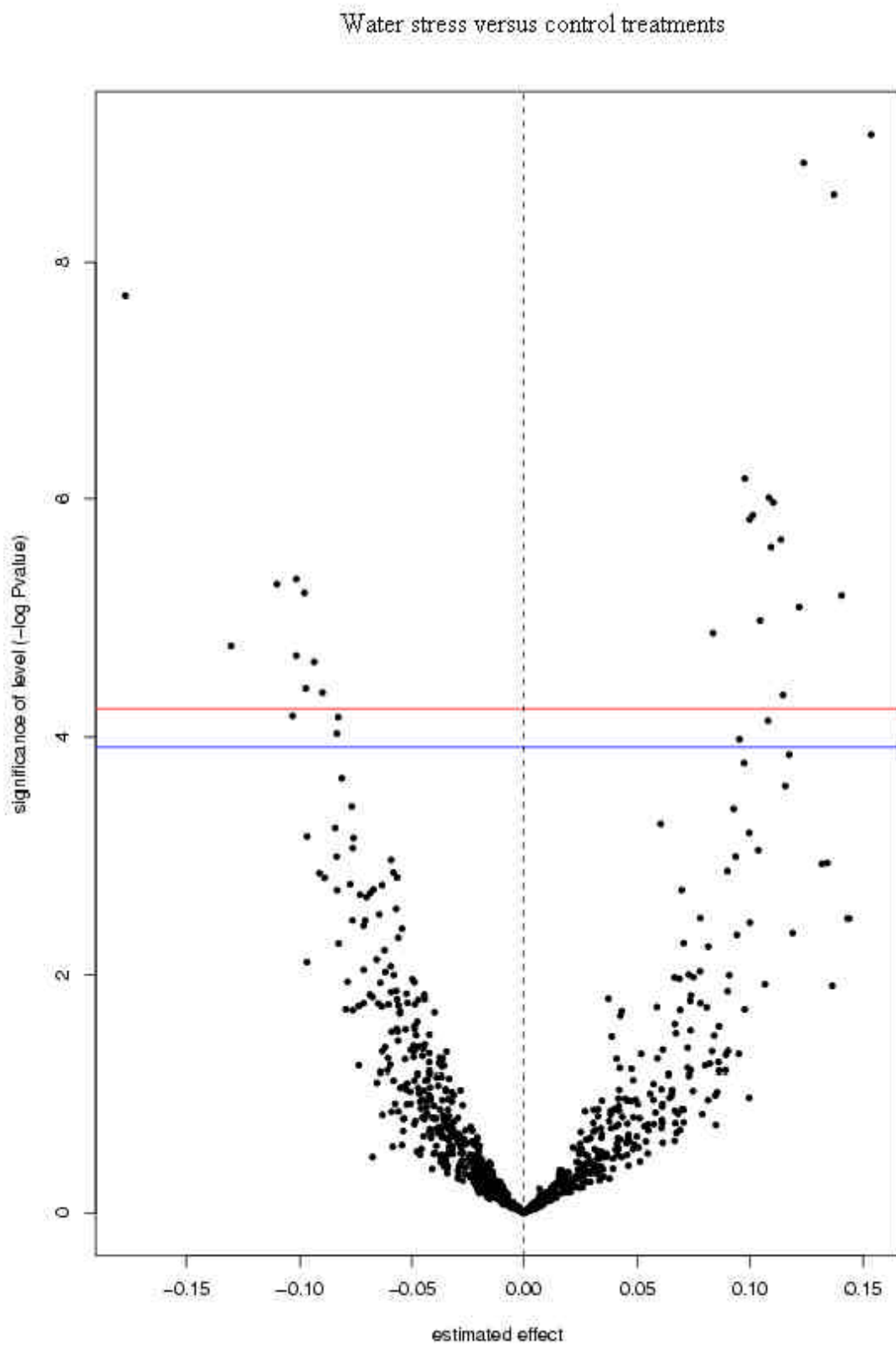


Figure 3



Liste des abréviations

- ETM: EvapoTranspiration Maximale
PMG: Poids de Mille Graines
IR: Indice de Récolte
MPa: Méga Pascal
PAR: Photosynthetic Active Radiation, correspondant à l'énergie lumineuse photosynthétiquement active interceptée par le couvert
IF: Indice Foliaire défini par le rapport surface des feuilles/surface au sol correspondant
ABA: Acide Abscissique
K⁺: ion potassium
NO₃⁻: ion nitrate
F1: stade phénologique établi par le CETIOM correspondant au début de la floraison
M0: stade phénologique correspondant au de remplissage de la graine (CETIOM)
M2: stade phénologique correspondant à la fin de remplissage de la graine (CETIOM)
M4: stade phénologique correspondant à la maturité physiologique de la graine (CETIOM)
DSF: Durée de la Surface Foliaire
DEI: Durée d'Efficiency de l'Interception lumineuse
PAC: Politique Agricole Commune
ETBE: Ethyl-tertio-butyl-éther
OGM: Organisme Génétiquement Modifié
COV: Composés Organiques Volatils
ETP: EvapoTranspiration Potentielle
FAS: complexe « acides gras synthase »
DMS: DéMéthylStérols
MS: MéthylStérols
DiMS: DiMéthylStérols
ODS:Oléate Désaturase
JAF: Jours Après Floraison
ASE: Accelerated Solvent Extractor
TBME: TerButylMéthylEther
TMSH: TrimMéthylSulfonium Hydroxyde
FAME: Fatty Acids Methyl Ester: méthode d'extraction des acides gras directement sur graines broyées
CPG: chromatographie en phase gazeuse
FID: Flamme Ionisation Detector
RE: Réticulum Endoplasmique
PCR: Polymérase Chain Reaction
Microarray: puce à ADN

Liste des figures

Figure 1 : Origine des diverses structures constitutives des semences (d'après Côme et Corbineau, 1998)	12
Figure 2 : Profil de croissance de la graine entière, de la coque et de l'amande au cours du cycle de croissance du tournesol (d'après Connor et Hall, 1997)	13
Figure 3 : Structure simplifiée d'un triglycéride	17
Figure 4 : Structure moléculaire des tocophérols et tocotriénols	19
Figure 5 : Structure chimique du cholestérol (5α -cholestan- 3β -ol) d'après Piironen et al., 2000	21
Figure 6 : Schéma simplifié de la biosynthèse des phytostérols et triterpènes	21
Figure 7 : Chaîne de biosynthèse des différents phytostérols, d'après Piironen <i>et al.</i> , 2000.....	22
Figure 8 : Exemples de structures conjuguées de stérols, d'après Piironen <i>et al.</i> , 2000.....	23
Figure 9 : Réactions simplifiées de la synthèse des lipides végétaux (d'après Harwood, 1998).....	27
Figure 10 : Rôle central de l'acétylCoA dans les métabolismes des espèces oléoprotéagineuses (source: Bonjean, 1993)	29
Figure 11 : Mécanisme de synthèse des acides gras (source: Browse, 1997).....	30
Figure 12 : Formation des lipides membranaires des autres organites et des glycérolipides de réserves (Somerville <i>et al.</i> , 1991)	35
Figure 13 : Schéma de la formation des oléosomes pour le stockage des triglycérides (Source: Huang, 1992).....	36
Figure 14 : Répartition de la production mondiale d'oléagineux (millions de tonnes), (Source : AMSOL, 2002)	38
Figure 15 : Relation entre rendement et taux de satisfaction des besoins hydriques (Merrien et Grandin, 1990)	40
Figure 16 : Schéma simplifié de l'extraction de l'huile de tournesol	48
Figure 17 : Teneur en huile (O, g d'huile/kg de matière sèche) en fonction de la radiation interceptée par plante entre 250 et 450°C jours après floraison pour plusieurs génotypes, d'après Aguirrezabal <i>et al.</i> (2003).....	72
Figure 18 : Rendement en grain et rayonnement intercepté par le couvert de fin floraison à maturité, d'après Picq, 1989.....	72
Figure 19 : Relation entre rendement et indice foliaire à F2, d'après Merrien et Grandin, 1990.....	73
Figure 20 : Régimes hydriques appliqués en fonction des stades phénologiques en milieu contrôlé	79
Figure 21 : Humidité volumique du sol (H_v) mesurés en condition contrôlée au cours du cycle de développement pour différents niveaux d'alimentation hydrique	89
Figure 22 : Potentiel hydrique foliaire de base (Ψ_{base} en MPa) mesurés en milieu contrôlé à différents stades du cycle de développement en fonction des différents niveaux d'alimentation hydrique pour les deux génotypes Santiago II et Proléic 204.....	90
Figure 23 : Teneur en eau relative des plantes en fonction des jours après floraison (JAF) pour a) un génotype standard (Santiago II) et b) un génotype oléique (Proléic 204).....	93
Figure 24 : Surface foliaire ($cm^2/plante$) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les génotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b).....	95

Figure 25 : Durée des différentes phases du cycle en jours après levée (a) et sommes des températures (b) (°CJ après levée) en fonction de la date de semis et des campagnes 2002 et 2003 selon les 4 phases phénologiques pour les géotypes Santiago II et Proléic 204	97
Figure 26 : Principe et composantes de l'Accelerated Solvent Extractor (ASE) (ASE 200 [®] Dionex)	100
Figure 27 : Les trois étapes nécessaires au dosage des acides gras	102
Figure 28 : Quantités de phytostérols totaux dosés dans la graine entière, dans la coque + l'amande de la graine décortiquée, dans la coque et dans l'amande séparément pour les géotypes Santiago II et Proléic 204	104
Figure 29 : Corrélacion entre la teneur en acide oléique (C18:1) et celle de l'acide linoléique (C18:2) pour tous les géotypes et les années culturales	113
Figure 30 : Effet de la date de semis sur la teneur en huile (a) et en protéines (b) (g/100g de matière sèche (MS) dans le cas des géotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichraq en 2003) selon l'année	114
Figure 31 : Effet du régime hydrique sur la teneur en huile (a) et en protéines (b) (g/100g de matière sèche (MS) dans le cas des géotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichraq en 2003) selon l'année	116
Figure 32 : Effet de la date de semis sur la teneur en acides oléique (C18:1) (a) et linoléique (C18:2) (b) (%/aux acides gras totaux) dans le cas des géotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichraq en 2003) selon l'année	117
Figure 33 : Effet du régime hydrique sur la teneur en acides oléique (C18:1) (a) et linoléique (C18:2) (b) (%/aux acides gras totaux) dans le cas des géotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations (Karima, Salima, en 2002 et Ichraq en 2003) selon l'année	119
Figure 34 : Effet des facteurs régime hydrique, date de semis et leur interaction sur la teneur en phytostérols totaux pour les géotypes testés lors de la campagne 2003	121
Figure 35 : Analyse en composantes principales (ACP) pour les variables teneur en huile (TH), teneur en protéines (TP), teneur en acides oléique (T181), linoléique (T182), palmitique (T160), stéarique (T180), sur le rendement-grain (RDT) et le poids d'une graine (P1000) toutes années culturales confondues	126
Figure 36 : Corrélacion entre rendement en graines et teneur en huile pour tous les géotypes selon l'année	127
Figure 37 : Corrélacion entre teneur en protéines et teneur en huile (%/matière sèche) selon l'année tous géotypes confondues	136
Figure 38 : Corrélacion entre teneur en protéines et teneur en huile (%/matière sèche) selon l'année culturale pour l'hybride standard (Santiago II) et l'hybride oléique (Proléic 204) pour toutes les années	137
Figure 39 : Corrélacion entre teneur en protéines et teneur en huile (%/matière sèche) pour tous les géotypes testés en 1999, 2000, 2002 et 2003 en fonction de la date de semis (a) et du régime hydrique (b)	137
Figure 40 : Corrélacion entre teneur en huile et teneur en protéines (%/matière sèche) en fonction des conduites de culture lors de la campagne 2003 chez les géotypes standard (Santiago II), oléique (Proléic 204) et population (Ichraq)	138
Figure 41 : Corrélacion entre teneurs en acides oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) en fonction des conduites de culture tous géotypes confondues testés en 1999, 2000, 2002 et 2003	139

Figure 42 : Corrélation entre teneurs en acides oléique (C18:1) et palmitique (C16:0) en fonction des conduites de culture pour les géotypes standard (a) et oléiques (b) testés en 1999, 2000, 2002 et 2003	140
Figure 43 : Corrélation entre la teneur en huile (%/matière sèche) et la teneur en phytostérols totaux en fonction de la date de semis pour tous les géotypes testés en 2003	141
Figure 44 : Voie de biosynthèse des stérols des plantes supérieures (Source: Schaller, 2003)	143
Figure 45 : Corrélation entre teneur en β sitostérol et campestérol a) dans les cas de la date de semis classique (a) et dans le cas de la date de semis tardive (b) et comparaison des pentes des droites de régression entre DS1 et DS2 (c)	144
Figure 46 : Teneur en huile en fonction des températures moyennes entre F1-M0 et M0-M2 pour le géotype standard (a) (Santiago II) et le géotype oléique (Proléic 204) (b).....	145
Figure 47 : Teneur en protéines en fonction des températures moyennes entre F1-M0 et M0-M2 pour le géotype standard (a) (Santiago II) et le géotype oléique (Proléic 204) (b).....	147
Figure 48 : Variation de la somme des proportions huile et protéines (%/matière sèche) dans les graines de Santiago II et Proléic 204 en fonction de la température moyenne entre les stades F1 et M0	148
Figure 49 : Indice ODS en fonction de la température et des déficits hydriques entre les stades F3.2 et M0 dans le cas du géotype standard (Santiago II) (a) et entre les stades F1 et F3.2 dans le cas du géotype oléique (Proléic 204) (b).....	153
Figure 50 : Accumulation de matière sèche dans les graines en fonction des jours après floraison (JAF) pour les géotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003	159
Figure 51 : Teneur en huile (%/matière sèche) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les géotypes Santiago II (a) et (Proléic 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003	161
Figure 52 : Teneur en huile (%/MS) en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique pour les géotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b)	162
Figure 53 : Accumulation d'huile dans les graines (g/capitule) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les géotypes Santiago II (a) et (Proléic 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003	162
Figure 54 : Accumulation d'huile dans les graines (g/plante) en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique pour les géotypes Santiago II (a) et Proléic 204 (b).....	164
Figure 55 : Teneur en protéines (%/MS) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les géotypes Santiago II (a) et (Proléic 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003	165
Figure 56 : Teneur en acide oléique (C18:1) et pourcentage d'eau des graines (PEG) en fonction des jours après floraison (JAF) pour les géotypes Santiago II (a) et (Proléic 204) (b) selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002	166
Figure 57 : Teneur en acides palmitique (C16:0) (a et b) et stéarique (C18:0) (a' et b') en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II (a et a') et Proléic 204 (b et b') selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002	168
Figure 58 : Teneur en acide oléique (C18:1) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003	170

Figure 59 : Teneur en acide linoléique (C18:2) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003	171
Figure 60 : Teneur en acides palmitique (C16:0) (a) et stéarique (C18:0) (b) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003.....	172
Figure 61 : Teneur en acide oléique (C18:1) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Proléic 204 selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003	172
Figure 62: Teneur en acides palmitique (C16:0) (a) et stéarique (C18:0) (b) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Proléic 204 selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2003.....	173
Figure 63 : Teneur en acide oléique (C18:1) en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique pour Santiago II.	174
Figure 64 : Accumulation d'acides oléique (C18:1) (a et b) et linoléique (C18:2) (a' et b') dans les graines (g/capitule) en fonction des jours après floraison (JAF) pour Santiago II (a et a') et Proléic 204 (b et b') selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003	176
Figure 65 : Concentration en phytostérols totaux du génotype Santiago II en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique.....	179
Figure 66 : Concentration en déméthylphytostérols du génotype Santiago II à la récolte en conditions contrôlées en fonction des différentes conditions d'alimentation hydrique	179
Figure 67 : Répartition des catégories de phytostérols au sein de la coque et de l'amande dans le cas d'un génotype standard (a) (Santiago II) et d'un génotype oléique (b) (Proléic 204)	180
Figure 68 : Pourcentage d'acides gras insaturés en fonction du pourcentage d'eau des graines (PEG) Santiago II et Proléic 204 dans les conditions naturelles de 2002 et 2003	185
Figure 69 : Exemple de corrélation représentative de l'expression globale des gènes déposés sur la puce (a) entre répétitions biologiques et en (b) entre dépôt	190
Figure 70 : « Volcano plots » représentant les gènes différentiellement exprimés entre Ichraq et les deux autres génotypes présentant une différence significative	193
Figure 71 : « Volcano plots » représentant les gènes différentiellement exprimés entre le génotype oléique (Proléic 204) et les génotypes standard présentant une différence significative.....	197

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des coques de tournesol en acides aminés	14
Tableau 2 : Composition en acides gras des principales huiles et graisses végétales	18
Tableau 3 : Composition en acides gras de tournesol classique, oléique et mi-oléique	19
Tableau 4 : Les quatre formes des tocophérols selon la position des groupements méthyle sur le noyau 6-OH-chromane	19
Tableau 5 : Teneurs en tocophérols (TP) et tocotriénols (TT) ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d'huile) dans les principales huiles végétales	20
Tableau 6 : Composition en stérols majeurs des principales huiles végétales (g/kg)	25
Tableau 7 : Estimation des productions françaises d'oléagineux (source :Agreste, 2004)	38
Tableau 8 : Influence de l'alimentation azotée sur la production et la composition des akènes, d'après Blanchet, 1987	42
Tableau 9 : Valorisation non alimentaire des phytostérols	53
Tableau 10 : Composition en acides gras (%) de la graine de tournesol pour des mutants naturels ou induits en comparaison avec le tournesol standard	59
Tableau 11 : Caractéristiques des génotypes étudiés	76
Tableau 12 : Récapitulatif des traitements appliqués en serre et en champ	77
Tableau 13 : Bilan hydrique (mm) par rapport à 70% de l'ETM établi au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année	84
Tableau 14 : Température moyenne ($^{\circ}\text{C}$) au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année	85
Tableau 15 : Somme des températures ($^{\circ}\text{C}$ jours) au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année	86
Tableau 16 : Somme (a) et moyenne (b) du rayonnement incident global ($\text{MJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ou $\text{MW}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$) au cours des phases de développement selon la date de semis, le traitement hydrique et l'année	87
Tableau 17 : Potentiel hydrique foliaire à la mi-journée ($\Psi_{\text{mi-journée}}$ en MPa) mesuré au champ en 2002 (a) et 2003 (b) à deux stades du développement (F1 et M0) en fonction du régime hydrique et de la date de semis pour les génotypes Santiago II, Proléic 204 et des populations marocaines (Karima et Salima en 2002; et Ichraq en 2003)	91
Tableau 18 : Estimation du niveau de stress hydrique entre le début floraison (F1) et la fin de maturation des graines (M2) selon l'année	94
Tableau 19 : Surface foliaire ($\text{cm}^2/\text{plante}$) des génotypes Santiago II et Proléic 204 lors de la campagne 2003 (a) et de la campagne 2002 (b) en fonction de la date de semis et du régime hydrique	96
Tableau 20 : Stades phénologiques retenus pour le suivi de la culture	98
Tableau 21 : Teneur en acides gras majeurs des graines du génotype Proléic 204 à maturité pour trois modalités de durée de séchage et de température	99
Tableau 22 : Effets des facteurs génotype (G), régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leurs interactions ($G*DS$, $G*RH$, $DS*RH$, $G*DS*RH$) sur le rendement en graines, le poids de 1000 graines (PMG), les teneurs en huile et en protéines (a) et sur les teneurs en acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0) oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) (b) selon l'année	108

Tableau 23 : Effet du facteur génotype sur le rendement grains, le poids de 1000 graines (PMG) et les teneurs en huile, protéines, acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) selon l'année	111
Tableau 24 : Effets des facteurs régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leur interaction (DS*RH) sur les teneurs en acides palmitique (C16:0) et stéarique (C18:0) selon l'année	118
Tableau 25 : Effets des facteurs génotype (G), régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leurs interactions (G*DS, G*RH, DS*RH, G*DS*RH) sur la teneur en β sitostérol, des trois groupes de phytostérols, et de phytostérols totaux lors de la campagne 2003	120
Tableau 26 : Effet du facteur génotype sur la teneur en β sitostérol, des trois groupes de phytostérols et de phytostérols totaux pour les différents génotypes testés lors de la campagne 2003	120
Tableau 27 : Effet de la date de semis, du régime hydrique et leurs interactions avec les génotypes hybrides (a), populations et lignées (b) sur les teneurs en déméthylphytostérols majeurs lors de la campagne 2003	122
Tableau 28 : Effet du facteur génotype sur la quantité d'huile et de protéines accumulée par graine et sur le rendement en huile et en protéines par hectare selon l'année	128
Tableau 29 : Effet de la date de semis (DS), du régime hydrique (RH) et de leur interaction sur le rendement à l'hectare et les quantités d'huile et de protéines par graine pour trois génotypes selon l'année	129
Tableau 30 : Effets des facteurs régime hydrique (RH), date de semis (DS) et leur interaction (DS*RH) sur les quantités (a) et les rendements (b) en acides palmitique (C16:0), stéarique (C18:0), oléique (C18:1) et linoléique (C18:2) selon l'année	132
Tableau 31 : Coefficients de corrélations significatives et positives entre phytostérols au cours de la campagne 2003	142
Tableau 32 : Effets du facteur régime hydrique (RH), de la date de semis (DS) et de leur interaction (DS*RH) sur la proportion de coque (%) dans les graines des génotypes testés lors de la campagne 2003	146
Tableau 33 : Températures moyennes ($^{\circ}$ C) entre le début et la fin floraison (F1-F3.2), et entre la fin floraison et le début de maturation des graines (F3.2 et M0) lors des campagnes 1999 et 2002	151
Tableau 34 : Coefficient de régression entre les températures moyennes des phases (F1-M0; F1-F3.2; F3.2-M0) et l'indice ODS selon le déficit hydrique (DH) pour deux génotypes dans toutes les séquences climatiques étudiées	151
Tableau 35 : Accumulation de matière sèche dans les graines des génotypes Santiago II et Proléc 204 (g/jour/ capitule) en fonction des conditions culturales (date de semis et régime hydrique) et de l'année	159
Tableau 36 : Accumulation de matière sèche des graines (g/plante) des génotypes Santiago II et Proléc 204 en fonction des jours après floraison (JAF) en conditions contrôlées dans différentes conditions d'alimentation hydrique (RH)	160
Tableau 37 : Dynamique d'accumulation de l'huile (taux de remplissage, positionnement de la période de fin de synthèse), proportion et quantité d'huile à maturité des graines des génotypes Santiago II et Proléc 204 selon la date de semis et le régime hydrique dans les conditions naturelles de 2002 et 2003	163
Tableau 38 : Concentration en déméthyl, méthyl et diméthyl phytostérols des graines du génotype Santiago II en fonction des jours après floraison (JAF) dans les conditions naturelles de 2002 et 2003 pour la situation date de semis classique*régime irrigué	178
Tableau 39 : Exemples de gènes présentant une interaction génotype*stress hydrique	192

Tableau 40 : Exemples de gènes présentant un effet génotype (Ichraq vs Santiago II et Proléic 204 ou Proléic 204 vs Santiago II et Ichraq) et un effet stress hydrique (NIRR vs IRR)195

Tableau 41: Marges de manœuvre accessibles par les itinéraires techniques (date de semis et régime hydrique) et par les génotypes pour la teneur en protéines et en huile (a), la teneur en acides gras insaturés (b), la teneur en acides gras saturés (c) et la teneur en phytostérols (d).....205