

Composition du jury :

Président : Prof Hans VAN DYCK (UCL, Belgique)

Secrétaire : Prof Walid SADOK (UCL, Belgique)

Promoteurs : Prof Mathieu JAVAUX (UCL, Belgique)
Prof Stanley LUTTS (UCL, Belgique)

Lecteurs : Prof Xavier DRAYE (UCL, Belgique)
Prof Frédéric NGUYEN (ULg, Belgique)
Prof Wim VAN DEN ENDE (KUL, Belgique)

*Many of the great achievements of the world were accomplished
by tired and discouraged men who kept on working.*

Albert Einstein.

...smalls too...!

Summary

Root-chicory is a biannual cash crop cultivated in Western Europe to extract inulin from its tap root. Inulin is a chain of fructoses ended by a glucose moiety which is used mostly in the food industry as a sugar or as a textural agent.

The aim of our work was to understand the potential impacts of the predicted climate changes on the root-chicory yield. In particular, we aimed at investigating the impacts of drier summers or of summer floods on the physiology, the water uptake and the yield of the plant.

To study those abiotic stresses, four experiments were performed under controlled conditions. The plants were cultivated for six months in phytotron chambers and the stresses were applied three months after sowing, at a time corresponding to the summer period.

In all experiments, plants were grown on brusselean sand and irrigated using nutrient solution. Two experiments were performed in small columns of 55 cm height and 25 cm diameter to follow more specifically the physiological and yield responses of the plant for both stresses. The two others were carried out in large pipes of 142 cm height and 40 cm diameter. In this situation the aim was mostly to study the root behavior and water uptake pattern for different irrigation scenarios.

Thanks to three of those experiments, we found that chicory is able to survive to water shortage. In this situation, the plant reduces its growth in order to limit water losses. It was also observed that this stress does not damage the plant metabolism. Indeed, even if due to growth reduction and stomatal closure the gas exchanges were reduced, it was found that the photosynthesis and the sugar production were maintained. The yield was strongly reduced due to growth inhibition but the inulin concentration and the length of the chains were maintained.

In two of those studies, the root behavior and the water uptake pattern were also studied in the large pipes giving to the plants almost a similar soil volume as in the field. This was made thanks to two geophysical techniques: the Time Domain Reflectometry (TDR) and the Electrical Resistance Tomography (ERT). The first message of those studies is that it is possible to follow precisely the soil water content respectively in one and three dimensions using those techniques. Using the water content and root growth measurements, we modeled the water uptake. It appeared that before the reduction in transpiration, the lack of water in the upper layers is compensated. Water enters the root from deeper in the soil thanks to a passive mechanism called compensation. After this first passive mechanism,

it has also been observed that the plants reacted actively against drought by sending new lateral roots in the layers where water was still available. Three dimensional soil water monitoring illustrated that horizontal redistribution was also an important mechanism, which helps plants to sustain low water levels.

The fourth experiment concerned flooding stress. It appears in this case that growth was maintained in waterlogging situations. Contrary to what happened under drought, it was observed that photosynthesis, and mostly sugar metabolism were affected by this stress. Indeed, the efficiency of the light phase of photosynthesis was reduced and the activities of enzymes responsible for sugar breakdown like invertases and sucrose synthase were increased in leaves and roots. In terms of yield, it was measured that the final quantity of inulin produced in the roots was not affected by flooding but the quality of the sugar (chain length) was reduced.

To conclude, this study shows that chicory is able to cope with abiotic stresses thanks to some physiological mechanisms and its deep root system which helps extracting soil water. Nevertheless, drought stress induced a huge yield reduction. On an agronomical point of view and in the environmental conditions we imposed, chicory can be defined as tolerant to flooding stress and not to drought.

Key words: *Cichorium intybus*, drought, flooding, photosynthesis, fructans, water uptake, yield, tolerance.

Remerciements

Arrivé au terme de ce travail de plus de 4 ans, je tiens très sincèrement à remercier toutes les personnes qui m'ont permis, de près ou de loin d'y parvenir.

Je pense ici tout d'abord à mes promoteurs ; les Professeurs Stanley Lutts et Mathieu Javaux. Voilà maintenant près de 6 ans, Mr Lutts m'a accueilli dans son laboratoire pour y réaliser mon mémoire. Quelques mois plus tard, bien avant la fin de mon travail, il m'a renouvelé sa confiance en montant un dossier « Aspirant-FNRS » pour moi. Au cours des 6 années passées au sein du GRPV, il m'a à maintes reprises renouvelé cette confiance et je l'en remercie chaleureusement. J'ai également eu la chance de profiter de ses inombrables conseils et corrections lors de la rédaction. Pour tout ça et bien d'autres choses je le remercie très sincèrement. De la même manière, je remercie chaleureusement Mathieu pour sa confiance, sa disponibilité et son aide lors de la rédaction. Je n'ai encore jamais rencontré d'autre personne avec un esprit scientifique aussi débordant ! Il n'est pas une réunion de laquelle je suis sorti sans avoir à creuser de nombreuses pistes ! Un réel plaisir et une source de motivation inépuisable ! J'espère pouvoir m'inspirer de tout ce que j'ai reçu pour la suite de ma carrière !

Je tiens ici tout particulièrement à remercier également 2 membres d'une université sœur ; la KUL ! Un merci très particulier au Professeur Wim Van den Ende et à Rudy Vergauwen. Dès notre première entrevue, ils ont décidé de m'accueillir les bras grands ouverts dans leur labo. J'ai non seulement pu bénéficier de matériel et de techniques que nous n'avions pas au GRPV, mais ils m'ont tous deux donné des conseils particulièrement précieux lors de mes manip et en cours de rédaction. Je suis persuadé que ce travail n'aurait pu aboutir sans eux. Il s'agit là à mon sens d'un très bel exemple d'une collaboration transrégionale réussie ! Wim, Rudy, een hartelijk dank voor alles wat jullie voor mij gedaan hebben! Zoals ik het in een Frans juist schreef, wat een mooi voordeel van een Belgische collaboratie!

Je remercie également mon comité d'accompagnement qui outre Mr Lutts et Mathieu comprenait les Professeurs Xavier Draye et Frédéric Nguyen. Nos réunions m'auront été particulièrement utiles en vue de parvenir au résultat final ! Merci aussi au jury qui a accepté de lire et juger ce travail. Merci donc aux Professeurs Walid Sadok et Wim Van den Ende. Merci enfin au Professeur Hans Van Dyck d'avoir accepté de présider ce jury.

Outre mes promoteurs, Wim et Rudy, mon comité d'accompagnement et mon jury, ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de tous mes collègues. Un grand merci à Brigitte, Baudouin, Marc, Béatrice, Guido, Sébastien, Jacques, Anne et Thomas pour leur aide technique, pour nos échanges et pour la bonne ambiance au sein de « mes 2 labos » ; le GRPV et l' « unité GERU » ! Je pense que nous ne pourrions arriver à un résultat probant sans vos conseils et votre aide. Merci à Béatrice d'avoir également résolu tous les soucis administratifs et chimiques auxquels j'ai pu être confronté ! Et ils ont été nombreux !

Merci encore à Laure, Arlène, Alécia, Thomas, Imène, Muriel, Anne-Sophie, Delphine, Hélène, Michel, Rui-Ming, Isabelle, Nassima, Roberta, Vianney, Alexis et Guillaume pour le travail réalisé ensemble à des niveaux divers mais aussi et surtout pour les amitiés liées au cours de ces années, pour les temps de midi de discussion, de rire, de sport et j'en passe !

Au niveau de la recherche, je tiens à remercier plus particulièrement Laure, Arlène, Anne-Sophie, Vianney et Guillaume pour nos fructueuses collaborations !

Merci également aux « GIPSies » ; Laure, Valentin, Guillaume, Mathieu et Xavier pour nos échanges et réflexions autour des racines et du sol !

Le puzzle de l'entourage de ma thèse se construit mais il ne serait pas complet sans citer les 3 mémorants qui ont travaillé sur la chicorée et m'ont chacun permis d'avancer de manière incroyable ! Merci à Nathalie, Bashar et Christophe pour le travail réalisé, pour la confiance qu'ils m'ont témoignée et pour leur bonne humeur !

Pour terminer, un tout grand merci à mon entourage ! Amis et famille m'ont aidé à leur niveau à parvenir au terme de ce travail. Je n'aurais pu y arriver sans Alix et Zélie !! Elles m'ont non seulement soutenu mais aussi et surtout supporté tout au long de cette thèse...ou d'une partie! Cela devenait particulièrement long et lourd à la fin et je m'en excuse ! Merci pour votre soutien et votre patience !

Un merci tout particulier également à mes parents qui m'ont toujours encouragé dans mes choix depuis la petite enfance. Les choses ont été identiques pour cette thèse. De mon plus jeune âge à maintenant, ils ont toujours cru en moi et c'est bien souvent ce qui m'a permis d'avancer ! Je ne pourrais jamais assez vous remercier !

Enfin, merci à mes amis et ma famille pour leur soutien de tous les instants.

Table des matières

Summary	iii
Remerciements	v
Table des matières	vii
Introduction générale.....	1
Organisation de la thèse et objectifs	5
Revue bibliographique.....	9
1. Mise en contexte.....	9
2. Impacts du manque et de l'excès d'eau sur nos cultures:	11
2.1 <i>Préambule relatif à la notion de tolérance au stress</i>	11
2.2 <i>La sécheresse</i>	11
2.3 <i>Flooding stress</i>	24
3. Que se passe-t-il dans le sol ?	35
3.1 <i>Introduction</i>	35
3.2 <i>Suivi du contenu en eau du sol</i>	35
3.3 <i>Fonctionnement des sondes TDR et de l'ERT</i>	36
3.4 <i>Modélisation des mouvements d'eau dans le sol</i>	45
4. La chicorée à inuline.....	47
4.1 <i>Cichorium</i>	47
4.2 <i>Cichorium intybus var sativum</i>	49
4.3 <i>Historique et chiffres</i>	50
4.4 <i>La culture de la chicorée à inuline</i>	51
4.5 <i>La création de variétés</i>	54
4.6 <i>Perspectives pour la culture de chicorées</i>	55
4.7 <i>L'inuline</i>	56
4.8 <i>Effets connus du statut hydrique du sol sur la plante</i>	66
Rappel des objectifs	73

Chapitre 1	75
Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in <i>Cichorium intybus</i> (var. <i>sativum</i>) independently of photosynthesis	75
Abstract	75
Introduction	76
Material and Methods.....	78
Results	84
Discussion.....	96
Acknowledgement	101
References.....	101
Inter-chapitres 1 - 2	107
Chapitre 2	113
Root water uptake dynamics of <i>Cichorium intybus</i> var. <i>sativum</i> under water-limited conditions	113
Abstract	113
Introduction	114
Material and Methods.....	116
Results and Discussion	125
Conclusion	143
Acknowledgement	144
References.....	144
Inter-chapitres 2 - 3	149
Chapitre 3	151
3-D soil water depletion due to chicory root water uptake monitored by Electrical Resistivity Tomography	151
Abstract.....	151
Introduction	151
Material and methods	153

Results.....	162
Conclusions	178
References	179
Inter-chapitres 3 - 4	183
Chapitre 4	185
Long term intermittent flooding stress affects plant growth and inulin synthesis of <i>Cichoryum intybus</i> (var. <i>sativum</i>)	185
Introduction	186
Material and Methods.....	188
Results	195
Discussion.....	210
Acknowledgements.....	214
References.....	215
Discussion	221
Conclusions	243
Références	245
List of publications	273
Annexe 1.....	275

Introduction générale

De nombreux scientifiques l'affirment : l'agriculture est à un tournant crucial de son existence ! Jacques Diouf, ancien directeur général de la FAO (1994-2011), appelle régulièrement les scientifiques à tendre vers une seconde révolution verte en agriculture¹. Ce secteur et ses différents acteurs doivent en effet trouver un moyen de nourrir une population croissante tout en s'adaptant à des changements importants et rapides. Parmi ces changements, nous pensons en priorité à l'adaptation aux changements climatiques, mais aussi à l'augmentation continue des prix de l'énergie, à l'appauvrissement des sols en matières organiques, à la diminution du prix des matières premières, à l'hyper-spécialisation,...

Il ne faut pas penser que la Belgique ou même l'Europe parviendront à elles seules à nourrir les neuf milliards d'habitants prévus sur Terre à l'horizon 2050 (United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division, 2009). La seconde révolution verte prônée par Diouf et beaucoup d'autres (Lynch and Deikman, 1998 ; Lynch, 2007) devra permettre de modifier les pratiques actuelles et nous recentrer sur le développement durable de l'agriculture. La grande incertitude à ce niveau concerne l'adaptation de nos plantes de grandes cultures à des changements climatiques rapides. Comment les plantes réagiront-elles face à un manque d'eau, des températures plus élevées, des périodes parfois plus humides,... ? Faudra-t-il développer l'irrigation ? Utiliser de nouveaux géotypes ? Sera-t-il nécessaire de modifier les rotations dans certaines régions ? Il ne sera bien évidemment pas possible de répondre à toutes ces questions dans ce travail, mais il s'agira là du cadre très général qui soutient notre étude et la majorité des recherches menées actuellement en agriculture.

Au sein de la littérature, de nombreux travaux traitant des effets de la sécheresse existent. Une recherche générale dans les bases de données scientifiques avec les mots clés « drought » et « plant » fait ressortir plus de 15000 études. La plupart d'entre-elles concerne des plantes se développant dans des pays touchés depuis longtemps par des conditions climatiques arides. Les recherches relatives aux effets des températures élevées ou de l'engorgement des sols sur les plantes de milieux tempérés sont quant à elles bien moins nombreuses. Une recherche dans les bases de données avec les termes « heat stress » et « plant » fait ressortir approximativement 6000 résultats alors qu'une recherche avec les termes « flooding »,

¹ www.fao.org, le 4 avril 2012

« hypoxia », « anoxia » combinés à chaque fois au mot « plant » ne fait ressortir au total qu'un peu moins de 7000 résultats.

Ces cinq dernières années, nous nous sommes intéressés à une plante de grandes cultures en particulier : la chicorée à inuline (*Cichorium intybus* var. *sativum*). La chicorée est une plante bisannuelle cultivée chez nous pour sa racine depuis la fin des années 1980. Le but est d'en extraire une chaîne de sucres : l'inuline. Dans le passé, la chicorée était déjà cultivée chez nous pour sa racine dans le but de la torréfier et de servir de substitut au café.

Si la superficie réservée à cette culture ne représente que 1% des emblavements en Belgique en 2010 (8.027 ha cultivés pour 387.246 tonnes produites soit 48T/ha)², notre pays est toutefois le leader mondial pour cette spéculation. En termes de production, les quatre plus grands producteurs mondiaux de chicorée sont la Belgique, suivie des Pays-Bas, du Chili et de la France. Les différents sites de statistiques nationales nous informent qu'aux Pays-Bas, la production de chicorée en 2010 s'élevait à 187.640 T sur 4.691 ha (soit 40 T/ha)³, au Chili la production en 2010 était de 157.292 T sur 2.861 ha (soit 55 T/ha)⁴ et enfin en France la production était de 106.376 T sur 2.425 ha (soit 44 T/ha)⁵. Le site de statistiques de la FAO⁶ nous apprend encore que des pays tels que la Pologne ou l'Afrique du Sud produisent également quelques dizaines de milliers de tonnes de chicorée par an ; en 2010 respectivement 28.313 T en Pologne et 16.000 T en Afrique du Sud. En ne tenant compte que des 4 plus gros producteurs, nous constatons que 46% de la production mondiale de chicorée est réalisée en Belgique ce qui justifie clairement la nécessité de nous y intéresser ! En 2010, 1.2% des emblavements belges de chicorée étaient encore destinés à la production de succédané au café (100 ha)⁷.

La production d'inuline présente un potentiel d'expansion certain de par les vertus médicales attribuées à l'inuline. L'inuline est en effet un composé prébiotique qui améliore la santé intestinale, notamment en stimulant sa flore. La demande pour ce type de composé était croissante jusqu'à la crise de 2008. Depuis lors, la demande pour ce produit reste stable mais n'augmente plus ; ceci s'expliquant facilement par le fait qu'il ne s'agisse pas d'un aliment de première nécessité (Dielen, communication personnelle). La Belgique étant en outre le leader mondial de cette

² www.statbel.fgov.be, le 31 mars 2012

³ www.cbs.nl, le 2 avril 2012

⁴ www.ine.cl, le 2 avril 2012

⁵ www.agreste.agriculture.gouv.fr, le 2 avril 2012

⁶ www.faostat.fao.org, le 2 avril 2012

⁷ www.statbel.fgov.be, le 31 mars 2012

production, cela justifie pleinement que nous nous intéressions au comportement et au destin de cette plante, non seulement en relation avec les conséquences possibles des changements climatiques mais aussi et surtout au regard de son itinéraire technique en général. Cette plante n'étant produite pour l'inuline que depuis une trentaine d'années, certaines de ses réactions restent à comprendre et certains aspects de son itinéraire technique sont encore à améliorer.

Dans la littérature disponible actuellement, il apparaît que quelques études se sont déjà intéressées à l'impact de la sécheresse sur le rendement et la physiologie de la plante (Schittenhelm, 1999 ; De Roover *et al*, 2000 ; Skinner *et al*, 2004 ; Monti *et al*, 2005). Les recherches portant sur l'engorgement du substrat sont quant à elles inexistantes. Les travaux menés dans le cadre de cette thèse permettront donc d'approfondir les connaissances relatives à la sécheresse et de comprendre les conséquences de l'hypoxie pour la culture.

Afin de comprendre la problématique dans son ensemble et savoir comment les aspects de croissance ou de physiologie sont affectés par les stress abiotiques mentionnés, outre une étude physiologique générale, nous focaliserons également notre attention sur les mécanismes se déroulant dans le sol. Nous suivrons dans ce cadre la croissance racinaire mais aussi la dynamique de la prise d'eau par la plante. Le côté innovant de cette étude dans le cadre de la sécheresse est de suivre comment la plante réagit non seulement au niveau de sa physiologie et de son rendement mais aussi du côté de sa croissance racinaire et de sa prise d'eau.

Organisation de la thèse et objectifs

Dans l'optique de comprendre les conséquences possibles des changements climatiques, d'essayer d'améliorer l'itinéraire technique de la culture, voire d'envisager son expansion à d'autres régions du globe, l'objectif de nos recherches sera de comprendre l'impact des conditions hydriques du sol sur la physiologie et le rendement de la chicorée à inuline. Si quelques études relatives aux impacts des stress abiotiques sur la physiologie de la chicorée existent déjà, nous verrons par la suite que l'intensité du stress n'y est pas toujours bien définie. Nous chercherons donc dans ce travail à quantifier clairement l'intensité de nos stress ainsi que les réactions de la plante.

En particulier, nous souhaitons savoir quelles seront les conséquences sur la physiologie et le rendement en inuline d'un manque d'eau prolongé ou d'un excès d'eau intermittent. A cette fin, deux études seront menées en conditions contrôlées sur des colonnes de sol de 55 cm de hauteur et 25 cm de diamètre. La première traitera de l'impact d'un manque d'eau prolongé, la seconde d'un engorgement intermittent du substrat, toutes deux menées pour comprendre l'impact de ces stress abiotiques sur le rendement et la physiologie de la plante.

Ensuite, l'impact du stress hydrique sera étudié dans des conditions plus proches de la réalité sur des plantes se développant dans des volumes de sol beaucoup plus importants (colonnes de sol de 142 cm de hauteur et 40 cm de diamètre). La question sera d'étudier comment la plante réagit en termes de prise d'eau et de croissance racinaire en situation de stress. Afin d'y parvenir, nous suivrons l'évolution de la croissance racinaire et mettrons en œuvre deux techniques de mesure de la teneur en eau du sol : le TDR (Time Domain Reflectometry) et l'ERT (Electrical Resistance Tomography). Ces techniques nous permettront d'investiguer comment la distribution spatiale de l'eau dans le sol et l'irrigation affectent la racine. Les résultats des mesures seront ensuite introduits dans des modèles permettant de simuler la prise d'eau par la plante pour chaque condition d'humidité du substrat. Que ce soit pour la chicorée ou l'ensemble des plantes, cette approche intégrée utilisant des techniques géophysiques est assez novatrice.

Ce document se compose de six chapitres principaux. Il débutera par une revue bibliographique des connaissances relatives aux conséquences de la sécheresse et de l'engorgement du substrat sur les végétaux. Nous développerons ensuite les aspects relatifs à la chicorée à inuline en particulier. Nous décrirons la plante en détails et verrons quelles étaient et

quelles sont ses utilisations possibles. Pour terminer cette revue bibliographique, nous développerons les connaissances actuelles sur l'inuline et présenterons ce qui est connu au niveau des impacts de la sécheresse et de l'engorgement du substrat sur la physiologie de la plante et son rendement.

La seconde grande partie (Chapitre 1) présentera les résultats d'une étude réalisée en conditions d'environnement contrôlées sur des plantes cultivées dans des colonnes de sol de 55 cm de hauteur et 25 cm de diamètre. Ce travail visait à comprendre l'impact d'un manque d'eau prolongé sur la physiologie et le rendement de la chicorée à inuline, tant en termes de rendement que d'efficacité photosynthétique et d'activités enzymatiques liées à la production de sucres. Cette étude couvre donc principalement les relations 1, 2 et 3 reprises sur la figure 22 par après.

Le troisième volet (Chapitre 2) traitera des résultats de la modélisation de la prise d'eau par la plante en conditions de sécheresse. Cette recherche réalisée en conditions d'environnement contrôlées sur de grandes colonnes de sol (142 cm de hauteur et 40 cm de diamètre) utilise des séries temporelles de teneur en eau du substrat obtenues au moyen de sondes TDR (Time Domain Reflectometry). L'utilisation de grandes colonnes permet d'étudier plus spécifiquement le phénomène de « compensation ». Quels sont les mécanismes qui permettent de compenser le manque d'eau en certaines profondeurs du substrat ?

A partir des mesures de teneur en eau du sol, par modélisation inverse, nous chercherons à suivre l'évolution de la prise d'eau racinaire en fonction de l'irrigation. Ce troisième volet traite donc principalement de la relation 4 de la figure 22. Des compléments d'information aux relations 1, 2 et 3 (Fig. 22) seront également fournis.

Dans un quatrième temps (Chapitre 3), nous étudierons l'impact de deux traitements d'apports d'eau contrastés sur la dynamique de la prise d'eau racinaire de la plante sur les grandes colonnes de sol. La grande différence avec l'expérience précédente est que le suivi de la teneur en eau se fera cette fois dans les 3 dimensions de l'espace, et plus seulement en fonction de la profondeur. Pour ce faire, nous utiliserons l'ERT (Electrical Resistance Tomography). Cette technique permet de visualiser en 3 dimensions la conductivité électrique du sol. Nous chercherons à savoir s'il est possible d'en déduire la teneur en eau du sol dans nos colonnes. Si c'est le cas, est-il possible de suivre également la prise d'eau par la plante ? Les objectifs traités sont comparables à ceux du chapitre 2.

Nous clôturerons la partie expérimentale de ce document (Chapitre 4) en présentant les résultats d'une étude traitant de l'impact d'un engorgement prolongé (2 à 3 semaines) et intermittent (avec des périodes de « repos ») du substrat sur la physiologie (activités photosynthétiques et enzymatiques) et le rendement de la chicorée à inuline. Comme pour le chapitre 1, ces recherches ont été réalisées en conditions d'environnement contrôlées pour des plantes cultivées dans des colonnes de 55 cm de hauteur et 25 cm de diamètre. Tout comme pour le chapitre 1 également, les principaux objectifs traités ici seront les relations 1, 2 et 3 de la figure 22.

Pour terminer (Discussion générale, conclusions et perspectives), nous discuterons l'ensemble des résultats obtenus dans les 4 chapitres précédents et établirons les pistes à explorer à l'avenir. Au regard de ce qui aura été observé, nous tenterons de tirer des enseignements pratiques pour les industriels et agriculteurs.

Revue bibliographique

1. Mise en contexte

Crise du lait, hausse du prix des matières premières, incendie des champs de blé en Russie, réforme de la Politique Agricole Commune,... Ces dernières années, les grands titres de l'actualité mettant en avant la fragilité et l'instabilité du secteur agricole ne manquent pas.

Malgré toutes ces crises et ces pressions, l'agriculture mondiale se doit de résister et de se développer en vue de nourrir une population sans cesse croissante. Sur une base mondiale, les experts de la FAO estiment qu'il sera possible annuellement, et sauf évènement exceptionnel, d'accroître la production agricole de 1,7% jusque 2020. Dans le même temps, selon un scénario moyen, les Nations Unies estiment que la population mondiale devrait croître de 1,65% annuellement pour atteindre approximativement 8 milliards d'individus en 2020. Jusque-là, sauf catastrophe, les besoins mondiaux doivent donc pouvoir être remplis.

Par la suite, avec une population prévue de 9.2 milliards de personnes en 2050, les besoins en investissements pour le développement de l'agriculture resteront particulièrement importants. En octobre 2009, un forum d'experts a eu lieu sur le thème : « *Comment nourrir le monde en 2050* » ? Il en ressort que d'ici à 2050, il faudra faire progresser la production agricole mondiale de 70%. En vue d'y arriver, les spécialistes ont insisté sur la nécessité d'investissements massifs en agriculture afin d'améliorer les pratiques et rendements.

Au sein des modèles visant à évaluer l'aptitude de l'agriculture à nourrir la population mondiale dans les années à venir, une grande incertitude provient des effets des changements climatiques actuels et à venir. Dans son quatrième rapport d'évaluation (2007), le GIEC (Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat) fournit différents scénarii d'évolution possible de notre climat en fonction notamment de l'évolution des émissions de gaz à effet de serre. Des scientifiques comme Lee (2009) ou Parry *et al.* (2004) ont utilisé les données de ces scénarii en vue de prédire l'évolution des rendements et des prix agricoles. Selon eux, si les changements climatiques pourraient dans un premier temps profiter aux pays développés situés en général dans les hautes latitudes du globe, les pays en développement, situés pour la plupart dans les basses latitudes, devraient quant à eux souffrir très rapidement de ces changements de climat accompagnés d'une pollution importante de l'air (ozone et particules

finies par exemple). Au-delà d'une augmentation de température de 2°C, des réductions de rendement sont attendues dans tous les pays du globe. Cette réduction sera due non seulement à l'augmentation de température, mais aussi à la récurrence accrue de longues périodes de sécheresse ou autres aléas climatiques tels que les orages violents et tempêtes.

Il est important de préciser que notre étude ne s'intéressera pas à la situation agricole mondiale ni à tous les impacts possibles des changements climatiques. Nous nous intéresserons plutôt à ce qui se passe pour une plante de grandes cultures importante en Belgique : la chicorée à inuline. Si cette spéculation ne représente que 1% des emblavements des terres de culture en Belgique⁸, il reste toutefois important de comprendre comment la chicorée se comporte en cas de changements climatiques. En effet, cette dernière est très importante chez nous car nous sommes les leaders mondiaux pour sa production. Il est donc important pour nous de savoir comment cette culture peut évoluer en fonction de changements dans son environnement. De plus, cette plante pourrait avoir mis en place des mécanismes particuliers potentiellement intéressants à transposer pour d'autres plantes de grandes cultures. A l'inverse, la chicorée pourrait se montrer particulièrement sensible aux conditions environnementales, auquel cas il est important de comprendre pourquoi elle se comporte de la sorte. Pourrons-nous la maintenir dans nos rotations à l'avenir ? Y-a-t-il lieu d'en modifier ou d'en améliorer l'itinéraire technique ? Cette recherche s'inscrit donc dans le cadre général des recherches en agriculture, à la frontière entre agriculture et environnement.

⁸ www.statbel.fgov.be, le 31 mars 2012

2. Impacts du manque et de l'excès d'eau sur nos cultures:

2.1 Préambule relatif à la notion de tolérance au stress

Dans les paragraphes ci-après et tout au long de notre travail, nous allons étudier les conséquences de stress abiotiques sur des plantes de grandes cultures. En particulier, nous étudierons l'impact du manque d'eau et de l'excès d'eau sur la chicorée à inuline.

Il convient pour y parvenir de définir clairement ce que nous entendons par le stress et la tolérance au stress.

Un stress abiotique est une contrainte de l'environnement qui aura des conséquences sur la plante. Nous pensons ici par exemple à la sécheresse, l'engorgement du substrat mais aussi au stress salin, à la chaleur et bien d'autres.

Les biologistes considèrent qu'une plante est tolérante au stress si elle parvient à survivre et surtout à boucler son cycle. La plante tolère le stress si elle est capable de produire des graines et laisser une descendance.

En agronomie, la notion de tolérance est vue différemment. Les agronomes considéreront qu'une plante est tolérante au stress si malgré la contrainte elle est capable de maintenir son rendement ; en grains s'il s'agit du blé, en masse racinaire et en sucres lorsqu'il s'agit de la chicorée.

Travaillant sur une plante de grandes cultures, il nous faudra donc discuter de nos résultats et des réactions de la plante au regard de la notion de tolérance au stress des agronomes.

2.2 La sécheresse

2.2.1 Introduction

La sécheresse est l'une des contraintes environnementales majeures conduisant à une réduction de la photosynthèse, de la respiration et par conséquent de la croissance des plantes (Flexas *et al.*, 2006). La perte de rendement qui en découle peut menacer fortement la productivité agricole et donc influencer sur la volatilité des prix comme évoqué précédemment (www.fao.org, le 26 décembre 2011).

Les plantes subissent un stress hydrique lorsque la consommation et la perte d'eau excèdent les apports. Cette situation se présente lors de périodes de sécheresse, alors que l'eau fait défaut, ou de stress salin, alors que l'eau est présente mais peu disponible pour des raisons osmotiques (Steudle, 2000). Un stress hydrique peut également se produire lorsque des conditions particulières de l'environnement ont pour effet de stimuler la transpiration, par exemple en condition de vent important ou en cas d'humidité relative de l'air très faible (Hanson, 1991 ; Reddy *et al.*, 2004 ; Lafitte *et al.*, 2006) .

Ces conditions coïncident souvent avec celles qui prévalent en climats arides et semi-arides mais il arrive aussi qu'un stress hydrique intervienne chez nous en période estivale. Selon le quatrième rapport du GIEC (2007), les périodes de sécheresses estivales en Europe de l'Ouest devraient d'ailleurs devenir de plus en plus fréquentes et longues à l'avenir.

2.2.2 Importance économique

Si jusqu'au début des années 2000, la notion de sécheresse en Europe de l'Ouest se limitait principalement à un vague souvenir de la terrible année 1976. 2003, 2005 et 2006 nous ont rappelé ce que ce terme signifiait. Une étude réalisée en France (Debaeke & Bertrand, 2008) nous apprend que pour ces 4 années, la majorité des régions françaises a été touchée par un déficit pluviométrique (déficit = pluie - évapotranspiration potentielle). La sécheresse de 1976 est cependant la seule à avoir touché réellement toutes les régions de France de manière importante.

Suite à ces sécheresses, les statistiques agronomiques montrent que les pertes de rendement en céréales vont de 7 à 20%. Les pertes de rendement en pommes de terre montaient quant à elles jusqu'à 38% en 1976 (Debaeke & Bertrand, 2008).

D'un point de vue économique, la transposition des pertes de rendement moyenne en France en 2003 (15% en céréales et 6% en betteraves) sur une rotation triennale typique en Wallonie : betteraves, froment, escourgeon, entraîne une perte moyenne à l'hectare d'environ 170€ (Chiffres de rendements et de prix venant de <http://epp.eurostat.ec.europa.eu> et <http://statbel.fgov.be>). Il est toutefois important de signaler que l'exercice réalisé ici est trop simpliste. Une analyse régionale est en effet nécessaire lorsque les impacts climatiques sont évoqués. Ce calcul permet toutefois de rendre compte des conséquences économiques de la sécheresse dans nos régions, sur nos plantes de grandes cultures réputées assez sensibles aux aléas du climat.

Dans leur quatrième rapport (2007), les experts du GIEC tentent de chiffrer les conséquences économiques que les changements climatiques ont et auront (<http://www.ipcc.ch>, le 9 mai 2012). Ils estiment que sur une base mondiale, une augmentation de température de 4°C entraînera des pertes moyennes dans les produits nationaux bruts (PNB) de 1 à 5%. Ils insistent toutefois sur le fait que de telles estimations sont particulièrement délicates. La situation pourra en effet être très différente d'une région à l'autre.

2.2.3 Impacts sur les plantes

2.2.3.1 Généralités

Voici, résumées en un schéma (Figure 1), quelques voies de réponse des plantes au stress hydrique. Quelques-unes de ces réponses physiologiques, biochimiques et moléculaires seront développées dans les points suivants.

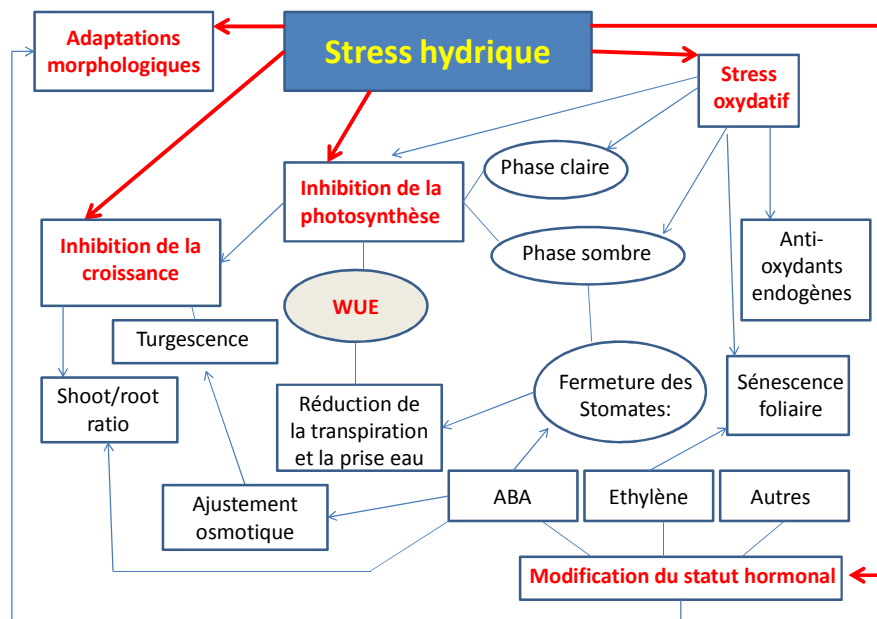


Figure 1 : Schéma des principales conséquences du stress hydrique.

2.2.3.2 La croissance

La croissance est l'un des facteurs particulièrement affecté en cas de manque d'eau. La croissance racinaire des plantes subissant un manque d'eau étant bien souvent moins affectée que celle des parties aériennes. En

effet, le rapport partie aérienne/partie racinaire diminue souvent en cas de déficit en eau. Cette diminution provoque une réduction de l'absorption de l'eau et des sels minéraux (Kramer and Boyer, 1995).

Cette croissance réduite s'explique par la réduction du taux de division cellulaire et/ou par la diminution des taux d'élongation (Coleman, 2008). A ce niveau, l'importance de la régulation des processus de turgescence ainsi que la modification éventuelle des propriétés pariétales sont à étudier (Taiz and Zaiger, 2007). Certaines plantes peuvent en effet modifier les propriétés de leurs parois cellulaires en vue de maintenir des taux d'élongation acceptables ou d'éviter des pertes de turgescence. Ces modifications sont souvent localisées (Moore *et al.*, 2008). La paroi est par exemple rendue plus élastique au niveau de tissus jeunes nécessitant de pouvoir poursuivre leur croissance ou de profiter rapidement de nouveaux apports d'eau (cas de l'apex racinaire). Au contraire, au niveau de tissus plus vieux et non essentiels à la survie de la plante (zone d'élongation racinaire), la paroi se fige suite à l'accumulation de composés phénoliques et de lignine (Moore *et al.*, 2008). Ceci permet par exemple de maintenir le port dressé chez certaines plantes.

2.2.3.3 La prise d'eau

La prise d'eau racinaire est un phénomène complexe dépendant des conditions de sol, des conditions physiologiques des plantes étudiées mais aussi des conditions climatiques (Gong *et al.*, 2006). Des études ont montré que dans un sol bien fourni en eau et présentant un profil de structure et d'humidité uniformes, la solution est extraite proportionnellement à la densité racinaire des plantes (Janz and Stonier, 1995 : 40% de la quantité extraite venant du quart supérieur du système racinaire). Lorsque les horizons supérieurs s'assèchent, la transpiration reste dans un premier temps à son niveau maximal avant que les stomates ne se ferment. Afin de maintenir leur flux transpiratoire, les plantes n'ont pas le temps de modifier leur profil racinaire et vont donc chercher l'eau dans les horizons plus profonds moins fournis en racines (Arya *et al.*, 1975a, b ; Nnyamah and Black, 1977 ; Janz and Stonier, 1995 ; Schneider *et al.*, 2010). Une autre solution permettant à la plante de maintenir sa prise d'eau provient de la redistribution hydraulique (Schneider *et al.*, 2010). Cette redistribution d'eau des horizons plus profonds vers les horizons superficiels se fait non seulement via le sol lui-même mais aussi via les racines (Schneider *et al.*, 2010).

Il a aussi été montré que les plantes souffrant d'un manque d'eau prolongé sont sujettes à des réductions de perméabilité racinaire limitant la prise d'eau. Même après réhydratation de leur substrat ces modifications de perméabilité peuvent persister pour quelques jours (Kramer, 1983 ; Moore *et al.*, 2008).

Si certaines plantes annuelles évitent les problèmes liés au manque d'eau en réalisant leur cycle complet avant les soucis de sécheresse (Cooper, 1963 ; Reitz, 1974), d'autres ont besoin de pouvoir tolérer les périodes de manque d'eau. Une des façons pour y arriver est d'adapter leur croissance racinaire en vue d'améliorer la prospection du sol, que ce soit latéralement ou surtout en profondeur et ainsi préserver la prise d'eau (Hurd, 1974 ; Boyer, 1983 ; Kramer, 1983 ; Schneider *et al.*, 2010). Depuis des années, les sélectionneurs cherchent à diriger leurs recherches vers des plantes ayant la meilleure efficacité d'utilisation d'eau possible.

2.2.3.4 Adaptations morphologiques

Outre les grandes adaptations déjà mentionnées, les plantes présentent de multiples réactions face au stress hydrique. Certaines ont développé par exemple des mécanismes de succulence des feuilles ou de pilosité au niveau des stomates (Kinet & Lutts, 2003). La succulence consiste en une modification de la teneur en eau par rapport à la surface foliaire. Ceci permet d'assurer une meilleure gestion du statut hydrique des feuilles à condition que la densité stomatique ne soit pas modifiée (Kinet & Lutts, 1998 ; Lutts & Batoko, 2007). La succulence est un phénomène observé principalement chez les plantes des déserts. Toutefois ce mécanisme a déjà pu être observé chez le colza en conditions de sécheresse (Mogensen *et al.*, 1997) ainsi que chez l'orge en conditions de salinité (Hassani *et al.*, 2008). Chez ces plantes, la succulence fait partie des mécanismes participant à la tolérance des plantes au stress et au maintien de leur rendement.

Outre les mécanismes de résistance déjà évoqués, certaines plantes mettent en place des mécanismes d'évitement. Ces derniers consistent par exemple en une modification de l'allocation de sucres. Cette modification privilégie l'alimentation des racines en vue de prospecter le sol à la recherche d'humidité. Une réduction de la surface foliaire permet également d'éviter le stress hydrique en diminuant la transpiration (Guo *et al.*, 2007).

Une autre stratégie d'adaptation morphologique constatée chez une plante cultivée est l'enroulement des feuilles. Cette stratégie est observée chez le maïs. En enroulant d'avantage leurs feuilles, certaines variétés de maïs sont capables de mieux tolérer des périodes de manque d'eau et ainsi maintenir

leur rendement. Ceci s'explique par le fait qu'en enroulant ses feuilles en période de sécheresse, le maïs réduit la surface en contact avec l'atmosphère et donc sa transpiration. Les variétés capables de faire cela présentent donc une meilleure capacité à gérer le stock d'eau disponible (Shisanya & Hornetz, 1997).

Il est à noter également que le stress hydrique retarde la floraison chez certaines espèces et, plus rarement, l'accélère chez d'autres (Kinet & Lutts, 1998). Il importe en outre de souligner que de nombreuses « cibles » du stress hydrique (modification des teneurs en sucres ou en régulateurs de croissance) peuvent avoir un impact sur l'induction des processus de floraison.

De nombreuses autres voies et composés peuvent intervenir et ceux cités ne constituent parfois que le départ d'une chaîne de réactions. Il apparaît clairement que de multiples facteurs interviennent et interagissent lors de la réponse aux stress (figure 1) et il n'est ni facile, ni toujours opportun de les isoler les uns des autres. Enfin, si, comme c'est souvent le cas en condition de champ, les stress ne sont pas permanents, la situation d'après-stress est elle aussi parfois physiologiquement délicate à gérer et à comprendre (Rouhi *et al.*, 2007 ; Georgieva *et al.*, 2007).

2.2.3.5 Métabolisme des sucres, photosynthèse et échanges gazeux

Il a été montré dans de nombreuses études qu'en règle générale, la sécheresse entraîne une réduction du contenu en amidon dans les plantes et parfois une augmentation des concentrations en sucres libres (Kramer, 1983). Il est toutefois difficile d'étudier le métabolisme des sucres seul, sans comprendre ce qui se passe au niveau des échanges gazeux et de la photosynthèse. Des modifications dans les échanges ou dans les taux de photosynthèse entraîneront en effet des adaptations du métabolisme des sucres par effet feed-back.

En cas d'un stress hydrique, la plante réagit la plupart du temps en fermant ses stomates en vue de réduire les pertes en eau. Cette fermeture limite aussi les échanges gazeux, l'entrée de CO₂ et par conséquent la production de métabolites et la croissance de la plante. Des études ont montré que le signal venant des racines vers les feuilles pour prévenir les pertes en eau et induire la fermeture des stomates est principalement l'acide abscissique (ABA). L'ABA monte des racines vers les feuilles en empruntant le flux

transpiratoire et induit la fermeture des stomates à son arrivée dans la feuille (Reddy *et al.*, 2004 ; Galmés *et al.*, 2007).

En stress hydrique, d'autres causes majeures de la réduction de photosynthèse sont la réduction des teneurs en métabolites impliqués dans le cycle de Calvin (Haupt-Herting and Fock, 2002), l'augmentation des teneurs en fructose 2,6-bisphosphate (Villadsen *et al.*, 2005), l'altération du translocateur-phosphate (Xue *et al.*, 2008) ou encore la réduction d'activité d'enzymes intervenant dans le cycle du carbone comme la Rubisco (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) (Parry *et al.*, 2002).

La réduction de photosynthèse peut aussi s'expliquer par la production de radicaux libres comme nous le verrons ci-dessous (Lefevre, 2007). L'altération des structures chloroplastiques par les radicaux libres produits lors de stress peut être à l'origine d'une réduction des teneurs en chlorophylles des chloroplastes et dégraderait les membranes thylakoïdiennes impliquées dans le flux d'électrons de la photosynthèse (Zhou *et al.*, 2007). L'efficacité de la phase claire de la photosynthèse peut être évaluée en suivant l'évolution de la fluorescence de la chlorophylle.

Le principe de la mesure de la fluorescence de la chlorophylle est assez simple. L'énergie lumineuse absorbée par les pigments de chlorophylle d'une feuille peut avoir trois destinées :

- Utilisation pour la photosynthèse. L'énergie lumineuse est alors convertie sous forme chimique dans la plante en ATP et NADPH, ces composés servant notamment à la synthèse d'hydrates de carbone dans le cycle de Calvin.
- Dissipation sous forme de chaleur. L'excès d'énergie lumineuse absorbée par la chlorophylle peut être dissipé sous forme de chaleur.
- Réémission sous forme de lumière. L'excès d'énergie lumineuse incidente peut également être réémis sous forme de lumière, c'est la fluorescence de la chlorophylle.

Cela signifie que si nous mesurons la quantité de lumière réémise par fluorescence de la chlorophylle et que nous connaissons la quantité totale d'énergie envoyée sur la feuille, cela donne des informations intéressantes au sujet de la photosynthèse et de la dissipation d'énergie sous forme de chaleur. En outre, la lumière fluorescente ayant une plus grande longueur d'onde que la lumière absorbée par la plante, il est aisé de différencier les deux (Maxwell & Johnson, 2000). Des mesures de fluorescence de la chlorophylle sont de plus en plus utilisées en vue de juger de l'état des

photosystèmes et de la photosynthèse et d'évaluer l'impact de stress biotiques ou abiotiques (Nebdal and Whitmarsh, 2004).

Il est à noter qu'une réduction de croissance de la plante ne doit pas nécessairement être directement liée à une réduction de photosynthèse. Cette observation sera particulièrement intéressante par la suite lors de l'étude des concentrations en sucres mesurées chez des plantes stressées hydriquement. En effet, plusieurs études (Haupt-Herting et Fock, 2002 ; Georgieva *et al.*, 2007 ; Rouhi *et al.*, 2007 ; Muller *et al.*, 2011) ont déjà montré que la réduction de croissance s'observe avant la réduction de photosynthèse si bien qu'une hypothèse permettant d'expliquer la réduction d'activité photosynthétique serait l'accumulation de sucres dans la plante. Cette réduction de photosynthèse s'opère alors par effet « feed-back » suite à l'accumulation des sucres.

2.2.3.6 Le statut hydrique et l'ajustement osmotique

Un effet bien connu du stress hydrique et de la sécheresse concerne la modification du statut hydrique des plantes. En effet, une conséquence souvent immédiate du stress hydrique est la perte de turgescence des tissus. Un ajustement osmotique permet de limiter cette perte de turgescence mais n'empêche pas nécessairement une diminution de la croissance, surtout s'il fait appel à la production et l'accumulation de métabolites organiques dont la synthèse a un coût (Bacelar *et al.*, 2007 ; Turner *et al.*, 2007).

L'ajustement osmotique consiste en une réduction du potentiel osmotique cellulaire permettant à la plante de maintenir l'approvisionnement en eau dans la cellule et ainsi limiter les pertes de turgescence. Ce processus se fait par l'accumulation de K^+ , de proline, de glycine ou encore de glycinebétaine mais aussi de saccharose et autres sucres non réducteurs (Kinet & Lutts, 1998). Certains glucides pourront par exemple intervenir au niveau membranaire en vue de protéger la plante soumise à une déshydratation prononcée. Cette protection se fait via les groupements hydroxyles des glucides qui vont remplacer l'eau en interagissant avec les pôles hydrophiles des phospholipides membranaires (Hoekstra *et al.*, 2001). La proline, outre l'ajustement osmotique, a aussi pour rôle de protéger les membranes et les protéines lorsque le contenu en eau de la plante diminue. Il est possible de parler de synthèse mais aussi de non dégradation (enzyme inactive) de la proline pour expliquer son accumulation en cas de stress hydrique (Reddy *et al.*, 2004 ; Monreal *et al.*, 2007).

De manière générale, les composés cités ci-dessus sont accumulés dans le cytosol ou les chloroplastes des cellules (Reddy *et al.*, 2004). Malgré les bénéfices mentionnés pour la plante, l'ajustement osmotique présente un « coût métabolique » car les composés stockés ne peuvent être utilisés à d'autres fins (Wu *et al.*, 2008). Cet ajustement osmotique se fait donc fréquemment au détriment de la croissance de la plante (Delpérée *et al.*, 2003). Certaines études réalisées sur différentes variétés de blés durs montrent cependant que les variétés présentant la meilleure tolérance à la sécheresse et maintenant le mieux leur rendement en cas de sécheresse sont celles réalisant les ajustements osmotiques les plus importants (Kara & Zoghmar, 2011).

Une classe de protéines membranaires bien connues et permettant d'aider au maintien du statut hydrique des plantes sont les aquaporines. Ces protéines forment des pores dans les membranes permettant le passage de l'eau et quelques solutés à travers celles-ci. 4 grandes familles d'aquaporines ont été identifiées jusqu'ici ; il s'agit des PIP propres aux membranes, des TIP propres au tonoplaste, des NIP propres aux nodules et enfin des SIP qui sont les protéines intrinsèques de base. Certains auteurs parent également des SIP qui sont des protéines intrinsèques pas encore caractérisées.

Par leur régulation, les aquaporines permettent d'accélérer les flux symplastiques d'eau mais aussi de conserver l'eau en certains endroits lorsqu'elles se ferment. En cas de sécheresse, les aquaporines se ferment en vue de préserver la réserve d'eau dans les cellules. Cela se fait grâce à la déphosphorylation de certains résidus sérine de la protéine. Les aquaporines ne sont pas mises à contribution dans la plante uniquement dans le cadre des mouvements d'eau. Elles interviennent également dans certaines fonctions physiologiques telles que le passage de nutriments, la signalisation intercellulaire et les mouvements des feuilles (Aroca *et al.*, 2012).

2.2.3.7 Le stress oxydatif

Comme évoqué précédemment, dans le cas du stress hydrique, la réduction de photosynthèse crée un déséquilibre entre la production et l'utilisation d'électrons au niveau du photosystème II. La lumière incidente permet à la plante de générer des électrons libres mais la réduction de photosynthèse empêche leur utilisation. L'énergie lumineuse excédentaire se présentant sous la forme d'électrons libres, est dissipée par la formation de composés d'oxygène actif ($\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$, H_2O_2 ,...) particulièrement toxiques (Yesbergenova *et al.*, 2005 ; Bacelar *et al.*, 2007). La majorité des stress physiologiques

végétaux s'accompagnent de perturbations de la photosynthèse et la production de radicaux libres est donc particulièrement fréquente.

Les radicaux créés ont tendance à endommager les protéines, l'ADN et les membranes mettant en péril l'intégrité physiologique de la plante. Cette dernière se protège contre ces composés en faisant intervenir des enzymes (Figure 2) dont le rôle est de les détoxifier (Kotchoni *et al.*, 2006 ; Bacelar *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2007). Il s'agit notamment des superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), de la glutathion peroxydase (GSH-peroxydase ; EC 1.11.1.9), de la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6), des ascorbates peroxydases (AP ; EC 1.11.1.11), de la glutathion reductase (GR ; EC 1.8.1.7), de la dehydroascorbate reductase (DHAR ; EC 1.8.5.1) et de la monodehydroascorbate reductase (MDHAR ; EC 1.6.5.4).

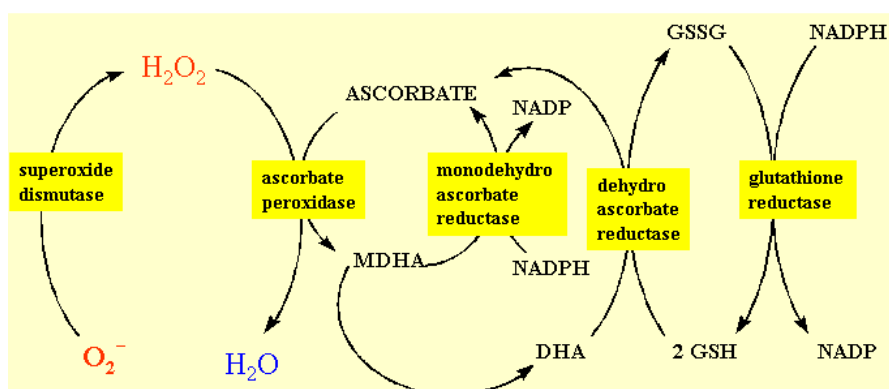


Figure 2: Schéma ASADA reprennant quelques-unes des enzymes citées (<http://www.biotagr.unipd.it/persona/masi/ricerca.html>; le 3 avril 2012).

Outre les symptômes déjà mentionnés, ce stress oxydatif peut également conduire à une réduction caractéristique des teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylles a, b et caroténoïdes totaux).

Le fait que la synthèse de radicaux hydroxyles, d'ions superoxydes ou de peroxyde d'hydrogène soit une réponse très fréquente en cas de stress chez les plantes (Munné-Bosch & Lalueza, 2007 ; Kotchoni *et al.*, 2006) a poussé les physiologistes à supposer que ces composés interviennent dans la perception du stress et dans les premiers mécanismes de réaction.

2.2.3.8 Relations hormonales

L'ETHYLENE :

L'éthylène est produit en réponse à de multiples stress physiologiques, notamment le stress hydrique mais également le flooding. Cette hormone gazeuse est impliquée dans un grand nombre de réactions et de processus physiologiques, depuis la levée de la dormance des graines à la maturation des fruits climatiques. Si ses mécanismes d'action ne sont pas encore totalement élucidés, il s'avère par contre que ses actions sont multiples : l'éthylène induit une réduction d'élongation cellulaire, de la teneur en phospholipides membranaires, de la teneur en chlorophylles,... L'éthylène agit également directement sur les protéines kinases, composés impliqués dans les signaux de transduction qui permettent aux tissus de répondre à l'éthylène surproduit. Au même titre que la majorité des régulateurs de croissance (sinon tous), l'éthylène peut également induire l'expression d'un certain nombre de gènes (Druege, 2006). Chez les plantes terrestres, l'éthylène est « l'hormone de sénescence » par excellence : c'est elle qui est impliquée dans les processus d'abscission foliaire. Une surproduction d'éthylène au départ de son précurseur, l'acide aminocyclopropane carboxylique, s'accompagne d'une inhibition de la photosynthèse, d'une altération des structures cellulaires et de nombreuses modifications qui conduisent à la mort cellulaire (Schachtman et Goodger, 2008).

L'ACIDE ABSCISSIQUE (ABA) :

En cas de stress hydrique, une réaction caractéristique est la synthèse accrue d'acide abscissique : ABA. Il semblerait même qu'éthylène et ABA agiraient conjointement en réponse au stress hydrique (Grossmann et Hansen, 2001 ; Yang *et al.*, 2004 ; Poroyko *et al.*, 2007 ; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). L'ABA a un effet bien connu de fermeture des stomates comme mentionné précédemment. Il a aussi pour effet de réduire la croissance, d'augmenter la conductivité hydrique des racines (Kudoyarova *et al.*, 2011). Incontestablement, les fonctions de l'ABA en réponse au stress sont bien plus complexes que sa seule action sur la conductance stomatique. Depuis une dizaine d'années ; son implication dans l'expression de très nombreux gènes induits par des conditions de stress, tant biotiques qu'abiotiques, suscite l'intérêt de la communauté scientifique (Duan *et al.*, 2007). Des études ont montré que l'ABA agit principalement par l'activation d'un type de promoteur de gène très fréquemment présent dans le génome des plantes et portant des éléments ABRE (Abscisc Acid Responsive Element). L'activation de ces éléments par l'ABA induirait la production de protéines impliquées dans la réaction au stress. Il s'agit de protéines auxquelles des fonctions de protection sont

attribuées, telles les LEA (Late Embryogenesis Abundant) et les déhydrines (Liu *et al.*, 1998 ; Bray, 2002 ; Kizis et Pagès, 2002 ; Kawaguchi *et al.*, 2004). La biochimie de l'ABA, et en particulier sa conjugaison réversible avec d'autres composés, a fait l'objet de multiples études (Hansen et Dörffling, 1999). De même, les principaux récepteurs impliqués dans la perception de l'ABA retiennent l'attention de nombreuses équipes (Raghavendra *et al.*, 2010). L'ABA pourrait conditionner les taux de divisions cellulaires en interagissant directement avec les microtubules du fuseau mitotique (Lü *et al.*, 2007) mais il interviendrait également dans les processus de tolérance à la dessiccation (Beckett *et al.*, 2005 ; Kondo *et al.*, 2012). Des interactions entre l'ABA et le glutathion ont été mentionnées pour expliquer l'effet de l'hormone sur la gestion du statut oxydatif des tissus (Chen *et al.*, 2012). La synthèse et le transport d'ABA est étudié en relation avec la mise en place de stratégie d'irrigation de plantes confrontées ponctuellement à un déficit hydrique (Wang *et al.*, 2012). Des interactions sont par ailleurs fréquemment mentionnées entre l'ABA d'une part et les activités des aquaporines d'autre part (Parent *et al.*, 2009 ; Shatil-Cohen *et al.*, 2011).

L'ACIDE SALICYLIQUE (SA) :

Des études récentes ont montré qu'en cas de stress hydrique de l'acide salicylique est produit en quantités importantes. Il induit alors lui-même la production de proline et d'ABA permettant de limiter les effets négatifs du stress sur les membranes cellulaires (Bandurska and Stroinski, 2005). De nombreux auteurs ont également montré que l'application de SA exogène en petites quantités permet de limiter de nombreux effets négatifs de la sécheresse tels que la réduction de croissance, du contenu en eau, de l'activité de la RUBISCO, des concentrations en pigments chlorophylliens,... (Aimar *et al.*, 2011).

L'ACIDE JASMONIQUE (JA) :

Des travaux récents ont montré que l'acide jasmonique s'accumule chez certaines espèces (tomates, maïs, orge,...) en cas de sécheresse. Cette hormone entraîne l'activation de nombreux gènes, permettant par exemple l'accumulation de bétanine dans les feuilles (3.1.3.6 *Ajustement osmotique*) (Gao *et al.*, 2004 ; Wasternack, 2007). D'autres études montrent que l'application exogène de JA permet d'induire le métabolisme antioxydant pour certaines espèces (Ai *et al.*, 2008).

LES CYTOKININES (CKs) :

Les cytokinines ont incontestablement été négligées dans le cadre d'études consacrées au stress hydrique. Il s'agit pourtant d'hormones à action anti-

sénescente marquée. Il a été démontré récemment que les cytokinines peuvent protéger la machinerie photosynthétique des plantes en cas de stress (Chernyad'ev, 2009). Elles évitent la dégradation de la chlorophylle, permettent d'activer les réponses anti-oxydantes suite à l'apparition de radicaux libres. Elles influencent directement le métabolisme des sucres et ont une action importante dans la gestion des relations sources-puits. Enfin, les cytokinines conditionnent directement l'activité du cycle cellulaire et donc les activités méristématiques (Dello Ioio *et al.*, 2008). Ces hormones agissent en activant certains récepteurs qui eux-mêmes activeront certaines gènes entraînant la synthèse de protéines destinées à protéger la structure et les fonctions de la machinerie photosynthétique (Heyl et Schmüling, 2003). Ces régulateurs de croissance font l'objet d'une attention croissante, d'une part en raison de la multiplicité de leurs fonctions mais aussi parce que des outils d'analyse de plus en plus performants ont rendus possible l'identification de formes moins abondantes de cytokinines mais dont les fonctions spécifiques apparaissent déterminantes, y compris dans la gestion des situations de stress (Rivero *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.* 2007 ; Nishiyaama *et al.*, 2011).

LES GIBBERELINES (GAs) :

Les gibbérellines sont des régulateurs de croissance bien connus. Il s'agit d'une famille particulièrement complexe de régulateurs de croissance, dont certains ont des activités hormonales plus prononcées que d'autres, l'une des plus actives étant la GA1. En cas de stress hydrique, il a été montré que les concentrations en GA1 étaient réduites suite à l'altération de la GA20 oxydase qui assure la synthèse de GA1 au départ de GA20. Cette réduction de GA1 peut entraîner une stabilisation des protéines DELLA connues pour être des répresseurs de croissance habituellement réprimées par les gibbérellines. Ces protéines DELLA étant présentes, la croissance est donc réduite en cas de manque d'eau (Skirycz and Inzé, 2010). Les gibbérellines peuvent également exercer une influence sur le métabolisme des sucres, notamment par le biais d'une action sur les activités invertases (Gonzalez et Cejudo, 2007).

LES AUXINES (IAA)

Les auxines sont des hormones liées directement au phénomène d'élongation racinaire, de gravitropisme et d'héliotropisme ainsi qu'aux processus de dominance apicale.. Les organes jeunes ont tendance à produire beaucoup d'auxines. Les organes plus vieux en produisent moins ce qui conduit au final à l'activation du phénomène d'abscission de ces derniers. En cas de stress hydrique, il arrive souvent que les organes réduisent leur production d'auxines ou que le transport de cette hormone

vers les organes plus âgés soit réduit afin de permettre à la plante de se débarrasser, en concertation avec l'éthylène impliqué dans les processus d'abscission, de certains organes puits trop encombrants pour elle en période de stress (Addicott, 1982). Les auxines interviennent aussi dans la ramification du système racinaire en favorisant la formation de racines secondaires à partir d'initiales péricycliques.

Il est à noter que tous les régulateurs cités ici peuvent également interagir entre eux. Ces interactions sont même cruciales pour expliquer les réponses de certaines espèces. C'est le cas par exemple d'interactions connues entre éthylène, ABA, SA et JA (Aimar *et al.*, 2011). Les synergies entre ces hormones ou au contraire leurs effets antagonistes permettront aux plantes de mieux résister aux stress biotiques et abiotiques.

D'autres composés sont également mentionnés et jouent un rôle important à la fois dans le développement de la plante et dans la réponse au stress : c'est le cas, par exemple, des brassinostéroïdes et des polyamines (Bajguz, 2007).

Il n'y a pas de données disponibles sur le statut hormonal particulier de racines tubéreuses comme celles de la chicorée.

2.3 Flooding stress

2.3.1 Introduction

Le flooding stress est un type de stress hydrique caractérisé par un engorgement du substrat. L'excès d'eau dans le sol a pour conséquence première de limiter les échanges gazeux entre la racine de la plante et le sol.

Cet engorgement du substrat peut intervenir pour des sols mal aérés ou lourds suite à des pluies importantes mais aussi pour des terrains dans lesquels le niveau de la nappe phréatique est proche de la surface. Les experts du GIEC insistent dans leur rapport sur la possibilité qu'avec les changements climatiques à venir, la fréquence des événements extraordinaires soit accrue. La violence et l'intensité des orages estivaux pourrait donc augmenter, avec pour conséquence des chutes rapides de quantités d'eau importantes. Ceci pourrait entraîner, outre l'engorgement systématique des terrains compacts, un engorgement de certaines zones dans les champs, des dépressions locales par exemple.

Le terme « flooding stress », regroupe en réalité deux situations bien distinctes : l'hypoxie et l'anoxie. L'hypoxie correspond une diminution de la

quantité d'oxygène disponible pour la racine dans le sol. Cette situation peut survenir lors d'un mauvais drainage du sol, d'une irrigation excessive ou d'inondations périodiques (Sairam *et al.*, 2008). L'anoxie quant à elle est une situation d'absence complète d'oxygène dans le sol, lorsque la plante est totalement submergée. Cette situation se rencontre dans des zones continuellement submergées par les eaux.

La submersion peut être très dommageable pour la majorité des plantes, voire même fatale. Certaines plantes se sont adaptées, comme par exemple celles situées sur les flancs des cours d'eau ou des lacs (Jackson, 2008). Ces espèces jouent un rôle écologique vital, en stabilisant ces flancs, en évitant l'érosion et en filtrant les polluants (Jackson & Colmer, 2005). Nous verrons par la suite que les plantes soumises au flooding développent des adaptations morphologiques qui permettent la croissance de la plante et assurent leur succès reproducteur.

Au-delà de l'impact sur les plantes, l'engorgement du substrat entraîne également la production de méthane suite au phénomène de fermentation de la matière organique des sols. Le méthane est un gaz à effet de serre qui absorbe 23 fois plus de rayonnement que le CO₂. Il s'agit donc ici d'un cercle vicieux puisque l'augmentation des gaz à effet de serre dans l'atmosphère conduit à des changements climatiques s'accompagnant d'augmentations de température, de sécheresses mais aussi par exemple d'orages violents. Ces orages accompagnés de grandes quantités d'eau engorgent certaines terres qui produisent alors du méthane capable d'amplifier le phénomène.

2.3.2 Les effets du flooding sur le sol

En conditions normales, la présence de matières organiques fortement biodégradables ainsi que l'existence d'activités racinaires et microbiennes importantes ont tendance naturellement à abaisser le potentiel d'oxydoréduction du sol (consommation de l'oxygène). Si la structure du sol permet une bonne diffusion de l'oxygène, cette diminution de potentiel peut être minime. Dans des sols aérés, il est malgré tout possible de retrouver des microsites d'anaérobie temporaire. Ces sites sont importants car ils participent au fonctionnement de nombreux cycles biogéochimiques. En effet, en cas d'anaérobie, les nitrates, les oxydes de manganèse et de fer deviennent des accepteurs d'électrons lors de l'oxydation de la matière organique. Ces composés sont donc réduits, ce qui entraîne la volatilisation de l'azote et la solubilisation du manganèse et du fer. En permettant le fonctionnement des cycles biogéochimiques et en libérant des minéraux

mineurs mais essentiels à la plante, les zones d'anaérobiose des sols sont donc essentielles (Marschner, 1995).

Toutefois, si ces conditions d'anaérobies sont prolongées, suite à une inondation du sol par exemple, l'effet bénéfique de la solubilisation du fer et du manganèse peut devenir néfaste. Présents en trop grandes concentrations dans le sol, nous verrons que ces oligoéléments seront toxiques pour les plantes. D'autres composés tels que les sulfites et les courtes chaînes d'acide gras, tendront à s'accumuler dans le sol dans des conditions d'anaérobiose (Jackson, 2008 ; Sairam *et al.*, 2008). Un engorgement prolongé entraîne également une réduction importante de la réserve en azote du sol.

La disparition rapide de l'oxygène dans le sol en cas d'engorgement apparaît clairement sur la figure 3 ci-dessous. Il ressort en effet de ce graphique qu'après submersion, l'oxygène présent dans le sol est rapidement consommé par les micro-organismes et bactéries du sol. La figure nous montre que dans l'expérience de Jackson (2008), après 24 heures, la teneur en oxygène d'un sol submergé passe de 20 à 2% (v/v). Le fait que le stock d'oxygène ne parvienne pas à se reformer s'explique par la mauvaise diffusion de l'oxygène dans l'eau. Ce composé diffuse en effet 10000 fois moins vite et est moins soluble dans l'eau que dans l'air (Jackson, 2008).

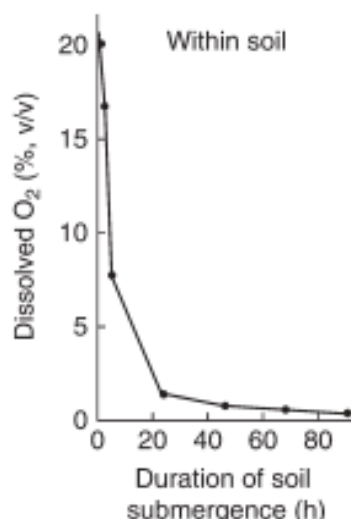


Figure 3: Evolution de la quantité d'oxygène dans le sol après submersion (Jackson, 2008).

2.3.3 Les effets du flooding sur les plantes

2.3.3.1 Introduction

Nous verrons que les conséquences physiologiques de l'engorgement du substrat sont multiples. Les contraintes proviendront à la fois du manque d'oxygène pour les racines, mais aussi des conséquences de l'engorgement du sol lui-même.

2.3.3.2 Importance économique

Faute d'une définition exacte des conditions de sol entraînant des soucis pour la production, il est simplement possible d'affirmer que sur base de la typologie mondiale des sols, 12% de la surface terrestre est susceptible de souffrir de soucis d'excès d'eau. Aux Etats-Unis, 16% des sols souffrent parfois d'excès d'eau. Il reste toutefois difficile de chiffrer exactement les conséquences de ces épisodes d'engorgement des sols sur les rendements agricoles car peu d'études sont consacrées au sujet. De plus, il n'existe pas encore de norme ou de définition exacte de ce qu'est l'excès d'eau. Il serait intéressant par exemple que pour chaque plante de grande culture et pour différents types de sols, une durée d'engorgement et une période critique pendant la saison de croissance soient définies (Jackson in www.plantstress.com; le 28 décembre 2011).

Setter et Waters (2003) ont étudié la situation en Australie. Ils ont relevé différentes zones à problème qu'ils citent en exemple. Ils parlent notamment de la région à l'Ouest de l'Australie pour laquelle des périodes d'engorgement interviennent sur une partie des 250000 ha d'orge cultivé dans cette région. En estimant que les soucis d'engorgement interviennent en moyenne 2 fois sur une période de 5 ans, ils ont calculé des pertes de rendement de 20 à 25%. Cela entraîne un manque à gagner pour les agriculteurs de la région de plus de 5 millions d'euros chaque année.

Un autre exemple provient de l'Etat de Victoria, toujours en Australie. Dans cet Etat, 1.8 millions d'hectares sont touchés par des soucis d'engorgement, 2.3 autres millions sont sujets à des engorgements de temps à autre. Les auteurs ont calculé que ces problèmes de flooding entraînent des pertes financières de 28 millions d'euros chaque année sur cet Etat.

Pour terminer, il est intéressant de mentionner que Setter et Waters (2003) ont cherché à développer un indicateur permettant de mesurer le « flooding » subi par la plante sur sa saison de culture. Ils l'ont appelé le « Sum of Excess Water » : SEW₃₀. Cet indicateur se calcule en mesurant

chaque jour, sur les 30 premiers centimètres de sol, l'épaisseur de sol touchée par l'engorgement. Cette profondeur est alors cumulée sur la saison de croissance. Par exemple, une culture pour laquelle les plantes ont subi un engorgement sur 10 des 30 cm étudiés pendant 40 jours aura un indice de 400 cm.jours (10 cm * 40 jours). Afin de donner une idée, les auteurs expliquent qu'une valeur de l'indice située entre 100 et 200 cm.jours entraîne déjà des pertes de rendement. Ce travail est donc déjà un très bon début. En pondérant cet indicateur en fonction du stade de développement au cours duquel le flooding intervient, du type de plante, du type de sol,... il sera possible de l'améliorer fortement.

2.3.3.3 Conséquences des modifications de composition minérale du milieu

En conséquence directe des modifications intervenant dans les sols, les plantes subissant un flooding stress sont confrontées à un stress lié à la composition de leur milieu (cf 2.3.2). Si le fer et le manganèse sont des oligoéléments essentiels pour les plantes, présents en quantités trop importantes dans la solution de sol ces éléments seront toxiques. Comme expliqué au moment d'évoquer les conséquences de l'engorgement sur les sols, ces conditions d'environnement entraîneront une solubilisation accrue de ces composés.

La toxicité du fer est particulièrement étudiée chez une plante habituée à l'engorgement de son substrat : le riz. L'excès de fer dans la solution du sol entraîne en règle générale chez le riz un phénomène appelé bronzing. Cela consiste en un brunissement des feuilles accompagné d'une réduction de l'activité photosynthétique. Si le stress perdure, le bronzing s'aggrave et des nécroses apparaissent sur les feuilles avant que celles-ci ne tombent (Peng & Yamauchi, 1993).

Présent en excès, le manganèse provoque lui principalement un enroulement du limbe des feuilles. Si le stress perdure, il y a également apparition de nécroses avant une éventuelle sénescence (Marschner, 1995).

Certaines plantes adaptées aux conditions d'anaérobiose ont développé des structures racinaires, appelées aérénchymes, qui leur permettent de survivre en conditions d'engorgement du substrat (Kramer and Boyer, 1995). Grâce à cet aérénchyme, les plantes transportent de l'oxygène des feuilles vers les racines et le libèrent dans le sol. Cette stratégie leur permet de respirer mais a aussi pour conséquence de faire remonter le potentiel

d'oxydoréduction de la rhizosphère. Elles évitent ainsi certaines des conséquences néfastes mentionnées ci-dessus. En effet, l'oxygène amené par les parties aériennes peut entrer dans le sol, créant une petite zone oxygénée qui, en les réoxydant, bloque le flux de composés potentiellement toxiques évoqués précédemment (Marschner, 1995).

2.3.3.4 Conséquences liées au manque d'oxygène

Outre les stress liés aux modifications des contenus en éléments minéraux du sol et de sa solution, le flooding a pour conséquence principale de réduire l'apport en oxygène aux racines. Ceci affecte par conséquent le métabolisme, la croissance et le développement de la plante. Ces modifications interviennent rapidement car la quantité d'oxygène stockée dans les racines est faible et est rapidement consommée par la respiration. La figure 4 ci-dessous nous indique que la quantité d'oxygène stockée dans la racine diminue très rapidement lorsque le sol est submergé (Jackson, 2008). Ceci est bien entendu à mettre en relation directe avec les observations faites à la figure 3 indiquant que la concentration en oxygène dans le sol diminue très rapidement en cas de submersion. Ce dernier n'est donc pas capable de réapprovisionner les racines.

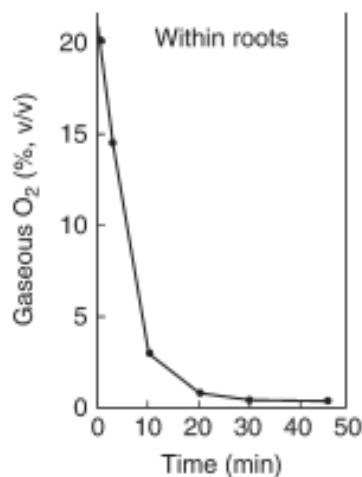


Figure 4: Evolution de la quantité d'oxygène dans les racines après submersion du substrat (Jackson, 2008).

Voyons ci-dessous quelques impacts du manque d'oxygène sur les plantes :

- La croissance

Le flooding, comme de nombreux autres stress abiotiques, entraîne une réduction de croissance des plantes. Les racines sont particulièrement affectées dans leur croissance, celle-ci se limitant souvent à une petite zone proche de la surface (Sairam *et al.*, 2008). Cela a déjà été évoqué précédemment au moment d'aborder les pertes de rendement ou la sénescence foliaire liée aux stress minéraux. Nous verrons par la suite que le stress oxydatif induit par le flooding aura le même type de conséquence. De manière concrète, il a été observé chez le pois (*Pisum sativum*) qu'un processus d'apoptose programmée survient dans les cellules du procambium lorsque les racines sont soumises à un engorgement soudain de leur substrat (Gladish *et al.*, 2006). Les racines cessent leur croissance après avoir atteint une longueur d'une dizaine de centimètres et leur extrémité meurt.

- Adaptations morphologiques

Les adaptations morphologiques induites par le flooding stress, outre l'apparition d'aérenchymes chez certaines espèces, se marquent par la formation de nombreuses racines adventives, principalement près de la surface du sol (Jackson *et al.*, 2009). Cela résulte d'une part de la surproduction d'éthylène induite en partie par le manque d'oxygène dans les racines et d'autre part par un accroissement de la sensibilité à l'auxine contenue dans la plante (Visser *et al.*, 1996). Du point de vue de la morphologie des plantes, le flooding entraîne une elongation foliaire accrue (Jackson, 2008). Cette elongation, couplée à la présence d'un aérenchyme racinaire, permet à la plante de lutter contre le manque d'oxygène au niveau des racines.

- Le métabolisme des sucres

Sans une stratégie d'elongation des parties aériennes, la combinaison d'un manque de production photosynthétique et d'une inhibition de la respiration aérobie, mènerait tôt ou tard, à une perturbation énergétique qui compromettrait l'intégrité cellulaire et induirait une acidose cytoplasmique potentiellement fatale (Jackson, 2008). Le manque complet d'oxygène dans les racines fait passer le métabolisme énergétique d'un mode aérobie vers un mode anaérobie. En effet, même en conditions de manque d'oxygène, le maintien de la fourniture d'énergie est vital pour assurer la survie de la plante. C'est pourquoi cette dernière réalise la fermentation au lieu de la respiration.

La fermentation lactique est l'une des premières réponses de la plante à un manque d'oxygène dans les racines et a pour effet d'acidifier le cytoplasme.

Par la suite, après quelques heures de stress, la fermentation alcoolique devient la voie dominante et l'éthanol est alors synthétisé proportionnellement à la quantité de sucres solubles disponibles (Albrecht *et al.*, 2004). La mise en place de ces voies (Figure 5) nécessite que certaines protéines soient synthétisées en réponse à l'anaérobiose. Ces protéines sont appelées les polypeptides anaérobiques (ANPs). Parmi ces ANPs, l'alcool déshydrogénase (ADH, EC 1.1.1.1) est prédominante. D'autres enzymes synthétisées sont la lactate déshydrogénase (LDH, EC 1.1.1.27) et la pyruvate décarboxylase (EC 4.1.1.1). Comme le montre la figure 5 ci-après, l'ADH réduit l'acétaldéhyde en éthanol en conditions anaérobies avec oxydation couplée du NADH en NAD⁺. L'activité de l'ADH est cruciale pour le recyclage du NADH permettant ainsi la poursuite de la glycolyse. Peng *et al.* (2001) (cité dans Sairam *et al.*, 2008), ont démontré que l'induction des gènes ADH est liée à la production d'éthylène. Chez la tomate (*Solanum lycopersicum*), Angeles Nunez (2008) mentionne que dans les racines en situation d'anoxie, seule l'activité de la SuSy permet au saccharose d'approvisionner la glycolyse.

Suite à la fermentation, le flooding stimule donc la production d'éthanol. Si cette surproduction n'a pas d'effet toxique direct (Kramer and Boyer, 1995), elle peut avoir des incidences négatives à long terme, notamment par le fait que la surproduction d'un métabolite peut entraîner la sous-production d'autres métabolites utiles à la plante (Jayasekera *et al.*, 1989). De plus, la présence d'une quantité importante d'éthanol peut, s'il n'est pas évacué ou métabolisé, bloquer la fermentation et entraîner par conséquent une accumulation d'acétaldéhyde toxique. Certaines plantes comme les tournesols sont toutefois capables de gérer cette accumulation d'éthanol. Elles ont développé pour cela certains mécanismes : l'évacuation d'éthanol par les racines et par les parties aériennes (libéré dans l'air) ainsi que son transport vers les tiges pour une intégration dans le métabolisme des lipides et enfin la métabolisation d'une partie de l'éthanol dans les racines (Jayasekera *et al.*, 1989). Chez le tournesol, une augmentation de la quantité d'amidon dans les feuilles a également été observée. Il a en effet été mesuré que le taux de translocation des hydrates de carbone vers les racines ainsi que leur métabolisme au sein de ces racines diminuent chez cette espèce lors d'un engorgement du substrat (Liao et Lin, 2001 ; Wample et Davis, 1983).

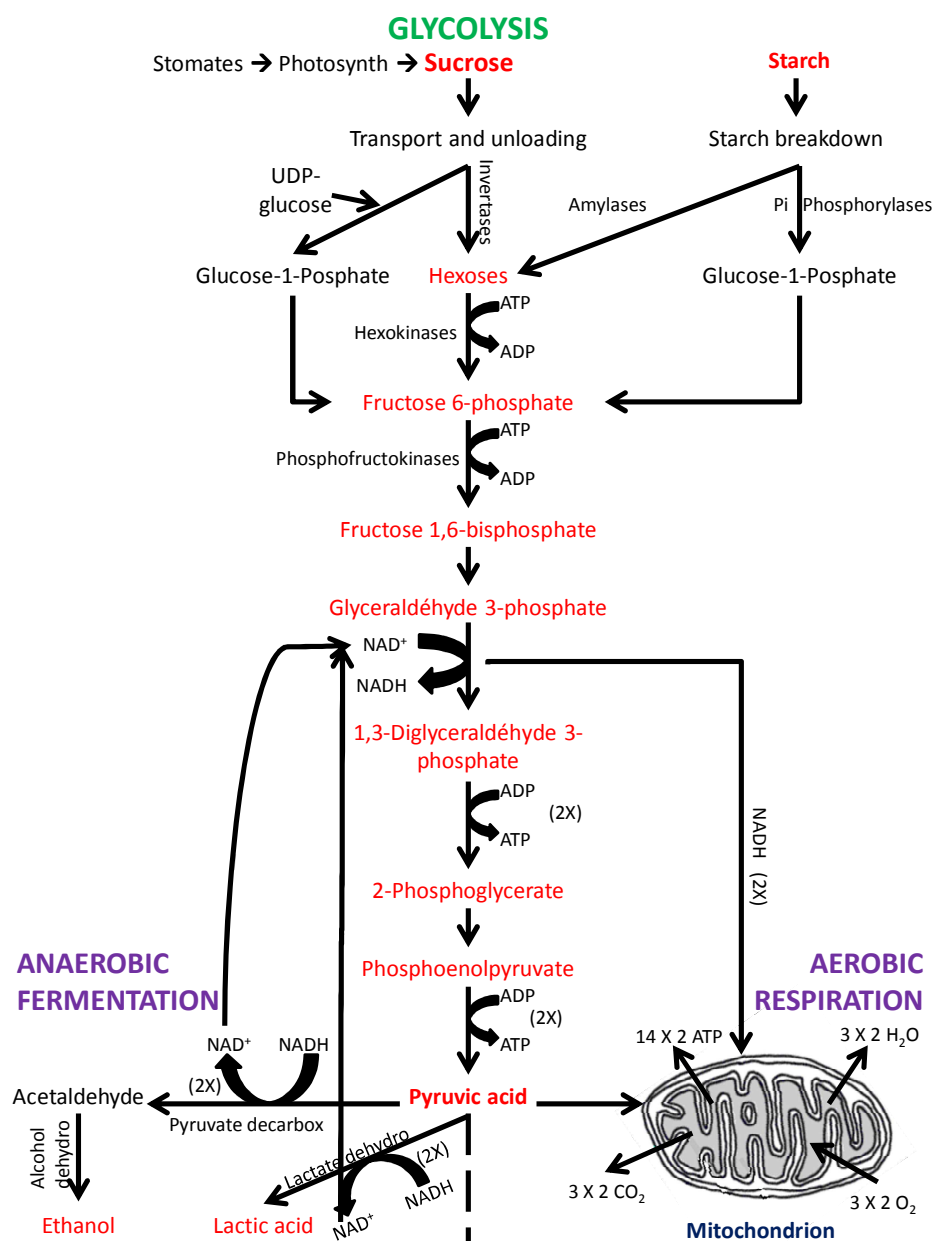


Figure 5 : Respiration et fermentation chez les plantes (Adapté de Jackson & Richard, 2003).

- Photosynthèse, transpiration et prise d'eau

Le flooding entraîne une réduction de photosynthèse découlant de dégâts déjà décrits ou développés par la suite. Il s'agit notamment des dégâts causés aux membranes cellulaires, de la diminution du contenu en

pigments chlorophylliens des feuilles, de la sénescence foliaire ou encore de l'acidification du cytoplasme suite à la fermentation (Kramer and Boyer, 1995). Chez la tomate, l'hypoxie des racines réduit l'activité photosynthétique et le contenu en chlorophylles respectivement de 30% et de 34% (Horchani *et al.*, 2008).

La réduction de photosynthèse est également liée à la diminution de l'activité de la Rubisco due à une quantité réduite des protéines Rubisco ainsi qu'une activité enzymatique réduite (Liao & Lin, 2001).

Pour ce qui est des échanges gazeux, ceux-ci sont réduits également. En effet, le flooding stress s'accompagne d'une augmentation des teneurs en acide abscissique (ABA) dans les parties aériennes. Cela réduit l'incorporation foliaire de CO₂ et permet de limiter les pertes en eau (Kramer and Boyer, 1995). Des études réalisées sur le tournesol montrent que le rendement photosynthétique et la conductance stomatique sont réduits en cas d'engorgement du substrat (Guidi et Soldatini, 1997 ; Wample et Davis, 1983). La photosynthèse nette est également réduite chez *Citrus paradisi* en cas d'hypoxie (Hossain *et al.*, 2009).

Au niveau des flux d'eau dans la plante, il est également connu que l'engorgement du substrat conduit à une fermeture des aquaporines. Ceci serait dû à l'augmentation de la concentration en CO₂ durant l'engorgement du substrat. Ce CO₂ proviendrait de la respiration racinaire consommant l'oxygène encore disponible. Le CO₂ se transforme alors au contact de l'eau en sa forme acide : H₂CO₃. Cette acidité parvient alors jusqu'au cytoplasme où elle entraîne la protonation des résidus histidines des aquaporines (PIP). Cela permet d'évacuer les excédents d'eau des cellules (Aroca *et al.*, 2012).

- Le stress oxydatif

Comme bon nombre de stress abiotiques, le flooding entraîne la synthèse de composés d'oxygène actif (ROS) qui altèrent l'intégrité de la membrane et induisent de multiples dégâts. Dans les premières heures de stress, ces composés ont tendance à diminuer chez les plantes stressées pour ensuite dépasser les niveaux des plantes témoins après quelques jours de stress (Kumutha *et al.*, 2009).

Ces composés sont produits suite à l'acidification du cytoplasme résultant de la présence de CO₂ dans l'eau du sol mais aussi à la toxicité du fer ferreux présent dans le sol ainsi que de l'acétaldéhyde produit lors de la fermentation. De la même manière, la réduction du nitrate en nitrite est particulièrement toxique pour la plante et conduit à la production de composés d'oxygène actif (Stoimenova *et al.*, 2003). Il a également été montré que le manque d'oxygène dans le substrat empêche le bon fonctionnement des mécanismes détoxifiant les composés d'oxygène

actifs telles que la superoxide dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1) ou la glutathion reductase (GR ; EC 1.8.1.7) (Kumutha *et al.*, 2009). Ces derniers auteurs ont également pu prouver que la production de composés d'oxygène actif en cas de flooding résultait de l'activation d'une enzyme ; la NADPH oxydase DPI-sensible (DPI = DiPhenylene Iodonium Chloride).

Dans le cas de l'engorgement du substrat, ces composés d'oxygène actif seraient à l'origine notamment de la sénescence foliaire (Ahsan *et al.*, 2007 ; Colmer and Flowers, 2008) et de la diminution du contenu en chlorophylles (Ahsan *et al.*, 2007). Des augmentations en H₂O₂ sont mesurées chez *Citrus paradisi* (Hossain *et al.*, 2009).

- Les relations hormonales

D'une manière générale, cela a d'ailleurs déjà été évoqué, de nombreuses réponses adaptatives au flooding sont induites par la surproduction d'éthylène en cas d'engorgement (Sairam *et al.*, 2008). Le précurseur de l'éthylène est l'ACC, l'acide 1-aminocyclopropane 1-carboxylique qui est produit au niveau de la racine. La conversion de l'ACC en éthylène nécessite de l'oxygène. En flooding stress, cette réaction étant impossible dans les cellules racinaires faute d'oxygène, l'ACC est transporté jusqu'aux parties aériennes pour être converti en éthylène. Il constitue le signal du stress et sert chez certaines espèces comme le riz à accroître la disponibilité en oxygène pour les racines en induisant la différenciation de l'aérenchyme (Lutts *et al.*, 2006). D'après Lee et Reid (1997), chez le tournesol, de faibles concentrations en éthylène stimuleraient la croissance foliaire alors que des concentrations élevées l'inhiberaient.

Il est à noter que la diminution des pigments photosynthétiques pourrait également être liée à la production d'éthylène (Taiz and Zeiger, 2007).

Outre l'éthylène, d'autres concentrations hormonales sont également perturbées par le flooding stress. Il s'agit notamment, comme nous l'avons évoqué précédemment, de l'augmentation de la concentration en ABA dans les parties aériennes. En outre, les teneurs racinaires de cytokinines et les teneurs foliaires de gibbérellines diminuent, alors que les teneurs d'acide abscissique des parties aériennes augmentent. Chez la tomate, la distribution de cytokinines et de gibbérellines dans les tiges par le flux transpiratoire est fortement réduit lors d'un flooding (Else *et al.*, 2008).

Les teneurs en auxines augmentent elles dans les tiges et les racines pouvant conduire à l'hypertrophie de la tige, l'inhibition de la croissance racinaire et le développement de racines latérales (Kramer and Boyer, 1995 ; Colmer and Flowers, 2008). De manière générale, ces changements peuvent être dus à une augmentation dans la production ou à un déplacement des régulateurs de croissance dans la plante.

3. Que se passe-t-il dans le sol ?

3.1 Introduction

Notre étude s'intéresse non seulement à la physiologie des plantes, mais aussi au sol sur lequel elles se développent. Nous verrons au moyen de différentes expériences comment le statut hydrique du sol peut influencer sur la physiologie de la plante à différents niveaux, et notamment sur son développement racinaire et sa prise d'eau.

Nous développerons ci-dessous les méthodes existantes en vue de mesurer et suivre la teneur en eau du sol. Nous donnerons ensuite une idée du fonctionnement des méthodes TDR (Time Domain Reflectometry) et ERT (Electrical Resistance Tomography) utilisées au cours de notre étude. Nous terminerons en donnant quelques idées sur la modélisation des mouvements d'eau dans le continuum sol-plante-atmosphère. Une fois ces transferts bien compris et modélisés, l'étape suivante consiste à calculer les rendements sur base de ces modèles. Cette dernière étape ne sera pas intégrée aux recherches effectuées.

3.2 Suivi du contenu en eau du sol

Agronomes et biologistes utilisent différentes techniques en vue de mesurer la teneur en eau du sol et d'en déduire la prise d'eau par la plante. Une méthode simple mais particulièrement destructrice et laborieuse consiste à prélever des échantillons de sol et d'en mesurer la teneur en eau par différence entre le poids frais et le poids sec (après passage en étuve) des échantillons prélevés (Sharp and Davies, 1985).

D'autres méthodes invasives mais moins lourdes existent également. Elles concernent l'utilisation de sondes insérées dans le sol. C'est le cas par exemple des sondes à neutrons (Hupet and Vanclooster, 2002 ; Koumanov et al. 2006) et des sondes TDR (Time Domain Reflectometry ; Hupet and Vanclooster, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2004). Dans les 2 cas, la mesure repose sur l'envoi d'un signal dans le sol. Ce signal sera réfléchi au contact de l'eau, du sol et de ses composants. La teneur en eau du sol dépendra de l'intensité du signal réfléchi.

Des méthodes de mesure moins invasives ont également été mises au point. Il s'agit par exemple de l'ERT de surface (Electrical Resistance Tomography ; Binley et al., 2002), du GPR et de l'EMI (Ground Penetrating Radar and ElectroMagnetic Induction; Minet, 2011). La mesure de teneur en eau repose respectivement sur l'envoi d'un signal électrique ou

électromagnétique dans le sol. Il s'agit ensuite, comme pour les sondes à neutrons et sondes TDR, de mesurer le signal après son passage dans le sol ou après réflexion par les éléments du sol en vue d'en déduire sa teneur en eau. Les 2 dernières méthodes citées sont définies comme étant du « proximal sensing », en comparaison avec le remote sensing des données satellites. Ici encore, il est possible à partir de ces mesures satellites de déduire la teneur en eau du sol. Les limites dans ce cas sont plus importantes, principalement en termes de couverture du sol et de rugosité. Au cours de notre travail, nous avons utilisé certaines des techniques décrites ci-dessus afin de suivre l'état hydrique de nos sols. Outre la technique invasive standard (séchage à l'étuve), nous avons utilisé les sondes TDR et ERT. Nous en décrivons rapidement le fonctionnement ci-après.

3.3 Fonctionnement des sondes TDR et de l'ERT

3.3.1 Les sondes TDR

Comme expliqué dans les paragraphes précédents, de nombreuses méthodes existent pour mesurer la teneur en eau du sol. Parmi celles-ci, certaines mesures dites « diélectriques » se basent sur la polarité des molécules d'eau présentes dans le sol. Les sondes TDR se basent sur ce principe. Leur fonctionnement est décrit en détails dans les articles de Robinson *et al.* (2003) et Huisman *et al.* (2008). Ces deux papiers ont donc servi de base aux explications ci-dessous.

3.3.1.1 Caractéristiques des molécules d'eau

L'eau fait partie des molécules dites polaires. Elle constitue un dipôle permanent de par la distribution des électrons autour des atomes d'hydrogène et d'oxygène de la molécule. En l'absence de champ électrique, les molécules d'eau présentent un mouvement thermique aléatoire. Placées dans un champ électrique, les molécules abandonnent leur mouvement aléatoire et s'alignent avec le champ. Ceci s'observe dans la figure 6 ci-dessous.

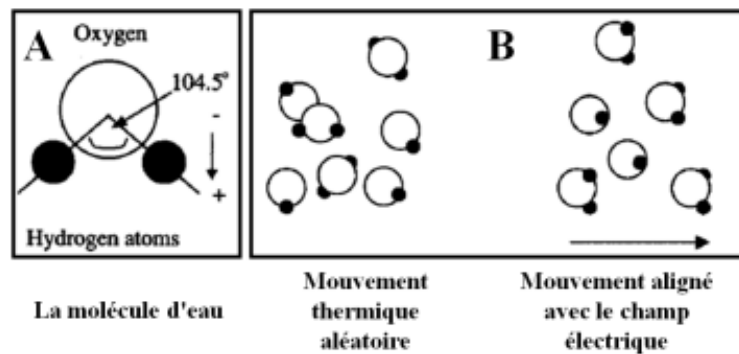


Figure 6 : Représentation d'une molécule d'eau (A). Mouvements aléatoire et orienté de l'eau (B).

L'alignement des molécules dans un champ électrique stocke de l'énergie qui sera libérée lorsque ce champ est arrêté.

Placées dans un champ électrique alternatif, les molécules d'eau ne parviennent pas à suivre les fluctuations du champ. Le mécanisme de polarisation dépend donc de la fréquence du champ électrique alternatif. Ces phénomènes permettent de comprendre et de décrire la permittivité diélectrique.

3.3.1.2 La permittivité diélectrique

Ce concept de permittivité diélectrique n'est pas propre qu'à l'eau. De nombreux matériaux sont polaires. Le sol par exemple est composé de 3 phases ; une phase solide, une phase liquide et une phase gazeuse. Chacune de ces phases présente sa propre permittivité diélectrique. La permittivité relative de l'air est de 1, celle de la phase solide varie de 4.5 à 10 alors que celle de l'eau à 25°C est de 78.5. L'eau est donc un matériau dont la permittivité est bien plus grande que de nombreux autres matériaux, raison pour laquelle ce concept s'explique bien souvent, comme nous l'avons fait, à partir de son cas particulier : l'eau. Dans le sol, la permittivité du milieu dépendra principalement de sa teneur en eau.

La permittivité du sol est une valeur complexe comportant une partie réelle et une partie imaginaire (Eq. 1) :

$$\epsilon = \epsilon' - j\epsilon'' \quad \text{Eq. 1}$$

ϵ' est la partie réelle de la permittivité. C'est ce paramètre que nous avons appelé permittivité relative précédemment. La partie imaginaire (ϵ'')

représente quant à elle la quantité totale d'énergie absorbée par les molécules ou la perte d'énergie.

3.3.1.3 La mesure de la teneur en eau dans le sol

La méthode TDR (Time Domain Reflectometry) repose sur les propriétés décrites précédemment. Elle permet de mesurer la teneur en eau du sol là où les sondes sont insérées. Il s'agit donc d'une mesure directe. L'utilisation des TDR pour mesurer la teneur en eau et l'humidité des sols a débuté dans les années 80. Une représentation des sondes utilisées au cours de nos recherches est donnée à la figure 7 ci-dessous.



Figure 7 : Sonde TDR à 3 broches utilisée lors de nos expériences.

Les sondes TDR envoient dans le sol un signal électromagnétique de fréquence connue. La vitesse de ce signal dans le sol sera fonction de la permittivité du milieu qu'il traverse. Dans le cas des TDR, le signal se propage le long des tiges et est réfléchi partiellement en fin de sonde. Le dispositif mesure le temps nécessaire (t) à l'onde pour aller au bout de la sonde et revenir au point de départ. Connaissant la longueur des sondes (l), la vitesse du signal peut être déduite de l'équation 2 ci-dessous :

$$v = \frac{2l}{t_s} \quad \text{Eq. 2}$$

Dans cette équation, t_s est le temps de parcours du signal dans le sol. Ce temps est déduit de l'analyse du coefficient de réflexion du signal (Fig. 8). Sur la figure ci-dessous, t_p représente le temps de parcours dans la sonde et le sol et t_s le temps de parcours dans le sol uniquement. Afin de systématiser l'analyse du signal, il y a lieu de calibrer le système afin qu'il sache où il doit calculer les tangentes représentées et ainsi déduire les temps de parcours.

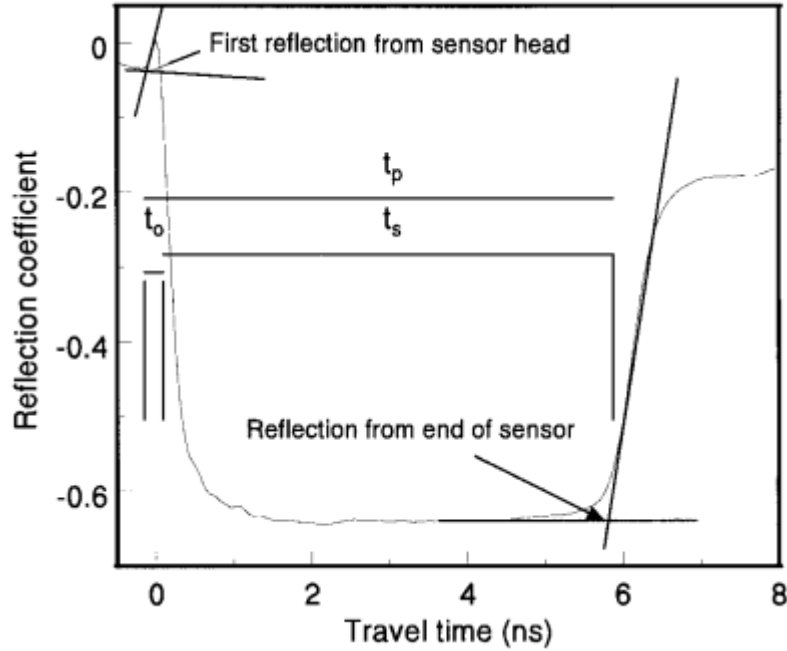


Figure 8 : Signal obtenu lors de l'envoi d'une onde dans un sol. Le tracé des tangentes permet de connaître les temps de parcours (Robinson *et al.*, 2003).

A partir de la vitesse, il est maintenant possible de calculer la permittivité apparente du milieu. Nous savons en effet que, dans le vide, la vitesse d'une onde est égale à 3.10^8 m/s (c). Dans un autre milieu que le vide, la vitesse de propagation d'une onde dépend des caractéristiques diélectriques du milieu traversé. La vitesse obtenue dans l'équation 2 peut donc s'exprimer selon l'équation 3 :

$$v = \frac{c}{\sqrt{\epsilon_r}} \quad \text{Eq. 3}$$

Dans l'équation ci-dessous, ϵ_r est la permittivité relative du milieu traversé. Il est important de noter ici que la permittivité mesurée est une permittivité apparente (K_a) et ne correspond à aucun des termes de l'équation 1 ci-dessous. Lorsque la teneur en eau du sol augmente, la permittivité électrique apparente (K_a) augmente. Le temps de propagation de l'onde dans le sol le long des tiges de la sonde augmente donc également.

Pour estimer la teneur en eau du sol à partir de la permittivité apparente mesurée, une équation de calibration est nécessaire. Différentes équations empiriques ont été mises au point. Une équation empirique propre à chaque étude pourrait d'ailleurs être utilisée. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser la relation empirique développée par Topp (1980) après

avoir constaté que celle-ci fonctionnait bien avec notre substrat. Le lien entre permittivité apparente (K_a) et teneur en eau volumique (θ_v) est donc donné par l'équation 4 ci-dessous :

$$\theta_v = (-530 + 292 * K_a - 5.5 * K_a^2 + 0.043 * K_a^3) * 10^{-4} \quad \text{Eq. 4}$$

3.3.1.4 La conductivité électrique du sol

- Généralités :

Outre la mesure de permittivité diélectrique, l'analyse du signal TDR permet également de mesurer la conductivité électrique apparente du substrat (σ_a). Cette conductivité est principalement dépendante des phases liquide et solide du sol (Corwin, 2005). En particulier, la conductivité électrique apparente du sol dépendra de la quantité d'eau dans le sol, de sa conductivité propre ainsi que de la nature des constituants du sol (Schneider, 2009).

La température aura également une influence importante sur la conductivité électrique apparente du substrat. Afin de comparer des valeurs de conductivités obtenues à des températures de sol différentes, il est important de connaître la température dans le substrat. De cette manière, la conductivité mesurée pourra être ramenée à la conductivité électrique à une température de référence. Dans notre cas nous choisirons la température de 25°C. La correction se fait selon la relation mise au point par Campbell *et al.* (1948). Ces auteurs ont pu montrer que la conductivité électrique augmente de 2.02% (paramètre α) entre 15 et 35°C. Cette relation est reprise ci-dessous (Eq. 5).

$$\sigma_T = \sigma_{25^\circ\text{C}} * [1 + \alpha * (T - 25)] \quad \text{Eq. 5}$$

Tout ce qui a été présenté ci-dessus concernant la conductivité apparente du sol sera bien évidemment valable également pour les mesures réalisées au moyen des sondes ERT qui elles aussi mesurent indirectement la conductivité électrique apparente du substrat.

- Mesure par les sondes TDR :

Comme pour la mesure de teneur en eau, la conductivité du substrat peut être déduite de l'analyse du signal reçu par les sondes. Dans leur article, Huisman *et al.* (2008) nous fournissent l'ensemble des équations nécessaires au calcul de cette conductivité apparente.

La principale information utilisée pour calculer la conductivité est le coefficient de réflexion à l'infini. Comme représenté sur la figure 9 ci-dessous, après un certain temps le coefficient de réflexion se stabilise à une

valeur maximale qui dépend de la conductivité. C'est cette valeur qui est enregistrée par le système d'exploitation des données.

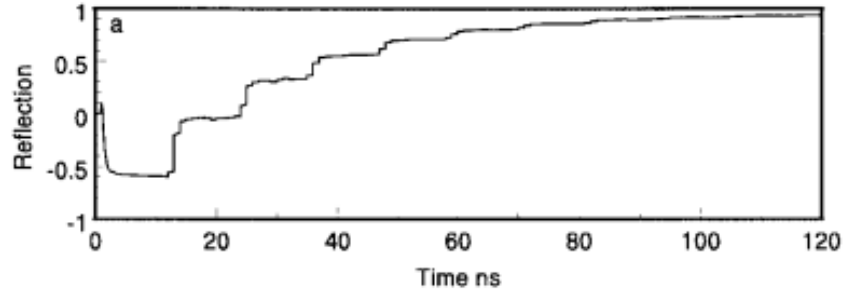


Figure 9 : Evolution du signal TDR dans le temps. Il s'agit ici d'un signal envoyé dans de l'eau (Robinson *et al.*, 2003).

Au moyen de ce coefficient de réflexion à l'infini (ρ_ω), Huisman *et al.* (2008) proposent de calculer la résistance sur le trajet (R_L) (Eq. 6).

$$R_L = Z_{out} * \frac{1+\rho_\omega}{1-\rho_\omega} \quad \text{Eq. 6}$$

Dans cette equation, Z_{out} représente l'impédance du générateur d'ondes ($\sim 50\Omega$). Connaissant cette résistance, la conductivité du sol (σ_{soil}) est alors donnée par l'équation 7 ci-dessous :

$$\sigma_{soil} = \frac{K_p}{R_L} \quad \text{Eq. 7}$$

Dans cette equation, K_p est une constante dépendant de la sonde. Il est possible de connaître cette constante par calibration. Sa valeur est donnée par la formule suivante (Eq. 8) :

$$K_p = \frac{\epsilon_0 * c * Z_0}{L} \quad \text{Eq. 8}$$

Dans cette équation, ' c ' est la vitesse d'une onde électromagnétique dans le vide ($3*10^8$ m/s), ' L ' est la longueur de la sonde (m), ' Z_0 ' est l'impédance caractéristique de la sonde (Ω) et ' ϵ_0 ' est la permittivité diélectrique du vide ($8.854*10^{-12}$ F/m).

3.3.2 L'ERT

3.3.2.1 Principe de la mesure

L'ERT (Electrical Resistance Tomography) repose sur un principe très simple : l'envoi de courants dans le sol (I) et la mesure d'une différence de potentiel (U) en différents endroits en vue d'en déduire la résistance du milieu (R) au moyen de la loi d'ohm ($U=R*I$) (Fig. 10).

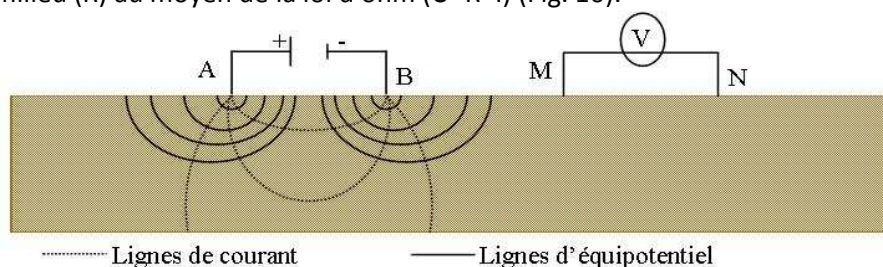


Figure 10 : Schéma de principe montrant l'injection de courant dans le sol au niveau des électrodes AB et la mesure d'une différence de potentiel aux électrodes MN (Beff L.).

Si le principe est assez simple, la reconstruction 3D de la distribution des résistivités dans le sol nécessite quant à elle un traitement important de l'information et de la puissance de calcul. Pour cette raison, les concepts d'imagerie électrique ne se sont développés réellement qu'à la fin des années 1970. Le passage de la valeur de résistance à la résistivité électrique (ρ) se fait grâce à l'utilisation d'un facteur géométrique (K) dépendant de la configuration des électrodes : $\rho = K*R$.

Une fois la résistivité du sol connue, la conductivité est obtenue en prenant l'inverse de la valeur de résistivité. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la conductivité du sol dépend de nombreux facteurs tels que le type de sol, la température, la conductivité de la solution et la teneur en eau du sol. Comme dans le cas des sondes TDR, en prenant comme hypothèse que la seule chose qui varie est la teneur en eau du sol, il est possible de trouver une relation liant la conductivité à la teneur en eau. Il y a toujours lieu toutefois de corriger l'effet de la température au moyen de l'équation 5.

3.3.2.2 L'inversion des données de résistivité

Une fois les mesures de résistivités électriques obtenues, et connaissant les positions exactes des électrodes, il est possible par un traitement

mathématique des données de retrouver la distribution 3D des résistivités dans le volume de sol étudié. Afin d'y parvenir, nous avons utilisé pour cette thèse le programme d'inversion BERT (Boundless Electrical Resistivity Tomography) développé par Thomas Günther (Günther *et al.*, 2006).

Au moyen des informations de positions d'électrodes, de dimensions de la colonne et de mesures de résistivités dont il dispose, ce programme recherche la distribution de résistivités (ρ) pouvant répondre au jeu de données fournies, c'est-à-dire la distribution dont l'erreur entre simulation et mesure est inférieure au niveau d'erreur de la technique. Afin d'y parvenir, le modèle procède à différentes itérations et s'arrête quand la qualité de la réponse est jugée acceptable. Nous verrons par la suite ce que ceci signifie.

Comme il existe un grand nombre de réponses possibles à chaque itération, le programme choisira parmi toutes les réponses qui ont une erreur inférieure au niveau d'erreur toléré, celle qui donne la solution la plus 'lisse' (« smoothing constraint »). Il faut en fait minimiser la fonction objective ci-dessous (Eq. 9) :

$$\Phi = \Phi_d + \lambda * \Phi_m \quad \text{Eq. 9}$$

Où : Φ = La fonction à minimiser
 Φ_d = Le 'data misfit' (Equation 10)
 Φ_m = Le 'model roughness' (Equation 11)
 λ = Le paramètre de régularisation (Figure 11)

Comme nous l'expliquions, dans l'équation 9, il existe un grand nombre de jeux de paramètres permettant de minimiser le 'data misfit' (Φ_d), c'est pourquoi une contrainte de lissage a été introduite ($\lambda\Phi_m$), ce qui permet au programme de choisir, parmi tous les jeux de paramètres conduisant à un minimum pour Φ_d , celui qui minimise la fonction objective (Eq. 9) de la façon la plus lisse possible. Il est en effet logique de supposer que dans un sol, la transition entre des zones de résistivités différentes ne se fait pas de manière brusque mais plutôt par une transition plus ou moins lente.

Voici ci-dessous les expressions mathématiques du 'data misfit' (Φ_d - Eq 10) et du 'model roughness' (Φ_m - Eq 11)

$$\Phi_d(m) = \|D(d - f(m))\|_2^2 \quad \text{with } D = \text{diag}(1/\varepsilon_i) \quad \text{Eq. 10}$$

Où : m = Le vecteur des paramètres du modèle généré par BERT 2.0. Il y a autant de paramètres (M) qu'il n'y a de tétraèdres (ou voxels) générés dans la 'mesh' ('mesh' = représentation en 3D de la colonne). $m = (m_1, m_2, \dots, m_M)^T$

d = Le vecteur des données (mesures). $d = (d_1, d_2, \dots, d_N)^T$ où $d_i = \log(\rho_i^a)$.

ε_i = Erreur associée à la donnée ' d_i ', différence entre mesure directe (injection en 1 – 2, mesure en 3 – 4) et réciproque (injection en 3 – 4, mesure en 1 – 2).

$f(m)$ = Réponse du modèle ' f ' pour le jeu de paramètres ' m ' testés.

$\| \cdot \|_2^2$ = Norme au carré du vecteur calculé par la formule :
 $D(d - f(m))$

$$\Phi_m(m) = \|C(m - m^0)\|_2^2 \quad \text{Eq. 11}$$

Où : C = Matrice de pondération diagonale

m^0 = Vecteur constant (itération 1) ou jeu de paramètres de l'itération précédente

Lors d'une itération le jeu de paramètres ' m ' choisi est celui pour lequel, en faisant varier le paramètre de régularisation (λ), il est possible de minimiser à la fois le 'data misfit' (Φ_d) et le 'model roughness' (Φ_m). Ceci est illustré sur la figure 11 ci-dessous. Le jeu de paramètres choisi correspond à ce qui est appelé : le 'pied de la L-Curve'.

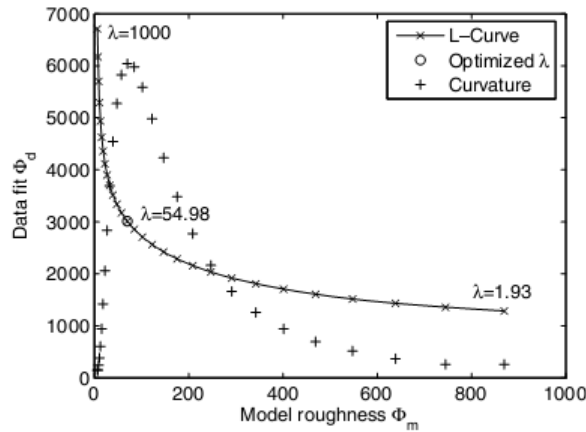


Figure 11 : L-curve permettant, en testant différents paramètres de régularisation (λ) de choisir le jeu de paramètres (' m ') minimisant à la fois Φ_d et Φ_m (Günther *et al.*, 2006).

Afin de juger de la qualité du modèle, différents paramètres sont calculés. Il s'agit surtout du RRMS (Equation 12 = Relative Root Mean Square) et du χ^2 (χ^2 ; Equation 13).

Dans le cas de BERT 2.0, le programme arrête ses itérations lorsque le $\Delta \chi^2$ est inférieur à 1%.

$$RRMS = \sqrt{\text{mean}(\sum_{i=1}^N (d_i - f_i(m) / d_i)^2)} \quad \text{Eq. 12}$$

Le RRMS est exprimé en pourcents et doit être le plus petit possible.

$$\chi^2 = \Phi_d / N \quad \text{Where } N = \text{number of data} \quad \text{Eq. 13}$$

Il s'agit donc ici du critère d'arrêt des itérations. L'objectif cette fois est que ce paramètre soit le plus proche possible de 1.

3.4 Modélisation des mouvements d'eau dans le sol

En cas de sol bien pourvu en eau, la prise d'eau par la plante est souvent considérée comme étant proportionnelle à la densité des racines dans le sol. La situation se complique toutefois lorsque le sol s'assèche. Le fait que l'étude du profil racinaire soit très laborieuse et insuffisante pour distinguer les racines actives et non actives pour la prise d'eau a conduit les chercheurs à trouver d'autres techniques visant à suivre la prise d'eau racinaire. Différents scientifiques ont cherché à mettre en place pour cela des modèles hydrologiques : Jarvis 1989, Bouten 1995, Doussan *et al.* 2006, Javaux *et al.* 2008, Simunek and Hopmans 2009. Une autre possibilité pour suivre la prise d'eau racinaire peut être d'utiliser des isotopes radioactifs pour tracer les mouvements d'eau (IAEA, 1975 in Nelson *et al.*, 2006). L'inconvénient de cette dernière méthode étant qu'elle est très coûteuse et difficile à mettre en place.

Pour ce qui est des modèles, au niveau des propriétés du sol, ceux-ci se basent souvent sur l'équation de Richards (Eq. 14) qui permet d'interpréter un changement de teneur en eau en un endroit donné comme étant la somme de la redistribution de l'eau dans le sol et de l'extraction racinaire par la plante (S).

$$\frac{\delta \theta}{\delta t} = \frac{\delta}{\delta z} \left[-K(h) \frac{\delta h}{\delta z} + K(h) \right] + S \quad \text{Eq. 14}$$

Dans cette equation, θ représente la teneur en eau volumique et K la conductivité hydraulique à une suction donnée (h). Le terme de gauche de l'équation représente donc la redistribution de l'eau dans le sol et le terme de droite la prise d'eau racinaire. Dans des sols très conducteurs, estimer la prise d'eau uniquement sur base des modifications de teneurs en eau mesurées peut donc conduire à de grosses erreurs. Connaissant les propriétés du sol et grâce à un suivi du contenu en eau, il est possible par modélisation inverse de l'équation 14 de retrouver le paramètre de prise d'eau par la plante (S).

Outre les aspects de physique du sol, les modèles de prise d'eau racinaire mettent également en œuvre des connaissances sur la physiologie de la plante et de sa racine. Les différents modèles existant utilisent ici des résultats provenant d'échelles d'études parfois fort différentes. Certains reprennent des propriétés physiologiques des plantes à des échelles microscopiques ou mésoscopiques (conductances racinaires par exemple). C'est ce qui est fait notamment dans le modèle RSWIMS (Javaux *et al.*, 2008). D'autres se basent sur des connaissances plutôt macroscopiques du développement racinaire, du statut hydrique du sol, de la transpiration,... à un moment donné (Jarvis, 1989 ; van Dam, 1997 ; Simunek & Hopmans, 2009).

De manière générale, toutes ces données une fois insérée dans les modèles permettront donc de suivre non seulement la teneur en eau du sol mais également les mouvements d'eau et la prise d'eau par la plante.

Dans notre cas, après traitement de nos mesures de teneurs en eau dans le sol, nous avons introduit ces données dans un modèle hydrologique (Hydrus 1D : Simunek and Hopmans, 2009) afin d'observer et de modéliser le comportement de la racine en termes de croissance et de prise d'eau pour différents statuts hydriques du sol.

4. La chicorée à inuline

4.1 *Cichorium*

La chicorée à inuline appartient à la famille des Astéracées et au genre *Cichorium*. Ce genre comprend différentes espèces, les deux plus connues et les plus intéressantes au niveau agronomique étant *Cichorium intybus* L. et *Cichorium endivia* L. (Desprez *et al.*, 1999).

Selon Paulet (1985), *Cichorium endivia* L (Figure 12) se retrouve principalement au niveau du bassin méditerranéen. Cette espèce est composée de plantes annuelles, cultivées principalement pour leurs feuilles consommées en salade. Nous y retrouvons notamment la scarole (*C. endivia* L. var. *latifolium* Guss.) et la chicorée frisée (*C. endivia* L. var. *crispum*).



Figure 12 : *Cichorium endivia* L. ; la scarole (Source : www.faune-flore.be, le 27 octobre 2011)

Notre espèce d'intérêt, *Cichorium intybus* L., est quant à elle une espèce bisannuelle allogame résistante au gel (Cornelis, 2003). Cette espèce est également originaire du bassin méditerranéen. Son usage médicinal était en effet mentionné en Grèce, en Egypte et à Rome. Elle a ensuite été introduite dans de nombreux pays et se cultive principalement en Belgique, en France, au Royaume-Uni, aux Pays-Bas et en Allemagne (Hitchcock & Cronquist, 1973). L'espèce *intybus* comprend 2 sous-espèces : *foliosum* et *sativum* (Cornelis, 2003).

Concernant *C. intybus* var. *foliosum* (chicorées à feuilles ; figure 13), la variété la plus connue est le « Witloof », c'est-à-dire le chicon. Cette sous-espèce comprend également la chicorée à larges feuilles et la chicorée à

feuilles rouges. Dans cette sous-espèce, les feuilles de chicorée sont en général consommées après cuisson.



Figure 13 : *Cichorium intybus* var. *foliosum* ; le chicon (<http://biologie.ens-lyon.fr/ressources/Biodiversite/Documents/la-plante-du-mois/chicoree-et-endive/>, le 9 mai 2012).

Cichorium intybus var. *sativum* (Figure 14), pour sa part, reprend l'ensemble des variétés de chicorées industrielles ou à inuline. L'intérêt de cette sous-espèce n'est, cette fois, plus ses feuilles mais bien sa racine pivotante particulièrement développée. Cette sous-espèce sert non seulement à la production de substitut de café mais aussi à l'extraction de fructose et d'inuline (Cornelis, 2003).



Figure 14 : *Cichorium intybus* var. *sativum* ; chicorée à inuline (photographie personnelle)

La distinction entre les espèces *C. endivia* et *C. intybus* est difficile à préciser au niveau morphologique, elle se base principalement sur la structure de la fleur et la taille des fruits.

Cichorium endivia est autogame (avec toutefois une allogamie résiduelle) alors que *C.intybus* est essentiellement allogame. Il est possible d'obtenir des hybrides entre ces espèces (Boulineau *et al.*, 1994).

4.2 *Cichorium intybus* var. *sativum*

La plante se présente comme une herbacée bisannuelle possédant une racine pivotante puissante (Figure 15 A) pouvant atteindre une longueur de 75 à 120 centimètres et un poids de 300 à 400 grammes. La plante puise donc ses ressources profondément dans le substrat. Les feuilles se forment en rosette et apparaissent de façon spiralée (Figure 15 B). Au terme de la première année, la plante a synthétisé une quarantaine de feuilles dont la longueur maximale est de 50 centimètres et la largeur de 10 à 15 centimètres (Cornelis, 2003).



Figure 15 : Racines (A) et feuilles (B) de *Cichorium intybus* var. *sativum*. (A : <http://www.passeportsante.net>, le 27 octobre 2011 ; B = photographie personnelle).

La racine pivotante de la chicorée produit des racines latérales. A une même profondeur, ces dernières se développent à partir de 2 points opposés de 180 degrés (Vuylsteker *et al.*, 1998). Au fur et à mesure de la croissance en profondeur de la racine principale, de nouvelles racines latérales apparaissent de façon hélicoïdale (Figure 16).

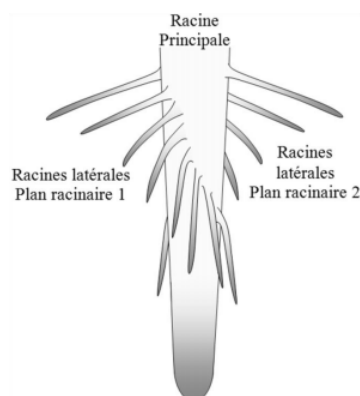


Figure 16: Schéma d'une racine de chicorée (Dekoninck N., 2009).

Il est important de mentionner ici que, malgré nos recherches, nous ne sommes pas parvenus à trouver les informations histologiques relatives aux racines de chicorée. Il ne nous est donc pas possible de localiser exactement les tissus conducteurs au sein de cette racine.

4.3 Historique et chiffres

Dès 4000 avant Jésus Christ, la plante était utilisée en Egypte d'où elle est originaire (Boulineau *et al.*, 1994) pour la production de papyrus : les papyrus d'Ebers (Leroux, 1995). Très vite elle a été reconnue pour ses vertus thérapeutiques ; elle fut utilisée pour lutter contre les maux d'estomac, de foie, de cœur et les affections oculaires (Cornelis, 2003). Plus tard (VIII^{ème} siècle après JC), Charlemagne rendra même sa culture obligatoire dans ses jardins médicinaux.

A partir du XVII^{ème} siècle, ses propriétés nutritives furent également considérées, notamment comme substitut du café (Doré & Varoquaux, 2006). Le blocus commercial imposé par l'Angleterre à la France engendredra une forte augmentation du prix du café. Les agriculteurs ont donc cherché des produits locaux capables de le remplacer. C'est finalement un Suisse qui le premier à fait fortune avec une décoction de racine de chicorée torréfiée, dont le goût était proche de celui du café. La culture s'est ensuite considérablement étendue dans le nord de la France, en Belgique, en Allemagne et en Autriche, multipliant par 15 les surfaces cultivées entre 1872 et 1940 (Desprez *et al.*, 1999 ; Doré & Varoquaux, 2006). Au début du XX^{ème} siècle, 13000 hectares étaient ainsi cultivés chez nous pour la torréfaction des racines et la production de succédané du café. Cette superficie chutera à 1000 ha dans les années 70 (Henry, 1995). Malgré cet effondrement, un nouveau débouché est aujourd'hui exploité (Descy, 2005). En effet, depuis les années 80, la chicorée est cultivée pour l'extraction de fructose et d'inuline. Cette dernière est, comme nous le verrons, une molécule particulièrement intéressante pour de multiples applications.

Selon l'INS (Institut National de Statistique : <http://statbel.fgov.be>, le 27 octobre 2011) 8854 ha de terres ont été cultivées en Belgique pour la production de chicorée en 2006 ; 8731 pour l'extraction d'inuline et 123 pour la production de substitut de café. Cette surface s'élevait au total à 15649 ha en 2005. La chute spectaculaire de production est due aux réformes européennes sur les quotas de sucre qui ont conduit à la limitation de la production du fructose. Alors que la chicorée industrielle était cultivée pour la production de fructose et d'inuline jusque 2005, seule l'extraction de cette dernière apparaît à ce jour économiquement rentable

car elle n'entre pas en ligne de compte des quotas européens (Descy, 2005). Depuis lors, les surfaces emblavées restent relativement constantes. En 2008 et 2010, la surface cultivée s'élevait respectivement à 8829 et 8027 ha (Institut National de Statistique : <http://statbel.fgov.be>, le 27 octobre 2011).

4.4 La culture de la chicorée à inuline

La chicorée industrielle présente trois principaux intérêts agronomiques qui justifient sa culture:

- La production de substitut au café grâce à la torréfaction des racines.
- L'extraction d'inuline de ses racines, utilisation semblant particulièrement prometteuse pour l'avenir. Nous la considérerons par la suite.
- L'utilisation en tant que fourrage pour le bétail des feuilles des racines récoltées en champ (Wilson *et al.*, 2004). Il s'agit là de valoriser les déchets issus de sa culture.

-
Le rendement potentiel de la chicorée industrielle en Belgique est de 50 à 60 T/ha (Cornelis, 2003). Elle doit de préférence être cultivée sur des sols légers (sablonneux, sablo-limoneux ou limoneux) car les racines ont tendance à fourcher (Figure 17) sur des sols trop lourds, ce qui diminue le rendement mais surtout augmente la quantité de terre transportée avec les racines récoltées.



Figure 17 : Racines présentant un grand nombre de fourches suite au confinement en pots.

Lorsque nous tenons compte du fait que les conditions ne sont pas toujours optimales, que des plantes montées en fleurs doivent être supprimées et que des maladies peuvent toucher la culture, le rendement moyen en Belgique est de 47 T/ha (<http://statbel.fgov.be>, le 28 décembre 2011).

Les racines de chicorée présentent en moyenne des teneurs pondérales en inuline variant de 16 à 19%. Cette teneur peut monter jusqu'à 22% en cas de conditions climatiques plus favorables : sol bien pourvu en eau et températures douces (Doré & Varoquaux, 2006). En 2011, le prix de vente brut de la chicorée (hors frais de transport) était de 57.25 €/tonne de matière fraîche (tonnage calculé sur base d'une richesse de 16%) (www.sillonbelge.be, 28 décembre 2011).

La culture doit être installée sur une surface plane afin d'éviter les problèmes d'érosion et d'inondations boueuses liés à ce type de culture peu couvrante dans les deux à trois premiers mois de croissance. Outre les problèmes d'érosion dus à une mauvaise couverture du sol, toute culture de racines entraîne avec elle l'exportation de quantités importantes de terre au moment de la récolte (Ruysschaert *et al.*, 2004). Selon Poesen *et al.* (2001, cité par Ruysschaert *et al.*, 2004), lors d'une récolte de chicorées, la quantité de terre emportée avec les racines s'élève en moyenne à 8,1 T/ha. Ce phénomène présente de nombreux inconvénients en relation avec :

- Le coût de transport pour cette terre emmenée dans les camions allant aux sucreries.
- Le coût de traitement du sol dans les sucreries et la mise en décharge ; mettre de la terre ou des boues en décharge coûte 150 euros par mètre cube (Biolders & Javaux, 2006).
- La perte de nutriments pour le champ qui doit, le cas échéant, être contrebalancée par une fertilisation adéquate.

Il est conseillé d'intégrer la chicorée dans une rotation longue de 5 ans afin d'éviter l'envahissement de la parcelle par des parasites, des maladies et des plantes adventices liés à cette culture (Cornelis, 2003).

Dans nos régions, la chicorée est en général semée de la mi-mars à début mai. Le moment idéal pour semer la chicorée se situe entre le début et la mi-avril. Au cours de 7 années d'expérience aux USA, Wilson *et al.* (2004) ont obtenu des rendements semblables pour des plantes semées de début à mi-avril. Des pertes de rendement étaient constatées lorsque les plantes étaient semées à la mi-mai (chute de 35% par rapport à début avril).

Les producteurs cherchent souvent à avoir la période végétative la plus longue possible afin de maximiser les rendements. Il existe toutefois une limite à cette optique. En effet, Schittenhelm (2001) a montré que si les plantes sont semées trop tôt (avant la mi-mars), la probabilité qu'elles aient à subir des périodes plus froides augmente. Des températures inférieures à 4°C peuvent entraîner la vernalisation de certaines plantules et donc une montaison et floraison en première année. Chaque pourcentage de

montaison (plantes produisant une hampe florale en vue de la floraison) entraîne au champ des pertes de rendement allant de 1.1 à 1.2% (Schittenhelm, 2001). Il devrait toutefois être possible d'améliorer génétiquement la résistance des plantes à la montaison car ce caractère est très héritable (héritabilité de 0,9 selon Baert (1993) cité par Schittenhelm, 2001)). En plus des soucis de montaison, un semis précoce entraîne également des problèmes d'implantation des plantules suite aux conditions climatiques peu favorables, ce qui diminuera également le rendement final.

Outre la question du timing du semis et de la récolte, un rendement optimal sera obtenu pour une densité de semis de 150.000 plantes par hectare. Cela signifie que les lignes doivent être espacées de 45 centimètres et les graines dans les lignes de 10 centimètres.

Pour ce qui concerne la date de récolte, Cornelis (2003) ainsi que Doré et Varoquaux (2006) parlent d'un rendement optimal lorsque les racines sont récoltées à partir de la fin octobre. Selon Wilson *et al.* (2004), le rendement des racines augmente de 84% du premier septembre au 15 novembre. Il est donc important d'éviter une récolte trop précoce. A l'inverse, une récolte trop tardive sur des sols trop humides ou gelés est particulièrement difficile. Il y aura à ce moment non seulement des pertes à l'arrachage mais également au niveau des concentrations en sucres suite aux conditions climatiques. De nombreux outils sont à ce jour en phase de mise au point en vue de prédire au mieux les dates optimales de récolte (François *et al.*, 2009).

Après la récolte, les racines peuvent être conservées en tas comme nous le voyons souvent le long des routes pour les betteraves. Toutefois, les dimensions de ces tas ne devraient pas dépasser 3 mètres de hauteur et 6 mètres de largeur afin d'avoir une bonne pénétration d'air évitant l'échauffement du tas, l'augmentation de la respiration et donc la perte en sucres. A l'inverse, des températures trop basses, particulièrement des températures gélives, peuvent abimer les racines et les chaînes d'inuline. Les températures idéales de conservation sur un tas vont de 1 à 6°C, le tas ne devant idéalement pas rester en place plus de 2 semaines (Cornelis, 2003).

4.5 La création de variétés

Le Dr. Dielen (communication personnelle) explique qu'il existe de nombreuses variétés pour l'espèce *Cichorium intybus*. Compte tenu de ses modalités de sélection (intrapopulation), il s'agit de variétés-populations (Bertin, 2006). Les individus au sein d'une même variété sont génétiquement différents les uns des autres. Ce niveau de variabilité élevé s'explique par l'allogamie de la chicorée qui ne permet pas l'obtention d'un état homozygote permettant plus de stabilité au sein des variétés (Bertin, 2006). Toutefois, les caractéristiques phénotypiques moyennes d'un grand nombre d'individus au sein d'une variété sont considérées comme constantes et différentes de celles des autres variétés. Afin de créer de nouvelles variétés, des plants présentant des caractéristiques intéressantes (résistance à la montaison, aux maladies, richesse en inuline, rendement important) sont sélectionnés. Ces individus aux caractéristiques intéressantes sont semés en champs isolés ou en serres puis vernalisés afin de les faire fleurir. Des graines sont alors produites puis ressemées dans différents essais afin de juger de la qualité de la descendance (Dielen, communication personnelle).

Après un nombre variable de cycles de sélection de ce genre, nous obtenons une série d'individus (= lignée). Le croisement aléatoire des lignées obtenues produit une descendance dont les caractéristiques moyennes sont susceptibles d'être meilleures que celles des parents pris individuellement. Au total, il faut compter environ dix ans pour créer une nouvelle variété-population (Dielen, communication personnelle).

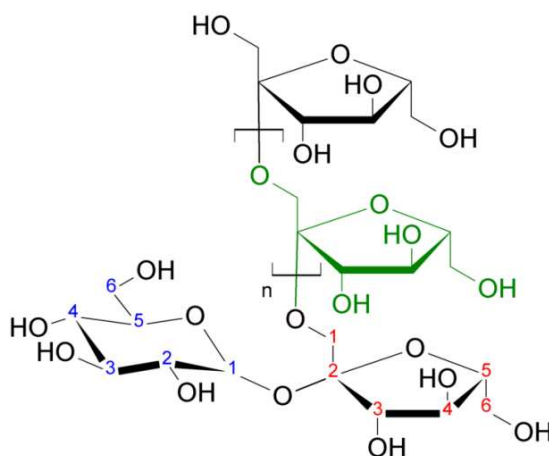
Enfin, il est également possible de créer des lignées dites « épurées ». Il s'agit cette fois de sélectionner une plante qui possède des caractères d'intérêt et de réaliser une fécondation autogame forcée. Il y a alors lieu de polliniser « manuellement » une fleur d'un individu au moyen du pollen d'autres fleurs appartenant au même individu (Castano *et al.*, 1997). Les graines obtenues sont semées et une nouvelle fécondation autogame est réalisée. Après un certain nombre de cycles de ce type, des semences dont les caractéristiques phénotypiques seront semblables sont obtenues. Au cours de nos expériences nous avons utilisé des graines provenant de ce type de lignées. Nos graines sont issues de 4 pollinisations autogames successives si bien que les individus obtenus après germination peuvent être considérés comme étant homozygotes (Dielen, communication personnelle cité dans Vandoorne, 2007).

4.6 Perspectives pour la culture de chicorées

Pour assurer la pérennité de cette culture, les industriels, les agronomes, les sélectionneurs et généticiens devront, à l'avenir, veiller à améliorer un certain nombre de caractères de la plante, de sa culture et de sa gestion (Doré & Varoquaux, 2006 et réflexions personnelles) :

- *Optimiser le rendement.* La priorité principale de tout sélectionneur ou généticien est bien entendu d'optimiser le rendement de la culture sur laquelle il travaille. L'objectif pour la chicorée sera d'optimiser le rendement final en inuline.
- *Optimiser la longueur des chaînes d'inuline.* Nous verrons par la suite que l'inuline se présente sous forme d'une chaîne de sucres. Au niveau industriel, les longues chaînes sont plus intéressantes car destinées à la fabrication de produits économiquement plus rentables (V. Dielen, communication personnelle). Outre la problématique du rendement, il sera donc crucial d'aller vers des chaînes les plus longues possibles.
- *Vigueur de la plantule.* Améliorer ce paramètre permettrait d'implanter la chicorée plus tôt dans la saison et par conséquent d'optimiser le rendement.
- *Tolérance aux maladies.* Des recherches sont menées et doivent se poursuivre afin de rendre la chicorée plus résistante à ses ravageurs ; le rhizoctone brun (*Rhizoctonia solani*) et l'oïdium (*Erysiphe cichoracearum*) par exemple.
- *Forme de la racine.* Afin de faciliter l'arrachage et d'améliorer son efficacité (limiter pertes de rendement et de terres), il y a lieu de sélectionner des variétés à racines courtes dont la masse est concentrée au maximum dans les premiers centimètres du sol.
- *Tolérance aux stress.* Il est important d'étudier les effets des contraintes hydriques, des températures et autres stress métalliques sur la plante afin de mieux la comprendre et d'optimiser sa zone de culture (cfr point 5.1).
- *Améliorer les pratiques :* Au-delà des améliorations pouvant être apportées par les sélectionneurs, les agronomes aussi peuvent travailler à l'amélioration de la filière. La chicorée n'est cultivée pour l'extaction d'inuline que depuis très peu de temps en comparaison des autres plantes de grandes cultures. Il doit donc encore être possible d'améliorer son itinéraire technique de la plantation (travail du sol, densités, amendements) à l'arrachage en passant par les interventions intermédiaires en termes d'amendements, de traitements phytosanitaires,... A

Accroître l'intérêt pour l'inuline : L'inuline n'est pas un produit de première nécessité. Ceci explique le fait qu'elle peine à s'imposer sur les marchés, surtout en temps de crise. Cependant, d'autres produits non indispensables mais présentant des effets bénéfiques pour la santé sont parvenus à s'imposer sur les marchés avant elle. Nous pensons par exemple aux omega 3 ou à la stevia. Développer un label, accroître la connaissance auprès du grand public, dénicher de nouveaux marchés,...voilà quelques missions pour les commerciaux des entreprises d'extraction.



réellement d'inuline si la molécule possède plus de 10 unités. Pour une molécule possédant moins de 10 entités, nous parlons de fructo-oligosaccharide (Meurens, 2006). Il est à noter que l'industrie préfère travailler avec de longues chaînes d'inuline et avoir peu de sucres libres. En effet, plus les chaînes sont longues, plus elles sont économiquement intéressantes (Dielen, communication personnelle). Pour la chicorée, le degré de polymérisation (DP) peut monter jusqu'à 70, mais la valeur moyenne est de 12 (Cornelis, 2003 ; Vergauwen *et al.*, 2003).

Contrairement à l'amidon, l'inuline est un composé soluble *in-vivo* et peut donc de ce fait assumer une fonction osmotique (Van Laere & Van den Ende, 2002). Il est à noter que dans le règne végétal, c'est l'amidon qui est le principal constituant de réserve. Les plantes possédant majoritairement d'autres composés de réserve ne perdent jamais leur capacité à synthétiser l'amidon. Dans le cas de la chicorée, ce dernier est synthétisé lorsqu'il y a formation de nodules sur les feuilles (lors de bouturages par exemple) (Van Laere & Van den Ende, 2002).

Les plantes accumulant des polymères de fructose se retrouvent surtout dans des régions présentant de courtes périodes de sécheresse et de gel. Elles sont presque absentes des régions tropicales ou de zones trop humides (Hendry, 1993 ; Van Laere & Van den Ende, 2002). Dans les racines de chicorée, il est possible de retrouver jusqu'à 20% d'inuline sur la matière fraîche des racines ce qui représente jusqu'à 90% de la matière sèche. Cette inuline se situe majoritairement dans les vacuoles des cellules mais pourrait aussi être présente en moindres quantités dans l'apoplasme et les faisceaux vasculaires. (Van Laere & Van den Ende, 2002).

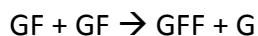
L'inuline s'accumule majoritairement dans les racines bien que de faibles quantités puissent être retrouvées dans les feuilles (De Roover *et al.*, 2000).

4.7.1 Le métabolisme de l'inuline :

4.7.1.1 La synthèse de l'inuline :

Les fructoses des chaînes d'inuline proviennent d'un seul substrat : le saccharose. La synthèse du composé s'opère dans la vacuole des cellules végétales et fait intervenir 2 enzymes :

- La saccharose:saccharose 1-fructosyltransférase (1-SST ; EC 2.4.1.99) qui transfère une entité fructose du saccharose (contenant 1 glucose et 1 fructose : GF) au carbone C-1 d'un fructose d'une autre molécule de saccharose pour former un trisaccharide : le 1-kestose (1 glucose et 2 fructoses : GFF).



- La fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT; EC 2.4.1.100) qui transfère un fructose du 1-kestose formé précédemment (ou une molécule plus longue) à un saccharose ou à une molécule déjà plus longue (GF ou GF_n; « n » étant l'indice représentant le nombre de fructoses déjà intégrés à l'oligomère ou au polymère d'inuline). Les donneurs et les accepteurs de fructose varient en fonction de l'affinité de l'enzyme. Ceci varie d'une espèce à l'autre.



Les 2 mécanismes évoqués précédemment sont représentés sur la figure 19 ci-après.

4.7.1.2 La dégradation de l'inuline :

La dégradation des fructanes, dont l'inuline, en hexoses se fait par l'action des fructanes exohydrolysases (FEH : EC 3.2.1.153).



L'ultime produit de dégradation est un saccharose, lui-même clivé par des invertases (EC 3.2.1.26) ou la saccharose synthase (EC 2.4.1.13) (Van Laere & Van den Ende, 2002).

Les FEH sont des glycoprotéines monomériques présentant un pH optimal acide. Elles se retrouvent principalement dans la vacuole. Différents types de FEH ont été identifiés ces dernières années chez des plantes comme *Arabidopsis thaliana* ou *Beta vulgaris* qui n'accumulent pourtant pas de fructanes. Leurs fonctions exactes restent d'ailleurs inconnues (Verhaest *et al.*, 2007).

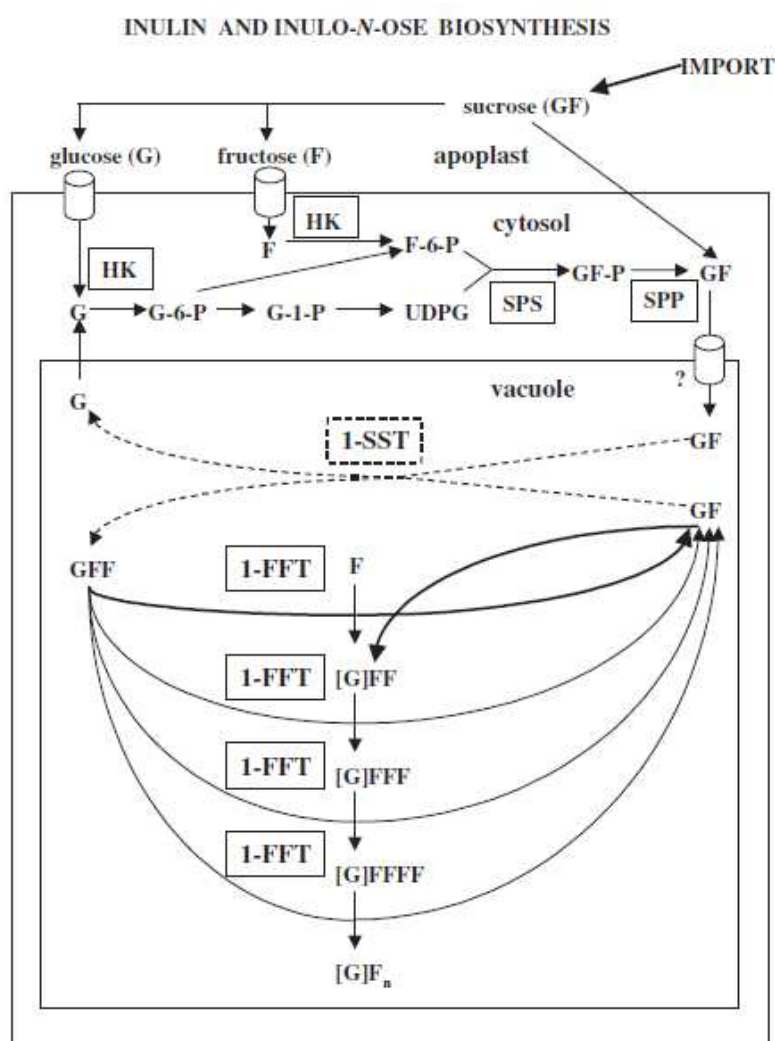


Figure 19: Modèle pour la synthèse d'inuline par les enzymes 1-SST et 1-FFT dans la vacuole. Les enzymes sont représentées par des boîtes. G: Glucose. F: Fructose. HK: hexokinase. UDPG: uridine diphosphoglucose. SPS: saccharose phosphate synthetase. SPP: saccharose phosphate phosphatase. G-6-P: glucose 6-phosphate. G-1-P: glucose 1-phosphate. F-6-P: Fructose 6-phosphate. (Source: Van Laere & Van den Ende, 2002).

4.7.1.3 Cinétique de production et de dégradation de l'inuline :

Les deux premiers mois de croissance de la plante sont principalement destinés à la mise en place de la racine. A partir du deuxième mois, le pivot commence à grossir. C'est à ce moment que les chaînes d'inuline sont

initiées en grande quantité (Druart *et al.*, 2001). Par la suite, des molécules de fructose sont ajoutées à la molécule d'inuline déjà existante. Cela augmente son degré de polymérisation (DP). Les degrés de polymérisation varient entre espèces parmi les Astéracées car l'enzyme 1-FFT a des affinités différentes pour les hydrates de carbone qu'elle utilise. Chez la chicorée, l'enzyme a plus d'affinité pour le saccharose que pour l'inuline en tant qu'accepteur de fructose si bien que ce sont plutôt des molécules à petits degrés de polymérisation qui sont formées. Chez *Echinops ritro*, les affinités de l'enzyme étant différentes, les molécules d'inuline que nous retrouvons au cours de la période d'élongation (avant les premières gelées) possèdent des degrés de polymérisation plus élevés (Vergauwen *et al.*, 2003).

Une étude de Kusch *et al.* (2009) a montré que c'est l'évolution du rapport C/N qui permet d'activer ou réprimer les enzymes responsables de la synthèse d'inuline (1-SST et 1-FFT). En particulier, la combinaison d'un milieu contenant beaucoup de carbone et peu d'azote permet d'activer les enzymes clés pour l'initiation de la synthèse d'inuline (1-SST) et l'élongation des chaînes (1-FFT). Le fructose a également pour effet d'activer les enzymes 1-SST et 1-FFT et donc l'accumulation d'inuline (Kusch *et al.*, 2009).

Les chaînes pourront s'accroître jusqu'aux premières gelées (à -3°C) (Wilson *et al.*, 2004). Ces premières gelées entraînent une chute de l'activité enzymatique de la 1-SST (figure 20). L'activité de la 1-FFT reste quant à elle élevée (figure 20) si bien qu'elle utilise tous les saccharoses entrant dans la vacuole comme des accepteurs de fructose ce qui induit une diminution du degré moyen de polymérisation moyen et une augmentation de la concentration des fructanes. Une hypothèse a été formulée selon laquelle ce faible degré de polymérisation contribuerait à augmenter l'affinité de la 1-FEH pour son substrat (Van Laere & Van den Ende, 2002).

Les industriels, intéressés par de longues chaînes, doivent par conséquent surveiller les dates des premières gelées. La synthèse d'inuline diminue donc en fin de période de croissance et sa dégradation augmente comme l'indiquent les activités enzymatiques représentées à la figure 20.

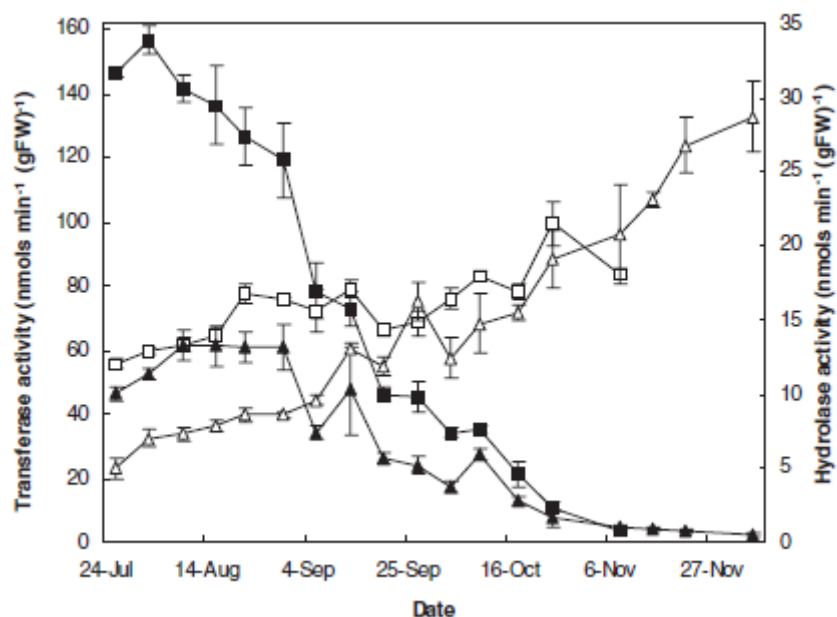


Figure 20 : Les activités transférase de 1-SST (■, 100 mM de saccharose en tant que substrat) et de 1-FFT (□, 10 mM de 1-kestose en tant que substrat) et les activités hydrolase de 1-FEH (Δ, 1% d'inuline de chicorée en tant que substrat) et invertase (▲, 20 mM de saccharose en tant que substrat) dans les racines de chicorée au cours de la saison de croissance. Les barres représentent l'erreur standard pour $n = 3$ (Source: Van Laere & Van den Ende, 2002).

Lors d'une récolte des racines après l'hiver (en mars), il a été constaté que les chaînes d'inuline sont beaucoup plus courtes (3 à 10 éléments de fructose par chaîne en grande majorité) qu'avant les premières gelées en automne (jusqu'à 25% des chaînes possédant plus de 20 éléments de fructose) (Wilson *et al.*, 2004). La racine contient donc à ce moment en majorité des oligofructoses.

4.7.2 L'inuline et la physiologie de la chicorée

Les fructanes accumulés dans des organes de stockage, comme l'inuline dans la racine de chicorée sont destinés à servir de réserve à long terme pour la plante. Selon Carpita *et al.* (1989) cités par Niness (1999), plus de 36000 espèces accumulent ce composé comme réserve d'énergie.

Chez la chicorée, plante bisannuelle, cette réserve sera utilisée en seconde année lors de la mise en place des structures reproductrices (Puebla *et al.*, 1997). L'inuline n'est remobilisée en première année qu'en réponse à des

stress tels un manque d'azote ou d'eau (Améziane, 1997 ; Van Laere & Van den Ende, 2002). Une fois que le stress disparaît, la plante remobilise directement ses sucres préalablement stockés grâce à une hydrolyse catalysée par les 1-FEH (fructanes exohydrolysases) (Hendry, 1993).

Il semble également que les fructanes puissent protéger les cellules de la dessiccation en cas de stress hydrique. Ils auraient donc un rôle de réserve en osmolytes (Cornelis, 2003 ; Hendry, 1993). Lorsque ceux-ci s'accumulent, le potentiel hydrique de la cellule (ou de la vacuole dans ce cas) diminue ce qui a pour effet d'attirer l'eau dans la cellule ou l'empêcher d'en sortir.

Il a également été montré récemment qu'en cas de stress abiotique, l'inuline peut sortir de la vacuole où elle est stockée afin de venir stabiliser la membrane cellulaire. Cela se fait grâce à une exocytose. C'est principalement grâce à cette stabilisation physique des membranes cellulaires que l'inuline est capable d'aider la plante en cas de stress. Cette stabilisation des membranes permet par exemple de limiter les sorties d'eau des cellules en cas de sécheresse (Valluru and Van den Ende, 2008).

Les enzymes responsables de la synthèse des fructanes semblent moins sensibles au froid que celles intervenant dans la synthèse d'amidon (Van Laere & Van den Ende, 2002). Comme mentionné précédemment, lors des premières gelées, suite aux modifications d'activités enzymatiques, il y a une augmentation de concentration en fructanes. Les auteurs pensent que cette augmentation contribue à la résistance au froid et permettrait une action plus aisée de la dégradation des polymères par la 1-FEH qui travaillerait plus facilement sur des chaînes plus courtes (Van Laere & Van den Ende, 2002).

L'accumulation des fructanes dans la vacuole permet également d'éviter l'inhibition de la photosynthèse par effet feedback lorsque la synthèse de sucres excède leur utilisation. Ceci expliquerait pourquoi l'inuline peut s'accumuler en grandes quantités.

En outre, le fait que les fructanes soient des composés solubles permet de les mobiliser plus rapidement au printemps en comparaison à l'amidon insoluble. L'étape limitante n'en reste pas moins l'hydrolyse des polymères par la 1-FEH (Van Laere & Van den Ende, 2002).

4.7.3 Applications pour l'inuline et perspectives

4.7.3.1 Inuline et industrie agro-alimentaire

L'inuline est un hydrate de carbone ne pouvant être hydrolysé ni absorbé dans la partie supérieure du système digestif humain. Il s'agit donc d'une fibre alimentaire (Cornelis, 2003). Cette fibre a une action bénéfique indéniable sur la santé lorsqu'elle est utilisée comme additif alimentaire (Hidaka *et al.*, 1991 ; Roberfroid et Delzenne, 1998 ; Kaur & Gupta, 2002 ; Van Laere & Van den Ende, 2002).

En 1998, la consommation d'inuline était évaluée entre 3 et 11 grammes par jour en Europe, entre 1 et 4 grammes aux Etats-Unis (Van Loo *et al.*, 1995). Cette ingestion d'inuline venait alors principalement des fruits et des légumes consommés quotidiennement et qui en contiennent naturellement en faibles concentrations. Il s'agit par exemple des oignons, des bananes, du blé, des poireaux et de l'ail (Roberfroid et Delzenne, 1998). Avec l'augmentation de production et de l'utilisation d'inuline par l'industrie, cette consommation quotidienne est actuellement en expansion.

- Un composé prébiotique :

Par définition, les probiotiques sont des micro-organismes vivants présents dans les aliments ayant des effets potentiellement intéressants en matière de santé (fonctionnement intestinal, allergie,...) (Martin, 2008). Les prébiotiques quant à eux sont des aliments non digestibles qui améliorent la santé en stimulant la croissance ou l'activité de la microflore bactérienne de l'intestin (notamment lactobacilli et bifidobacteria) (Cornelis, 2003 ; Roberfroid, 2007). L'inuline et les oligo-fructoses constituent les prébiotiques les plus connus actuellement.

Comme mentionné dans l'historique (4.3 Historique et chiffres), l'inuline est d'ailleurs utilisée depuis bien longtemps pour ses vertus thérapeutiques. Des études récentes ont été menées pour expliquer les effets bénéfiques de l'inuline. Les effets positifs pour la santé s'expliquent par cette stimulation de la microflore intestinale propre aux prébiotiques (Gibson *et al.*, 1995 et Taper *et al.*, 2000 cités par Roberfroid et Delzenne, 1998). Les bifidobactéries, stimulées par l'inuline, présentent en effet de nombreux avantages potentiels pour la santé (figure 21).

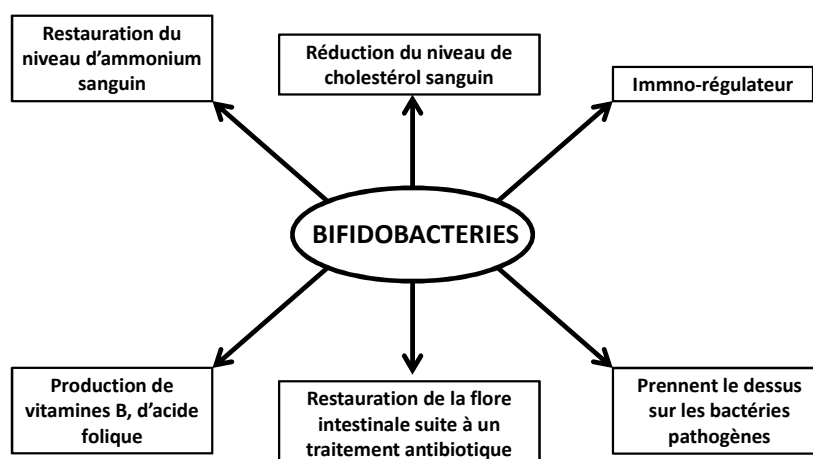


Figure 21 : Bénéfices potentiels pour la santé des bifidobactéries (Adapté de Kaur and Gupta, 2002).

A son arrivée dans le colon, l'inuline est en fait presque intacte. C'est sa fermentation par les micro-organismes qui stimule la croissance d'autres organismes comme les bifidobactéries. L'inuline constitue donc bien un aliment prébiotique ce qui signifie que c'est un aliment non digestible mais qui a un effet bénéfique sur la santé par la stimulation de croissance de bactéries (Roberfroid et Delzenne, 1998). La stimulation de cette microflore pourrait réduire le risque de certaines maladies gastro-intestinales et de cancer du côlon (Niness, 1999 ; Roberfroid, 2007). Nourrie par l'inuline, la microflore spécifique possède également un avantage sur d'autres bactéries parfois néfastes pour l'organisme.

- Un aliment diététique :

Suite à la fermentation de l'inuline dans le colon, nous observons la production d'acides carboxyliques à courtes chaînes, de lactate et de gaz. Ces hydrates de carbone n'étant pas digérés entièrement mais uniquement fermentés, l'inuline est considérée comme un aliment faiblement énergétique. Elle ne libère que 40 à 50% de l'énergie qu'elle contient, c'est-à-dire 1000 à 2000 calories par gramme (4.2 à 8.4 kJ/g). Le saccharose apporte lui plus de 4000 calories par gramme (<http://www.sfk-online.net>, le 28 octobre 2011 ; équivaut à 16.8 kJ/g).

L'inuline a un intérêt diététique non négligeable non seulement en tant que sucre « mal digéré » par l'organisme mais aussi parce qu'elle peut remplacer les graisses dans un certain nombre de préparations. En effet, les inulines à longues chaînes permettent de donner aux aliments des textures crémeuses et onctueuses grâce à leurs propriétés épaississantes et gélifiantes (Collin, 2006). Cette utilisation est déjà d'application dans les crèmes glacées, yoghourts, fromages frais, chocolat,... (Kaur et Gupta, 2002 ; Ritsema *et al.*, 2003). En comparaison à l'inuline, la valeur énergétique moyenne des lipides retrouvés dans une alimentation de type omnivore est de 9000 calories par gramme (<http://science.jrank.org> ; équivaut à 37.8 kJ/g, le 4 avril 2012).

- L'absorption accrue de minéraux :

Les scientifiques pensent aussi que l'augmentation de la concentration en acides carboxyliques dans l'intestin suite à la fermentation de l'inuline pourrait avoir un effet intéressant sur cet organe. Il y aurait une hyperplasie de la muqueuse recouvrant l'intestin et une augmentation de l'épaisseur de la paroi, à la fois de l'intestin grêle et du caecum. Cette augmentation d'épaisseur serait accompagnée d'une augmentation du flux sanguin (Roberfroid et Delzenne, 1998).

L'augmentation de l'absorption en minéraux (Ca^{2+} et Mg^{2+}) est un autre effet positif découlant de la fermentation de l'inuline et de la concentration accrue en acides carboxyliques dans l'intestin (Roberfroid, 2007). Cette meilleure absorption de minéraux permet en outre de maintenir la santé du colon en contrôlant mieux le taux de régénération des cellules. Cet apport accru en calcium prévient également des risques d'ostéoporose. L'inuline permet à la fois une meilleure absorption et un meilleur équilibre du calcium sans modifier pour autant son excrétion urinaire (Roberfroid et Delzenne, 1998).

- Un édulcorant naturel :

L'inuline constitue un produit de base pour édulcorants. Par hydrolyse de ce composé, il est possible d'obtenir du fructose. Une molécule de fructose fournit autant d'énergie qu'une molécule de glucose mais a un pouvoir sucrant plus important ; il en faut moins dans les aliments pour arriver à une « sensation sucrée » équivalente.

Par hydrolyse partielle, il est également possible d'obtenir des fructo-oligosaccharides formant un sirop mielleux à faible valeur énergétique et ayant des propriétés « bifidus » permettant une meilleure digestion (Cornelis, 2003).

Il semble donc que l'inuline puisse également présenter un intérêt pour les personnes souffrant de diabète.

- Réduction du taux de cholestérol :

Des études récentes montrent qu'en modifiant le métabolisme des lipides, l'inuline pourrait réduire la concentration en cholestérol, en triglycérides et phospholipides (Kaur et Gupta, 2002 ; Ritsema *et al.*, 2003 ; Roberfroid, 2007).

4.7.3.2 L'inuline dans les autres industries

Il apparaît que l'inuline peut servir à certaines applications très diverses dont voici quelques exemples :

- Adoucisseur d'eau ; élimine le calcaire dans les canalisations
- Agent liants pour les détergents
- Surfactant
- Cosmétique

Il est important de mentionner que pour toutes les activités non alimentaires, il est souvent nécessaire de modifier l'inuline avant son utilisation. Les applications non alimentaires requièrent en effet des molécules d'inuline à haut degré de polymérisation. A l'avenir, les industriels envisagent de produire de l'inuline à partir de plantes ne synthétisant pas de fructanes mais modifiées de telle sorte à posséder plus d'enzymes responsables de sa synthèse. Ces plantes devraient bien sûr présenter un meilleur rendement que la chicorée et avoir des molécules d'inuline plus longues (Van Laere & Van den Ende, 2002).

4.8 Effets connus du statut hydrique du sol sur la plante

Si quelques études existent sur l'impact de la sécheresse sur la chicorée à inuline, très peu de choses ont été faites sur les conséquences d'un engorgement du substrat. Voyons ci-dessous ce qu'il en est :

4.8.1 Impacts du manque d'eau sur la chicorée à inuline

Peu d'études ont été consacrées pour le moment à l'impact d'un déficit en eau sur la chicorée (*Cichorium intybus* L.). Des études réalisées sur des espèces prairiales, dont la chicorée (fourragère et non à inuline dans ce cas), considèrent que l'espèce est résistante au stress hydrique (Skinner *et al.*, 2004). Il s'avère que la chicorée est de plus en plus utilisée comme plante de prairie pour cette caractéristique mais aussi pour sa grande productivité et sa bonne qualité nutritive.

Dans l'article (Skinner *et al.*, 2004), les auteurs expliquent la raison majeure de la résistance de la chicorée à la sécheresse ainsi que de son intérêt en pâture : il s'agit de sa longue racine pivotante. Cette racine lui permet d'aller chercher très loin ses ressources en eau ce qui laisse plus d'eau disponible dans les premiers centimètres du sol pour des plantes ayant des systèmes racinaires bien moins profonds. La chicorée entre donc idéalement dans des mélanges d'espèces prairiales.

Nous détaillerons ci-dessous les résultats d'études relatives à l'impact du manque d'eau sur des plantules de chicorées ainsi que sur des plantes matures. La difficulté pour comparer les études entre-elles réside dans le fait que les protocoles utilisés sont différents et donc l'intensité des stress subis par les plantes sont rarement identiques.

4.8.1.1 Impacts du manque d'eau sur des plantules de chicorées

Les résultats présentés ci-dessous sont relatifs à l'expérience de De Roover *et al.* (2000) réalisée sur *Cichorium intybus* L. variété *foliosum* cultivar *Flash*. Le stress a commencé alors que les chicorées avaient 4 semaines et ne produisaient pas encore la 1-SST. L'expérience a duré 15 jours.

- Effets sur les parties aériennes et racinaires :

Les résultats de l'expérience montrent une réduction des poids frais des feuilles et des racines des plantules stressées. Une fois vidés de leur contenu en eau, ces organes ne présentaient plus de différence en termes de poids sec. Le stress agissait donc sur le contenu en eau des organes.

- Effets sur les rendements en sucres:

Les plantules stressées possédaient des concentrations plus élevées en glucose, fructose et saccharose que les témoins, tant au niveau des feuilles que des racines. L'effet se marque à partir du troisième jour de stress et augmente ensuite graduellement les 10 jours suivants. En fin d'expérience, les concentrations racinaires en saccharose et en glucose et fructose étaient respectivement 3 et 5 fois supérieures chez les plantules stressées en comparaison des témoins.

La concentration en inuline dans les racines était également supérieure chez les plantes stressées. Non seulement les fructanes ont commencé à apparaître avant chez les plantes stressées, mais en outre les concentrations finales étaient 10 fois supérieures chez ces dernières en comparaison des plantes témoins. Si les différences de teneurs en eau permettent d'expliquer une partie de cette richesse supérieure, cela n'est

pas la seule explication. Il y a bien production plus importante d'inuline chez les plantes stressées.

- Effets sur le degré de polymérisation (DP) :

Le DP des plantes stressées était supérieur à celui des témoins. En fin de stress, les DP maximum étaient de 32 pour les plantes témoins et de 50 pour les plantes stressées.

- Effets sur l'activité de la saccharose : saccharose fructosyltransférase (1-SST) :

Alors que pour les plantes témoins l'activité de la 1-SST n'augmente que légèrement 7 jours après le début du traitement, cette activité augmente fortement chez les plantes stressées après 5 jours de stress. Dans les 2 cas, l'activité semble augmenter lorsque la concentration en saccharose est 2 fois supérieure à celle du premier jour de traitement, suggérant la nécessité d'un certain seuil en saccharose pour induire l'activité de la 1-SST.

4.8.1.2 Impacts du manque d'eau sur des chicorées de plus d'un mois

Les résultats présentés ci-dessous se basent sur les résultats de 2 études. La première a été réalisée par Schittenhelm (1999), la seconde par Monti *et al.* (2005).

- Effets sur les parties aériennes et racinaires :

Selon Monti *et al.* (2005), les effets d'un déficit en eau sont plus marqués au niveau des parties aériennes qu'au niveau des racines. Les auteurs ont en effet observé une réduction de 50% du poids sec des feuilles en cas de stress. Cette réduction n'était que de 5% pour les racines. Il semble donc qu'en cas de stress, la priorité d'allocation des assimilats aille vers les racines, puis aux réserves de fructanes et enfin aux feuilles. Les auteurs expliquent que de cette façon, les plantes stressées sont capables de puiser l'eau plus profondément dans le sol et disposent de plus d'opportunité pour y ajuster leur potentiel osmotique et faire entrer plus facilement l'eau dans les racines (De Roover *et al.*, 2000).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux qui avaient été obtenus 6 ans plus tôt par Schittenhelm (1999). Cet auteur rapporte en effet que les effets d'un déficit hydrique se marquent tant au niveau des racines que des feuilles. Il prend pour exemple l'année 1995 durant laquelle une longue période de sécheresse a eu lieu entre la mi-juillet et la fin août (14 mm de

pluie en 5 semaines). La perte de rendement observée cette année-là était de 20% en poids sec pour les feuilles et 39% pour les racines. Les deux autres années d'expérience (1996 et 1997), les pertes de rendement étaient respectivement de 13 et 10 % pour les feuilles et 8 et 14 % pour les racines (Schittenhelm, 1999).

Ces différences peuvent s'expliquer par des différences de variétés utilisées mais aussi dans l'intensité des stress subis par la plante. Nous verrons au cours de notre étude ce qu'il en est pour un stress sévère bien défini.

- Effets sur la photosynthèse nette et la conductance stomatique :
Ces paramètres n'ont été mesurés que dans l'expérience de Monti *et al.* (2005). D'après cette étude, la corrélation entre photosynthèse nette et sécheresse du sol serait faible ($p = 0.47$) au contraire de la corrélation entre sécheresse et conductance stomatique qui est elle plus importante ($p = 0.69$).

- Effets sur le rendement en sucres et le degré de polymérisation des chaînes d'inuline :
D'après les recherches de Monti *et al.* (2005), s'il apparaît que les plantes souffrant d'un manque d'eau accumulent moins rapidement les fructanes que des plantes bien irriguées en début de croissance, la situation s'inverse par la suite si bien qu'à la récolte il n'y a pas de différence significative dans les rendements en sucres.

De nouveau ces observations sont en contradictions avec celles réalisées par Schittenhelm (1999) qui a quant à lui observé une perte de rendement à la récolte (sur des plants de même âge) pour les plantes souffrant d'un déficit hydrique.

Les auteurs se rejoignent par contre sur le fait qu'il semble qu'un déficit hydrique n'ait pas d'influence sur le degré de polymérisation des chaînes d'inuline.

4.8.2 Impacts de l'engorgement du substrat sur la chicorée à inuline

Il semble qu'il n'existe pas dans la littérature actuelle de résultats d'expériences relatives aux effets d'un engorgement du substrat sur la chicorée à inuline. Il existe par contre des travaux évaluant l'impact d'un excès d'eau sur la physiologie et le rendement de plantes qui, comme la chicorée, accumulent des fructanes. Il s'agit en particulier de 2 études

menées par Albrecht et son équipe en 1997 et 2004. Ces derniers ont étudié l'impact du flooding stress sur deux espèces de myosotis et deux espèces de séneçons (1997 ; une espèce sensible et une tolérante dans les 2 cas) ainsi que sur du blé (2004).

4.8.2.1 Effets sur les parties aériennes et racinaires

De la première étude d'Albrecht *et al.* (1997), il ressort que l'hypoxie a eu un impact plus marqué sur la croissance des parties racinaires par rapport à la croissance des parties aériennes. Le manque d'oxygène à proximité des racines a en effet rapidement bloqué la croissance de cet organe, principalement pour les espèces sensibles.

4.8.2.2 Effets sur la photosynthèse

Dans les 2 expériences, une diminution rapide de la photosynthèse a été observée. Dans l'étude de 2004, Albrecht *et al.* montrent que cette réduction du taux de photosynthèse intervient malgré une bonne fixation du CO₂. Cette réduction pourrait alors s'expliquer par le fait qu'en cas de manque d'oxygène, le transport du saccharose dans le phloème est ralenti (Dongen *et al.*, 2003). Ceci explique à la fois l'accumulation de fructanes observée au niveau des parties aériennes (voir par la suite) ainsi que la réduction de photosynthèse.

4.8.2.3 Effets sur le rendement en sucres et le DP des chaînes d'inuline:

Pour ce qui est des sucres, c'est principalement la concentration en fructanes qui a été affectée par le manque d'oxygène au niveau des racines. Pour leurs deux études, Albrecht *et al.* ont observé une augmentation des concentrations en fructanes chez les plantes stressées, à la fois dans les racines et les feuilles. Selon ces mêmes auteurs, c'est la diminution de la demande en métabolites, consécutive à la diminution de croissance, qui provoque un excès de sucres. Au-delà d'une certaine limite, ces excès de sucres entraînent la synthèse de fructanes (Albrecht *et al.*, 2004). Il est à noter qu'en cas de ré-hydratation du milieu, les fructanes sont rapidement mobilisés et métabolisés afin de relancer la croissance racinaire stoppée par la contrainte. Il s'agit donc d'un stockage temporaire.

En cas d'absence complète d'oxygène au niveau racinaire (anoxie), les auteurs ont alors constaté la mort des plantes après 3 jours. Aucune accumulation de fructanes n'est observée. Cependant, si une diminution progressive de la teneur en oxygène est effectuée au début de l'expérience

avant la période d'anoxie (au lieu d'une anoxie brutale), une accumulation de fructanes est alors observée. Ceci suggère que l'induction de la synthèse de fructanes requiert un minimum d'oxygène (Albrecht *et al.*, 2004).

Pour ce qui est du degré de polymérisation des chaînes d'inuline, les plantes ayant souffert d'hypoxie présentent des degrés de polymérisation plus importants de leurs chaînes d'inuline que les plantes témoins (Albrecht *et al.*, 1997 & Albrecht *et al.*, 2004).

Rappel des objectifs

Vous trouverez ci-dessous (Fig. 22) une vue schématique des principaux objectifs énoncés précédemment. Il s'agira des questions fondamentales auxquelles nous chercherons à répondre au travers des chapitres qui suivent.

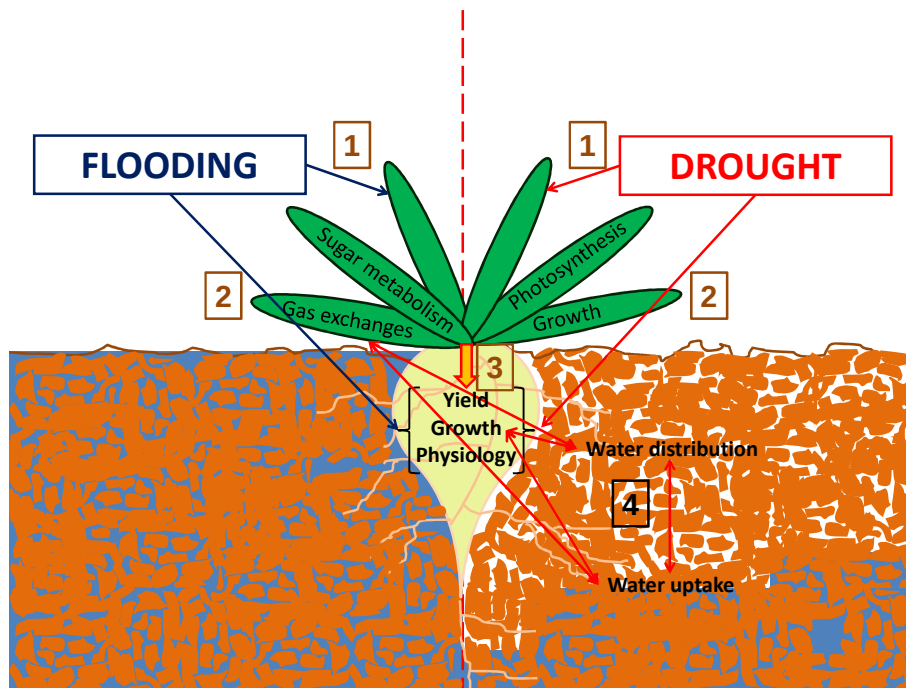


Figure 22 : Schéma décrivant les grands volets du travail.

1: Quel est l'impact des conditions hydriques de l'environnement sur la croissance, les échanges gazeux, la photosynthèse et le métabolisme des sucres pour les feuilles des chicorées ?

2: Quelles sont les conséquences de conditions hydriques contrastées sur le rendement, la croissance et la physiologie (activités enzymatiques, stress oxydatif,...) des racines de chicorée ?

3: Sur base des mesures physiologiques réalisées (enzymologie, teneurs en sucres, rendement,...) est-il possible de comprendre et quantifier les relations feuilles/racine ? La translocation des sucres est-elle affectée par

les conditions hydriques du substrat ? L'un des deux compartiments est-il privilégié ? Qu'en est-il des flux en général ?

4: Sur base des mesures hydrogéophysiques sur le substrat, est-il possible de suivre l'évolution de la distribution en eau dans le sol et de caractériser la distribution spatio-temporelle de la prise d'eau par les plantes ? Quel est l'impact de la distribution de l'eau et de la prise d'eau sur la croissance racinaire, la distribution des racines, l'état de stress et la transpiration de la plante ?

D'une manière générale, nous chercherons à savoir si la chicorée est agronomiquement tolérante aux stress abiotiques qui lui seront appliqués. Nous suivrons pour cela l'évolution de sa masse racinaire et de son rendement final en inuline.

Chapitre 1

Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. *sativum*) independently of photosynthesis

Journal of Experimental Botany, published on line, May 10 2012:
doi: 10.1093/jxb/ers095

Vandoorne B^{1,4}, Mathieu A-S¹, Van den Ende W³, Vergauwen R³, Périlleux C², Javaux M^{4,5} and S. Lutts¹.

1. *Groupe de Recherche en Physiologie Végétale (GRPV), Earth and Life Institute – Agronomy (ELI-A), Université catholique de Louvain, 5 (Bte 13) Place Croix du Sud, 1348 Louvain-la-Neuve ; Belgium.*
2. *Département des Sciences de la Vie, Physiologie Végétale, Bât. B22 Physiologie végétale, boulevard du Rectorat 27, 4000 Liège ; Belgium.*
3. *Laboratory of Molecular Plant Physiology, Institute of Botany and Microbiology, Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 31, 3001 Leuven-Heverlee ; Belgium.*
4. *Earth and Life Institute – Environmental Sciences (ELI-E), Université catholique de Louvain, 2 (Bte 2) Place Croix du Sud, 1348 Louvain-la-Neuve ; Belgium.*
5. *Agrosphere (IBG-3), Institut für Bio- und Geowissenschaften - Forschungszentrum Juelich GmbH, Juelich ; Germany*

Abstract

Root chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*) is a cash crop cultivated for inulin production in Western Europe. This plant can be exposed to severe water stress during the three last months of its six months growing period. The aim of this study was to quantify the effect of a progressive decline in water availability on plant growth, photosynthesis and sugar metabolism and to determine its impact on inulin production. Water stress drastically decreased root fresh and dry weight, leaf number, total leaf area and stomatal conductance. Stressed plants, however, increased their water use efficiency and leaf soluble sugar concentration, decreased the shoot to root ratio and lowered their osmotic potential. Despite a decrease in photosynthetic pigments, the light phase of the photosynthesis remained

unaffected under water stress. Water stress increased sucrose phosphate synthase (SPS) activity in the leaves, but not in the roots. Water stress inhibited sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST) and fructan:fructan 1 fructosyltransferase (1-FFT) after 19 weeks of culture and slightly increased fructan 1-exohydrolase activities (1-FEH). The root inulin concentration expressed on a dry weight basis and the mean degree of polymerisation (DP) of the inulin chain remained however unaffected by water stress. It is concluded that root chicory displayed resistance to water stress, but that such a resistance is obtained at the expense of growth which, in turn, leads to a significant decrease in inulin production.

Key words: *Cichorium intybus*, drought, growth, inulin, photosynthesis, root chicory, sugar metabolism, water deficit, water stress

Introduction

Cichorium intybus var. *sativum* is a biannual crop cultivated mainly in Western Europe and, to a lower extent in other parts of the world to produce inulin. This is a linear β (2,1)-type fructan that is widely used as a prebiotic agent with antioxidant properties (Stoyanova *et al.*, 2011). Inulins selectively stimulate “good bacteria” (such as Bifidobacteria and Lactobacillae) in the colon. In this way they contribute to overall good health and aim at disease prevention (Roberfroid and Delzenne, 1998). During the growing season (first year), inulin is stored in the chicory tap roots as a reserve component. In natural conditions, this reserve allows chicory to survive winter and accomplish its reproductive cycle during the second year (Van Laere and Van den Ende, 2002). Fructans are also known to protect cells from desiccation during water stress, in line with their role as membrane stabilizers (Hendry, 1993; Valluru and Van den Ende, 2008). Water stress leads to increased fructan contents in numerous plant species (Spollen and Nelson, 1994; Volaire and Lelièvre, 1997; Kerepesi *et al.*, 1998), as well as in bryophytes (Marschall *et al.*, 1998). According to Pilon-Smits *et al.* (1995), transgenic tobacco containing fructans exhibit an improved resistance to water deficit compared to the wild-type.

Inulin synthesis is initiated by sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) catalyzing the transfer of a fructose moiety between two sucrose molecules to produce the trisaccharide 1-kestose and glucose. Fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) transfers fructan moieties from and to 1-kestose or larger fructans, resulting in the formation of oligofructose and inulin with higher degree of polymerization (DP). Conversely, inulin degradation implies a sequential removal of fructose unit catalyzed by fructan 1-exohydrolases (1-FEHs; EC 3.2.1.153)

(Van Laere and Van den Ende, 2002). The mean degree of polymerisation (DP) of the inulin chain is an important component of root chicory production, higher DP being more suitable for industrial applications (Wilson *et al.*, 2004).

According to the Intergovernmental Panel on Climate Change, scenarios with drier summer are expected to occur in Western Europe in the following decades (IPCC, Fourth Assessment Report). In several parts of the world, root chicory is now cultivated under irrigation but a better knowledge of the plant behaviour under water stress conditions should allow to define the minimal water requirements of this species and to extend the culture to regions where irrigation is not technically feasible or economically justified. Although responses to low temperature have been extensively studied in this species, mainly in relation to vernalization (Dielen *et al.*, 2005; Devacht *et al.*, 2009; Mingeot *et al.*, 2009), the impact of water stress received less attention. De Roover *et al.* (2000) studied the impact of water stress at the seedling stage and demonstrated that water shortage increased glucose, fructose and sucrose concentrations in roots and leaves of stressed plants, leading to a strong increase of fructan concentrations in the roots. Using a field approach, Monti *et al.* (2005) demonstrated that water shortage had only a limited impact on yield. Indeed, they reported that leaf photosynthetic capacity was poorly affected by water availability and fructan chain length was not affected by water regime. However, only moderate water stress was applied in this study, and enzymes activities involved in inulin metabolism were not quantified. Recently, it was reported that the severity and timing of drought can strongly influence the sequences of plant reaction to water shortage (Muller *et al.*, 2011; Skirycz *et al.*, 2011).

It has been suggested that water stress that impacts on photosynthesis in root chicory is mainly related to non-stomatal effects (Monti *et al.*, 2005). Data are nevertheless still missing on drought impact on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco; EC 4.1.1.39) activities in this species, but this enzyme was shown to be drastically affected in numerous plants species exposed to water shortage (Parry *et al.*, 2002). Although a decline in Rubisco activities is expected to decrease sugar synthesis, water stress often paradoxically increases sucrose content through stimulation of sucrose phosphate synthase (SPS; EC 2.4.1.14) (Fu *et al.*, 2010). It could therefore be considered that the precise sugar status in water-stressed tissues is the ultimate consequence of several interacting factors related to growth inhibition, CO₂ fixation, and enzyme activities involved in sucrose synthesis on the one hand (SPS; EC 2.4.1.14) and sucrose breakdown (acid

and neutral invertases; EC 3.2.1.26) on the other hand. Sucrose synthase (SuSy; EC 2.4.1.13) catalyzes a reversible reaction, but it is usually involved in sucrose breakdown, and generates UDP glucose and fructose.

Soluble sugar concentration may directly influence inulin concentration in root chicory: sucrose was reported to increase expression of the gene coding for 1-SST, thus leading to an increase in the corresponding enzyme activities (De Roover *et al.*, 2000). According to Van Laere A. and W. Van den Ende (2002), vacuolar 1-SST may itself be involved in sink strength determination, thereby contributing to yield maintenance under stress conditions. Conversely, an increase in sucrose was reported to inhibit FEH activities, at least for some isoforms (Verhaest *et al.*, 2007).

The present study was therefore undertaken in order to evaluate the physiological and yield impacts of a strong water stress on root chicory. Plant behaviour was analysed during and after a strong decrease in the soil water content: such a kinetics approach aimed to identify the main morphophysiological parameters contributing to deleterious impact of water stress on inulin production in relation to enzymatic activities involved in sugar metabolism.

Material and Methods

Plant material and growth culture

Seeds of *Cichorium intybus* var. *sativum* (purified line issued from cultivar Crescendo kindly provided by Chicoline – Warcoing) were sown in columns of 55 cm long and 25 cm of diameter. The 21 columns were filled with dry yellow sand and 0.5 dm³ of loam (loam for professionals; DCM N.V., Grobbendonk, Belgium) were added at the top. The mean temperature during the growing season was 23 °C during the 16 hours day and 20 °C during the 8 hours night. The mean relative humidity in the air was 75 % and the light intensity was 135 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (6 Philipps HPI-T; 400 W) at the top of the canopy. Four days after germination, only one plant was maintained in each column. Plants were provided with nutrient solution of pH 5.4 and electrical conductivity of 963 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ containing the following nutrients concentrations 250 μM NH_4NO_3 , 890 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 990 μM KNO_3 , 515 μM KH_2PO_4 , 244 μM $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.415 μM $\text{MnSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 6.45 μM H_3BO_3 , 0.161 μM $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.0125 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.697 μM $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 10.12 μM Fe-EDDHA. In order to avoid evaporation from the soil surface, the top of each column was covered with a

perforated Plexiglas plate allowing only the basal part of the rosette to emerge.

During the experiment, 4 harvests were performed at 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Three plants per treatment were collected at each harvest. The drought stress started 12 weeks after sowing. At this time, plants were distributed in two groups: control and drought stressed plants. Water was supplied to control plants in order to keep volumetric water content (θ_v) between 11 and 19 % (close to field capacity: $\theta_v = 15$ %) throughout the culture period while one fifth of this volume was supplied to stressed plants, permanently exposed to a substrate with less than 3 % of volumetric water content (close to wilting point: $\theta_v = 2$ %) (Fig. 1).

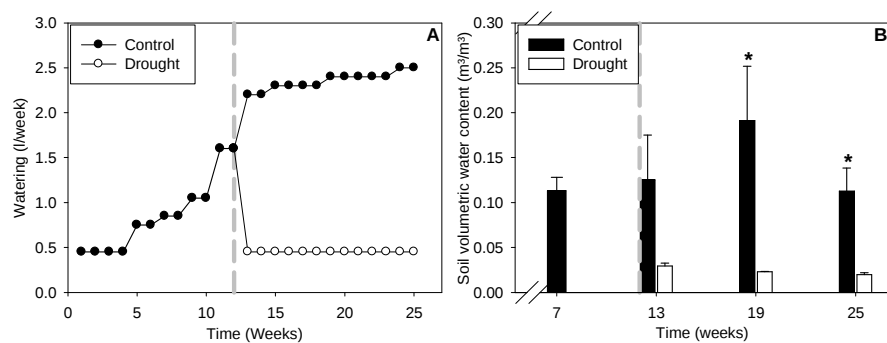


Figure 1: Volume of nutrient solution supplied to each column (in L week⁻¹) (A) and soil volumetric water content (B) during 25 weeks of plant culture for *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions. Filled symbols are for control plants and open symbols for drought stressed plants.

The total leaf area was measured at each harvest on three plants per treatment using a Leaf Area Meter AM300 (ADC Bioscientific, Hertshire, UK). The mean duration required for the macroscopic appearance of a new leaf was calculated by dividing the number of days between two measurements by the number of appearing leaves between measurements.

Plant water status

Water contents were measured on leaf and root after drying the sample in an oven for 72 h at 70 °C. The leaf water potential (ψ_w) was measured at each harvest at mid-day (between 12 a.m. and 2 p.m.) on the fifth and sixth unfolded leaves using a Scholander pressure chamber, considering the youngest unfolded leaf of the rosette as n°1. Osmotic potential ($\psi_{s,raw}$) was measured on a portion of the second fully unfolded leaf with a Vapour

Pressure Osmometer 5520 (Wescor, Logan, USA) and adjusted to the water content of control plants according to Lefèvre *et al.* (2009): $\psi_s = \psi_{s_{\text{raw}}} * (WC_s / WC_{\text{control}})$ where WC_s corresponded to the water content of stressed plants and WC_{control} to the water content of control plants.

The stomatal conductance (g_s) was measured using an AP4 system (Delta-T Devices, Cambridge, UK) on the first unfolded leaf and four other randomly-chosen leaves halfway the photoperiod.

Photosynthesis-related parameters

Chlorophyll fluorescence-related parameters were measured on five plants per treatment by the Fluorescence Monitoring System II (Hansatech Instruments, Norfolk, England) on the second and third unfolded leaves after dark-adaption for 30 min. A first saturating pulse ($18,000 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) was sent to the leaf. A constant intensity of actinic light ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) was thereafter sent for three minutes on the leaf and a second saturating pulse of $18,000 \mu\text{mol m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ was subsequently applied. PS II efficiency (Φ_{PSII}), non-photochemical-quenching (NPQ) and photochemical quenching (q_p) were estimated according to Maxwell and Johnson (2000).

Chlorophyll (Chla and Chlb) and total carotenoid (xanthophylls + β -carotene) concentrations were quantified on three plants per treatment on the sixth fully unfolded leaf in the rosette. Samples (c.a. 150 mg FW) were ground in the dark in 8 ml acetone 80 % and centrifuged at $1,000 g$ for 10 minutes at 4°C . The absorbance of the sample was read at three different wavelengths (663.2, 646.8 and 470 nm) using a spectrophotometer (DU® 640, Beckman Coulter, South Pasadan, USA). Each measurement was repeated three times. The pigments concentrations were calculated according to Lichtenthaler (1987).

Gas exchanges were recorded with an InfraRed Gaz Analyser (IRGA, LCA4 8.7 ADC Bioscientific, Hertshire, UK) using a PLC Parkinson leaf cuvette on intact leaves for 1 min ($20 \text{ records min}^{-1}$), with an air flow of 300 ml min^{-1} . Air taken in the greenhouses was sent in a chamber in which a leaf portion of 6.25 cm^2 was introduced. Net CO_2 assimilation rate (A) and instantaneous transpiration rate (E) were estimated on the second and third fully unfolded leaves. Five plants were measured in each treatment and all measurements were performed at mid-day (between 12 a.m. and 2 p.m.).

For Rubisco determination (EC 4.1.1.39) fresh matter was collected on the third, fourth and fifth unfolded leaves on three plants per treatment,

quickly frozen in liquid nitrogen and homogenized in 4 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.8 containing 0.4 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 12.5% (w/v) glycerol, 15 mM mercaptoethanol and 30 mg PVPP). The extract was centrifuged for 30 s at 10,000 *g* and 4 °C. In order to measure the initial activity, 30 µl of this extract was rapidly added to 970 µl of a reaction buffer consisting of 50 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 2.5 mM ATP, 5 mM phosphocreatine, 0.2 mM NADH, 0.6 mM RuBP, 10 mM NaHCO₃, 6 U.ml⁻¹ phosphoglycerate kinase (PGK; Sigma), 6 U.ml⁻¹ glycerate 3-P dehydrogenase (GAPDH; Sigma) and 20 U.ml⁻¹ phosphocreatine kinase (PCK; Sigma Aldrich, St-Louis, USA). The oxidation of NADH was followed during 3 min at 25 °C by measuring the difference between the absorbance at 340 nm and the absorbance at 400 nm. The total activity was quantified according to the same procedure after an activation period of 10 min in 20 mM MgCl₂ and 10 mM NaHCO₃. The activation ratio was calculated by dividing the initial by the total activities according to Du *et al.* (1996). Two replicates were made for each sample.

Leaf malondialdehyde concentration

The level of lipid peroxidation was measured as 2-thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS), mainly malondialdehyde (MDA), following the modified method of Heath and Packer (1968). Portions of leaves (250 mg FW) were ground in liquid nitrogen with 5 ml of a solution of TCA 5% and glycerol 1.25%. The homogenate was centrifuged at 4 °C, 6,700 *g* for 10 min and then filtered on Whatman paper N°1 filter paper. Two ml of the supernatant were then mixed with 2 ml TBA 0.67%. The samples were incubated at 100 °C for 30 min and then immediately transferred on ice for 5 min and centrifuged at 4 °C, 6700 *g* for 1 min. The supernatant absorbance was read at 532 nm and values corresponding to non-specific absorption (600 nm) were subtracted. Malondialdehyde concentration was calculated using its molar extinction coefficient ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Sugar concentration

Portions of the third, fourth and fifth unfolded leaves (ca. 300 mg FW) collected on three plants per treatment were ground in liquid nitrogen, mixed with 7 ml ethanol 70 % (w/v) for 5 min on ice and centrifuged for 10 min at 6,700 *g*, 4 °C; 200 µl of the supernatant reacted with 1 ml anthrone solution (0.5 g anthrone + 250 ml H₂SO₄ 95% + 12,5 ml distilled water) and the absorbance was read at 625 nm (Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) for total soluble sugar quantification according to

Yemm and Willis (1954). A calibration curve was established using glucose as standard.

The remaining supernatants were dried in a thermomixer using nitrogen (45 minutes at 50 °C) and sugars were derivatized using 200 µl of an oxylation solution (hydroxylamine chlorhydrate dissolved in a pyridine solution): 100 µl of hexamethyldisilazane (HMDS) and 10 µl of trifluoroacetic acid (TFA) were added to the samples. Mono-, di- and trisaccharide concentrations were specifically determined by gas chromatography (Perkin Elmer, Autosystem XL, MN Optima – 5 – Accent – 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 µm, Waltham, USA) using helium as a carrier gas at a flow rate of 1 ml.min⁻¹. The injector and FID detector temperatures were 270 °C and 310 °C respectively. Oven temperature was held at 120 °C for 3 min and then programmed to 230 °C at 3 °C.min⁻¹. It was kept at this temperature for 12 min, then re-programmed to 300 °C at 20 °C.min⁻¹ and held for 15 min.

In order to extract sugars and enzymes from the roots, 30 g of root material was ground in 30 ml 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 containing 100 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM NaHSO₃, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride, 1 mM mercaptoethanol and 0.1 % Polyclar® (Serva, Heideberg, Germany). Two ml were incubated at 90 °C for 15 min. After cooling at room temperature, the extract was centrifuged at 3,000 g for 5 min and 700 µl of the supernatant were purified on a column with two ion exchange resins (1ml Dowex® - 50 H⁺ and 1 ml Dowex® -1-acetate). Finally, 25 µl of the neutralized fraction was analysed by HPAEC-PAD (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) in order to determined the sugar content after separation on a CarboPac® PA1 anion exchange column and detection by a pulsed amperometric detector equipped with a gold electrode (potentials: E₁: + 0.05 V; E₂: +0.6 V; E₃: -0.8 V). The flow rate was 1 ml.min⁻¹. The elution conditions were 90 mM NaOH over a 60 min period. The column was regenerated with 1 M NaOH for 10 min and equilibrated for 20 min after each run. Quantification was performed on the peak areas with the external standards methods for glucose, fructose, sucrose, 1-kestose and 1,1-nystose (Van den Ende *et al.*, 1996). In parallel, 25 µl of the neutralized fraction was mixed with 6 N HCl in order to completely depolymerize all the inulin in its single components (glucose and fructose). The extract was analyzed using the same HPAEC-PAD technique.

The mean degree of polymerization (DP) is calculated according to a formula adapted from Baert (1997)

$$DP_{mean} = \frac{F_{hydrol} - F_{free} - S_{free}}{G_{hydrol} - G_{free} - S_{free}} + 1$$

where F_{hydrol} and G_{hydrol} are the concentrations in fructose (F) and glucose (G) after the hydrolysis with HCl and, F_{free} , G_{free} and S_{free} are the concentrations of free fructose (F), glucose (G) and sucrose (S).

The percentage of inulin in the root was estimated using a formula adapted from Baert (1997):

$$Percentage_{inul} = \frac{(F_{hydrol} - F_{free} - S_{free} + G_{hydrol} - G_{free} - S_{free}) * (180 - \frac{18 * (DP_{mean} - 1)}{DP_{mean}})}{10000 * (1 - WC)}$$

considering that each addition of one fructose unit to the inulin chain induces the loss of one molecule of water (18 g.mole^{-1}).

Sugar metabolizing enzymes

Root sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99), fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100), and fructan 1-exohydrolase (1-FEH, EC 3.2.1.153) activities were determined according to Van den Ende *et al.* (1996) on three plants per treatment. Five ml of the extraction buffer containing the extract were centrifuged for 2 min at 10,000 *g* and two aliquots (2 ml each) were mixed with 4 ml of saturated ammonium sulfate. After 30 minutes at 0 °C, the pellet was centrifuged at 40,000 *g* for 15 min and washed with ammonium sulfate 80 % (w/v). Then it was centrifuged again under the same conditions and suspended in 500 µl Na-acetate buffer, 50 mM, pH 5.0 and then centrifuged for 2 min at 10,000 *g*. The enzymes 1-SST and 1-FEH were incubated with their substrate at 30 °C (100 mM sucrose for 1-SST and 1 % inulin for 1-FEH) for 0, 20, 40 and 60 min for 1-SST and for 0, 40, 80, 120 min for 1-FEH. The 1-FFT enzyme was incubated with 10 mM 1-kestose on ice for 0, 20, 40 and 60 min. The reactions were stopped by incubating the samples at 95 °C for 5 min. The enzyme activities were determined by product quantification (1-kestose for 1-SST, 1,1-kestotetraose for 1-FFT and fructose for 1-FEH) with HPAEC-PAD (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Sucrose Phosphate Synthase (SPS; EC 2.4.1.14), Sucrose Synthase (SuSy; EC 2.4.1.13), and invertases (acid and neutral – EC 3.2.1.26) activities were

determined in leaves and roots. For this purpose, 700 mg of material were combined with 3.5 ml of extraction buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 containing 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM NaHSO₃, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride, 1 mM mercaptoethanol and 0.1 % Polyclar® ;Serva, Heideberg, Germany) for leaves, and 5 g of material were combined with 5 ml of extraction buffer for roots. The extract was then centrifuged for 5 min at 10,000 *g* and 4 °C. Two aliquots (1.5 ml each) were mixed with 6 ml of saturated ammonium sulfate. After 30 min at 0 °C, the pellet was centrifuged at 40,000 *g* for 15 min, washed with 80 % (w/v) ammonium sulfate and centrifuged as before. The obtained pellet was then resuspended in 3 ml 50 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.5, also containing 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂ and 2 mM EDTA. Sucrose-phosphate-synthase (SPS) activities were determined according to Huber *et al.* (1991). Sucrose synthase (SuSy) and invertase activities were assessed according to King *et al.* (1997) with slight modifications consisting in the use of 3:5-dinitrosalicylic acid (DNSA) solution (45 mM DNSA, 10% NaOH, 1 M potassium sodium tartrate) to stop the reaction after incubation. Protein concentration in the extract was estimated according to Bradford (1976) using bovin serum albumin as standard.

Statistical treatment of the data

At each harvest, three plants per treatment were analyzed, except for non-destructive physiological analysis where 5 plants per treatment were used. The experiment was repeated twice and exhibited similar trends. Data presented hereafter are from one representative experiment. The statistical analysis was performed using the SAS software (SAS System for Windows, version 9.1). The normal distributions of the data were analyzed using a Shapiro-Wilk test. When needed, the data were transformed in order to have a normal distribution.

Data were then subjected to an analysis of variance (ANOVA I) considering the presence or absence of stress as factor. The statistical significance of the results was analyzed by the Student-Newman-Keuls test at the 5 % level.

Results

Growth parameters

Drought drastically decreased the rate of leaf appearance in the rosette, throughout the stress period: the mean duration required for the macroscopic appearance of a new leaf was always higher in stressed plants than in controls (Fig. 2A).

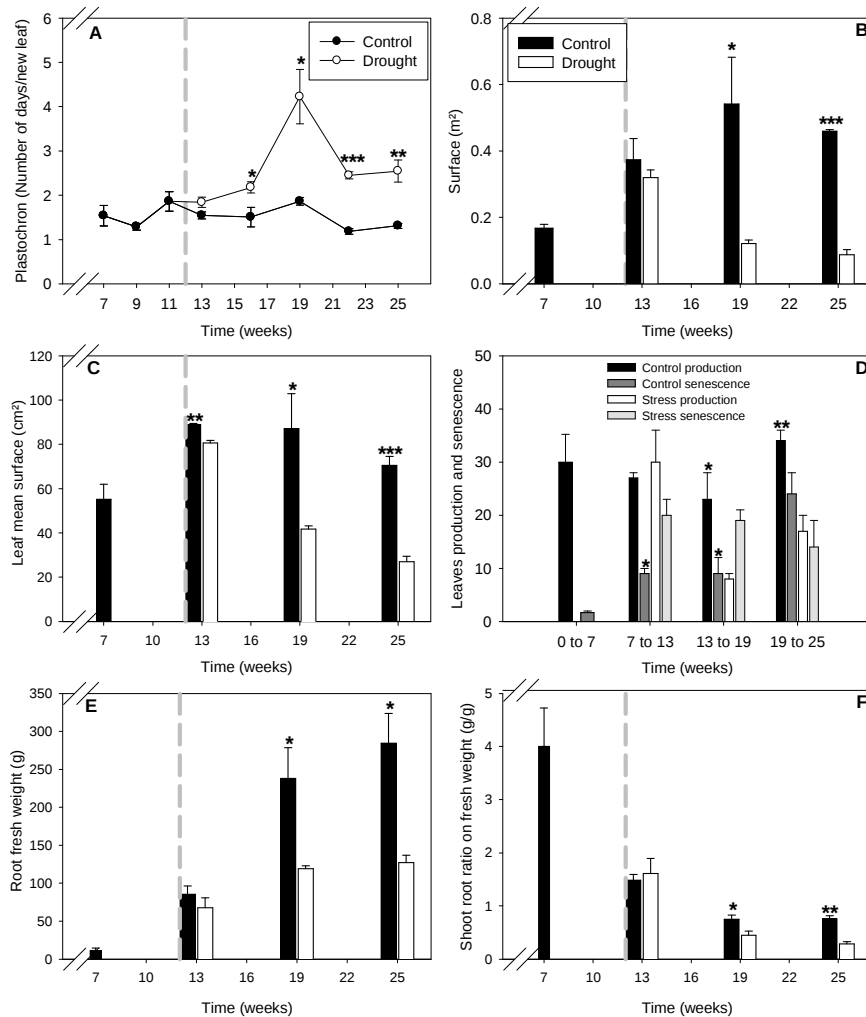


Figure 2: Evolution of the duration required for the macroscopic appearance of a new leaf (A), total leaf surface (B), leaf mean area (C) leaf abscission and senescence (D), root fresh weight (E) and shoot-to-root ratio (F) in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Non-destructive measurements for duration required for the macroscopic appearance of a new leaf were made 7, 9, 11, 13, 16, 19, 22 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for drought stressed plants. Each value is the mean of 3 replicates and vertical bars are the standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

The total leaf surface was lower in stressed plants than in controls (Fig. 2B), as a result of a lower number of leaves but also as a consequence of a strong decrease in the leaf mean area (Fig. 2C). The total leaf surface even decreased from week 13 to week 19 as a result of stress-induced senescence leading to leaf abscission (Fig. 2D). The specific leaf area (SLA) was significantly lower in stressed plants (148.9 ± 14.8 and 170.4 ± 7.5 cm² g⁻¹ DW after 19 and 25 weeks, respectively) than in controls (257.8 ± 10.6 and 222.6 ± 17.2 cm² g⁻¹ DW after 19 and 25 weeks). The mean root fresh weight was also clearly lower in stressed plants with a weight decrease of more than 50% at the end of the stress period comparatively to controls (Fig. 2E). The shoot/root ratio decreased from week 7 to week 19, and thereafter remained constant for controls. At the end of the experiment, this ratio was two times higher in control plants compared to stressed plants (Fig. 2F), suggesting that shoot growth was more inhibited than root growth under water shortage conditions. The ratio of the total leaf area/root dry weight was more than two times lower in stressed plants than in controls after 19 weeks (8.6 ± 1.1 in controls versus 3.5 ± 0.5 in stressed plants) and after 25 weeks (7.1 ± 1.6 in controls versus 2.3 ± 0.3 in stressed plants).

Plant water status

Water content (Fig. 3A) was lower in roots than in leaves and remained higher in control than in stressed plants. Among treatments, no significant difference was recorded for the leaf water potential (ψ_w) (Fig. 3B). In contrast, both leaf and root osmotic potentials (ψ_s) were lower in stressed plants than in controls (Figs 3C and D).

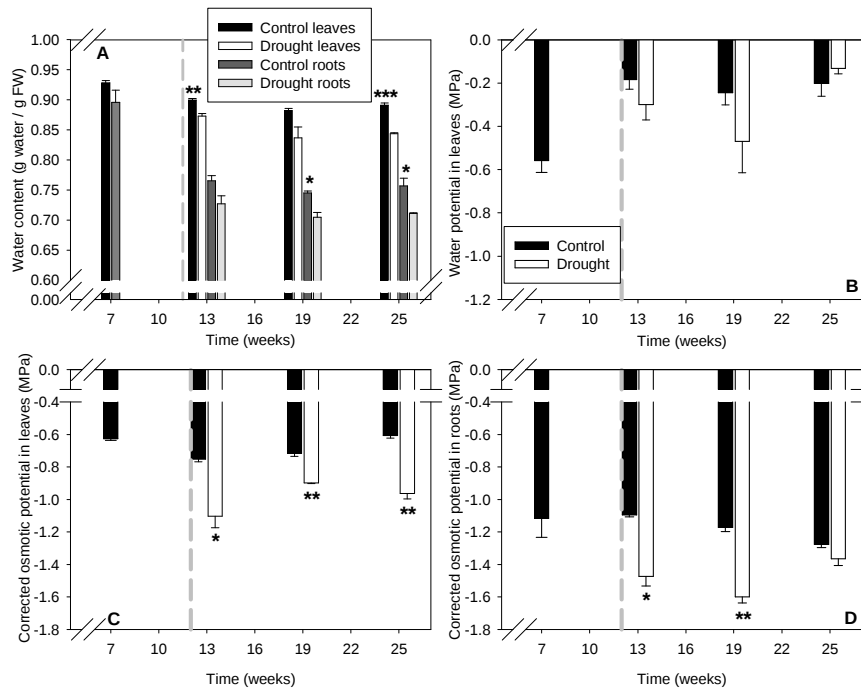


Figure 3: Evolution of leaf and root water content (A), leaf water potential (B), corrected leaf osmotic potential (C) and corrected root osmotic potential (D) in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). The osmotic potentials were adjusted to the water content of control plants. Water stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for drought stressed plants. Each value is the mean of 3 replicates and vertical bars are the standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

As far as root ψ_s is concerned, difference was not significant at the end of the treatment. Drought had a strong deleterious impact on the global stomatal conductance (g_s) of chicory leaves, which was lower in drought-stressed plants than in controls (Table 1).

Table 1: Evolution of the stomatal conductance (g_s) and gas exchanges (E and A) in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing and measurements were made 11, 13, 16, 19, 22 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 5 (g_s) or 10 (E and A) replicates and is given with its standard error. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	Stomatal conductance (g_s (mmol _{H2O} .m ⁻² .s ⁻¹))		Net photosynthesis (A (μmol _{CO2} .m ⁻² .s ⁻¹))	
	Control	Drought	Control	Drought
11	71.8 ± 7.5		1.8 ± 0.3	
13	53.5 ± 7.7	31.3 ± 1.8**	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1
16	62.8 ± 7.3	31.4 ± 2.9***	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2
19	51.5 ± 6.2	36.2 ± 3.2*	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2
22	55.3 ± 6.8	37.3 ± 4.3*	1.9 ± 0.3	1.9 ± 0.3
25	65.0 ± 10.2	29.3 ± 4.8**	2.1 ± 0.4	2.1 ± 0.4
Week	Instantaneous transpiration (E (mmol _{H2O} .m ⁻² .s ⁻¹))			
	Control	Drought		
11	0.8 ± 0.1			
13	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1		
16	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1*		
19	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1		
22	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1		
25	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1		

Gas exchange and photosynthesis-related parameters

It is noteworthy that neither the instantaneous transpiration (E ; Table 1) nor the net photosynthesis (A , Table 1) of young leaves were affected in response to drought.

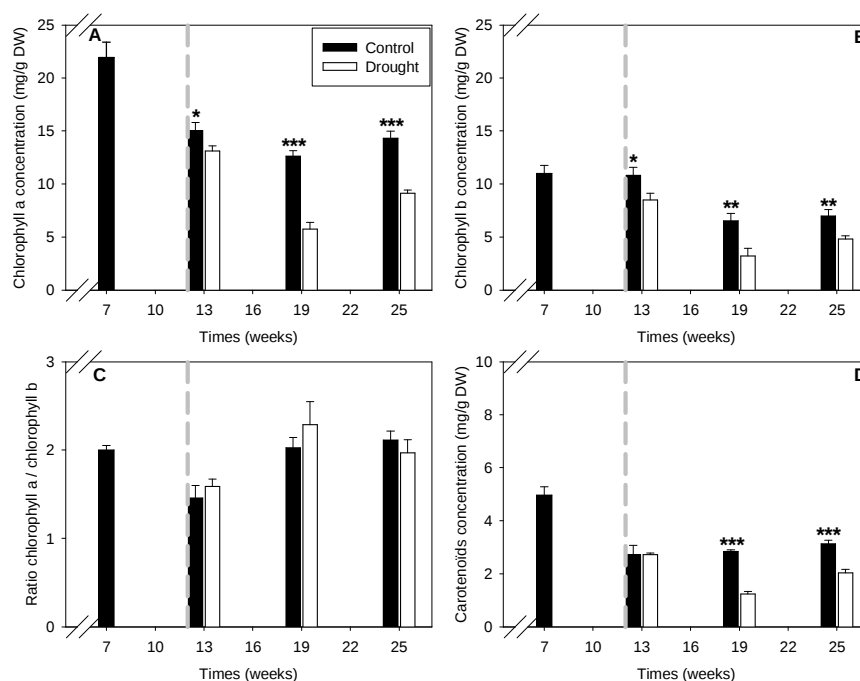


Figure 4: Evolution of chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), chlorophyll a/chlorophyll b ratio (C) and carotenoids concentration (D) in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled bars are for control plants and open bars for drought stressed plants. Each value is the mean of 3 replicates and vertical bars are the standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

At week 19, net photosynthesis was even higher in stressed plants than in controls, while difference between treatments remains statistically not significant for other periods of stress. Chlorophylls concentrations (Figs 4A and 4B) decreased in stressed plants but the ratio Chl a/Chl b remained unchanged (Fig. 4C). A similar stress-induced decrease was observed for carotenoids (Fig. 4D).

Despite the recorded changes in photosynthetic pigments concentrations, PSII efficiency was slightly higher in drought-stressed plants (Fig. 5A) than in controls: non photochemical and photochemical quenchings (Figs 5B and C) were respectively lower and higher in stressed plants compared to controls, although the differences among treatments were significant at week 19 only.

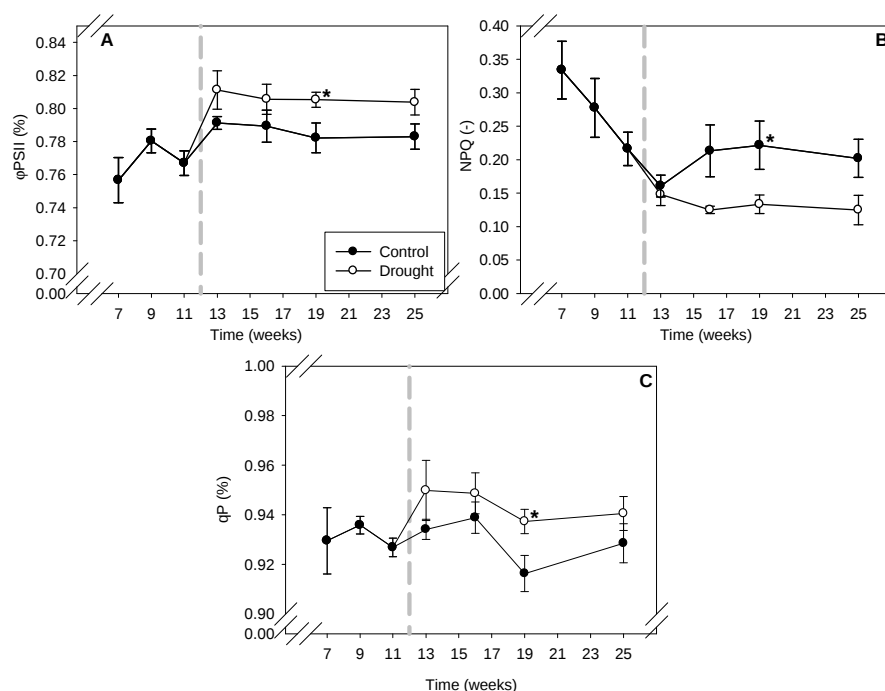


Figure 5: Evolution of photosystem II efficiency (A), non-photochemical quenching (B) and photochemical quenching (C) in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and measurements were made 7, 9, 11, 13, 16, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for drought stressed plants. Each value is the mean of 5 replicates and vertical bars are the standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Rubisco initial and total activities were affected by drought at week 13 and at week 19 (Table 2). Activation state of Rubisco remained similar in control and drought-treated plants.

Table 2: Evolution of the initial and total RUBISCO activities (nmol.mg prot⁻¹.min⁻¹) and activation state (%) in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 6 replicates and is given with its standard error. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	Initial activity (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)		Total activity (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	
	Control	Drought	Control	Drought
7	420.0 ± 21.7		646.4 ± 38.8	
13	423.0 ± 46.5	254.2 ± 48.3*	637.5 ± 64.7	396.4 ± 67.2*
19	377.7 ± 83.3	171.3 ± 22.6*	621.1 ± 119.7	317.7 ± 36.7*
25	146.8 ± 24.3	136.2 ± 17.5	241.2 ± 42.2	245.9 ± 40.0
Week	Activation state (%)			
	Control	Drought		
7	65.6 ± 3.3			
13	59.8 ± 4.7	396.4 ± 67.2*		
19	58.4 ± 1.7	317.7 ± 36.7*		
25	63.8 ± 5.9	245.9 ± 40.0		

Malondialdehyde, soluble sugars and inulin concentrations

The leaf MDA concentration (Fig. 6A) increased in response to water shortage after 19 and 25 weeks of culture. The root MDA concentration was similar in control and drought-treated plants, except at week 19 when it was significantly higher in the latter than in the former. Water stress also drastically increased the leaf total soluble sugar concentration (Fig. 6B), which culminated at the beginning of the stress exposure at week 13 and then gradually decreased until the end of the treatment.

As indicated in Table 3, drought increased the endogenous concentration of glucose, fructose, sucrose, galactose and myo-inositol in leaves at week 13 and 19, while sucrose accumulated in response to drought also at week 25. Mannose and raffinose were also detected in our leaf samples but remained unaffected in response to drought (detailed data not shown). Soluble sugars (glucose, fructose, sucrose, kestose and nystose) concentrations were not affected by water stress in the roots (detailed data not shown).

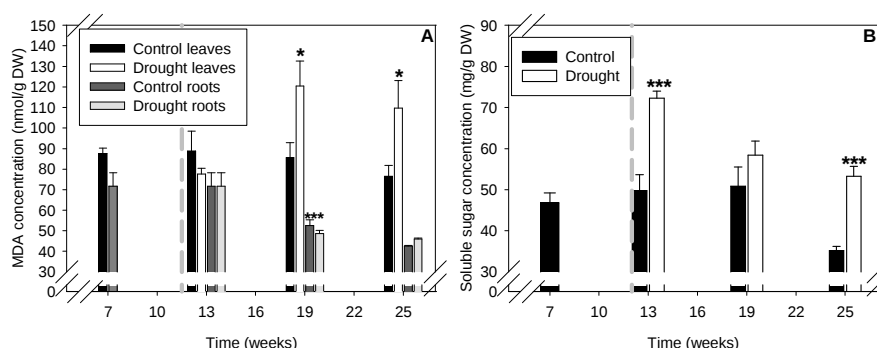


Figure 6: Evolution of root and shoot Malondialdehyde concentration (A) and leaf total soluble sugars (B) in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for drought stressed plants. Each value is the mean of 3 replicates and vertical bars are the standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Root inulin concentration was also quantified at the different harvests (Table 4). It remained unaffected when expressed on a dry weight basis. This however implies that inulin concentration expressed on a fresh weight basis was higher in stressed plants than in controls at the end of the treatment (Table 4). Considering the previously-mentioned root growth inhibition, the total amount of inulin produced per plant was $54.3 \text{ g plant}^{-1}$ and $28.5 \text{ g plant}^{-1}$ for controls and stressed plants, respectively: assuming a plant density of $150,000 \text{ plant ha}^{-1}$ in field conditions, such a water stress would imply a loss of inulin yield corresponding to 3.8 T ha^{-1} . The mean DP remained unaffected in water-stressed plants compared to controls (Table 4). Since the columns could be considered as closed systems, and since the volume of solution supplied to each column was registered during the time-course of the experiment, we were able to estimate the water use efficiency. The synthesis of 1 g of root dry matter required $405 \pm 62 \text{ ml}$ of solution in control plants and only $244 \pm 32 \text{ ml}$ in stressed ones. Similarly, the synthesis of 1g of inulin required $551 \pm 30 \text{ ml}$ of nutrient solution in controls for only $354 \pm 62 \text{ ml}$ in stressed plants.

Table 3: Evolution of the free glucose, fructose, sucrose, galactose and myo-inositol concentrations in leaves of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 3 replicates and is given with its standard error. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	Glucose ($\mu\text{mol} \cdot (\text{g DW})^{-1}$)		Fructose ($\mu\text{mol} \cdot (\text{g DW})^{-1}$)	
	Control	Drought	Control	Drought
7	21.9 $\pm$ 9.8		5.4 $\pm$ 1.3	
13	9.7 $\pm$ 3.3	48.9 $\pm$ 8.4*	5.1 $\pm$ 2.1	20.0 $\pm$ 5.6*
19	16.9 $\pm$ 7.6	59.7 $\pm$ 10.1**	7.0 $\pm$ 3.2	21.4 $\pm$ 5.4*
25	18.4 $\pm$ 6.6	31.3 $\pm$ 8.2	5.1 $\pm$ 2.4	8.4 $\pm$ 3.8
Week	Sucrose ($\mu\text{mol} \cdot (\text{g DW})^{-1}$)		Galactose ($\mu\text{mol} \cdot (\text{g DW})^{-1}$)	
	Control	Drought	Control	Drought
7	44.8 $\pm$ 3.2		0.44 $\pm$ 0.06	
13	47.7 $\pm$ 7.7	81.5 $\pm$ 10.6*	0.47 $\pm$ 0.11	3.54 $\pm$ 1.02*
19	42.4 $\pm$ 10.1	76.0 $\pm$ 6.7*	1.06 $\pm$ 0.24	2.31 $\pm$ 0.16**
25	32.7 $\pm$ 1.3	67.3 $\pm$ 9.2*	0.56 $\pm$ 0.15	1.09 $\pm$ 0.51
Week	Myo-inositol ($\mu\text{mol} \cdot (\text{g DW})^{-1}$)			
	Control	Drought		
7	12.9 $\pm$ 1.3			
13	10.1 $\pm$ 1.4	29.4 $\pm$ 6.1*		
19	5.2 $\pm$ 1.3	12.2 $\pm$ 2.8*		
25	4.4 $\pm$ 0.2	8.1 $\pm$ 3.5		

Table 4: Evolution of the inulin content expressed on dry and fresh weight basis, mean degree of polymerization of the inulin chains (DP) and quantity of inulin in roots of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 3 replicates and is given with its standard error. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	Inulin content (g inulin/100g DW)		Mean degree of polymerization (DP)	
	Control	Drought	Control	Drought
7	75.9 ± 7.4		8.0 ± 0.6	
13	81.1 ± 2.8	77.6 ± 2.1	11.9 ± 0.4	11.2 ± 0.6
19	80.6 ± 3.3	80.6 ± 4.8	12.9 ± 0.3	13.6 ± 0.5
25	79.1 ± 4.8	77.3 ± 1.9	13.4 ± 0.1	14.4 ± 0.6
Week	Inulin content (g inulin/100g FW)		Quantity of inulin in roots (g)	
	Control	Drought	Control	Drought
7	7.0 ± 1.6		0.99 ± 0.54	
13	17.5 ± 0.1	19.4 ± 1.4	16.2 ± 2.2	14.3 ± 2.7
19	19.0 ± 1.0	22.1 ± 2.0	48.7 ± 7.8	28.5 ± 2.7*
25	17.6 ± 0.2	20.6 ± 0.5**	54.3 ± 7.3	28.5 ± 3.0*

Sugar metabolizing enzymes

Water stress had no impact on the protein concentration, whatever the considered duration of stress (detailed data not shown). Water stress increased leaf SPS activity, as shown in Fig. 7A. In contrast, water stress had no significant impact on leaf SuSy activities (Fig. 7B). Acid invertase activities were higher in stressed leaves than in controls (Fig. 7C) at week 13. This enzyme activity exhibited an obvious burst at week 25, although no difference was recorded between control and stressed plants at this time. As far as leaf neutral invertase is concerned (Fig. 7D), the only difference between treatments was recorded at the end of the experiment, where drought-stressed plants exhibited a lower activity than controls. SPS, SuSy and invertases activities were also measured in roots: these enzyme activities decreased with the root age, but water stress had no impact on these activities compared to controls (detailed data not shown).

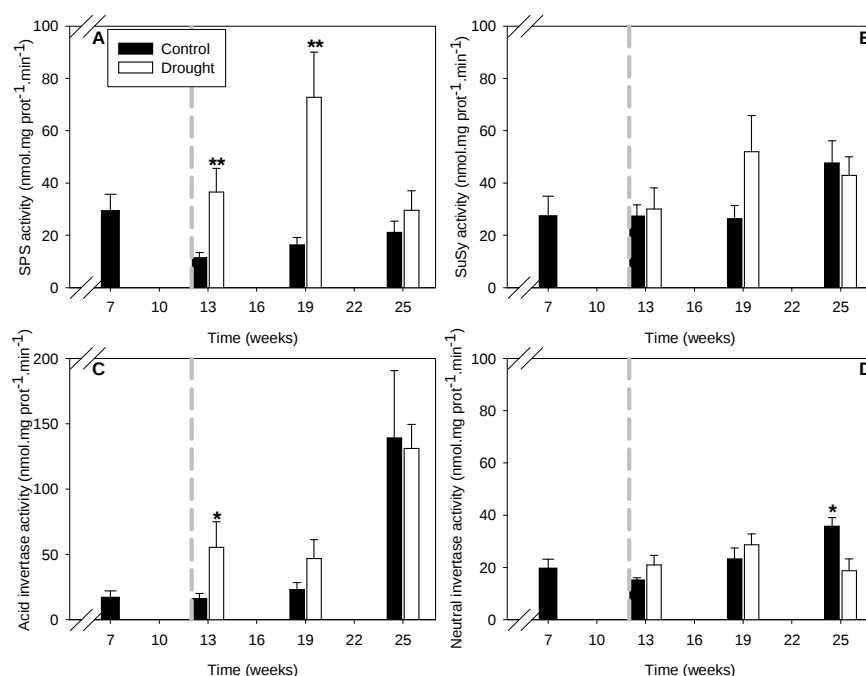


Figure 7: Evolution of leaf sucrose-phosphate-synthase (A), sucrose synthase (B) acid invertase (C) and neutral invertase (D) activities in plants of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for drought stressed plants. Each value is the mean of 3 replicates and vertical bars are the standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Activities of inulin metabolizing enzymes were quantified in roots (Table 5). A high 1-SST activity was recorded already at week 7: it progressively decreased with plant age and to a higher extent in water-stressed plants than in controls. Such a developmental-induced decrease was not recorded for 1-FFT activity which however remained lower in drought-stressed plants than in controls at weeks 19 and 25. An opposite trend was observed for 1-FEH activity which was higher at week 19 and 25 in water-stressed plants than in controls.

Table 5: Evolution of the 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase), 1-FFT (fructan:fructan 1-fructosyltransferase) and 1-FEH (fructan 1-exohydrolase) activities in roots of *Cichorium intybus* exposed to well watered (control) and drought conditions (drought). Water stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 3 replicates and is given with its standard error. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	1-SST (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)		1-FFT (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	
	Control	Drought	Control	Drought
7	157.3 ± 10.1		31.7 ± 4.4	
13	98.4 ± 20.7	80.2 ± 6.2	92.2 ± 2.1	86.2 ± 6.0
19	35.3 ± 9.0	10.0 ± 2.1***	105.1 ± 4.1	76.1 ± 5.8***
25	23.8 ± 13.9	5.7 ± 0.8*	84.1 ± 16.0	63.3 ± 5.7*
Week	1-FEH (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)			
	Control	Drought		
7	11.4 ± 0.9			
13	9.3 ± 2.7	8.7 ± 1.6		
19	5.5 ± 0.5	10.2 ± 1.2***		
25	5.9 ± 0.6	7.6 ± 1.4*		

Discussion

Drought tolerance is a major concern in agronomy and plant research. In numerous studies performed under laboratory conditions, drought tolerance is scored based on an improvement in the survival rate to lethal conditions which are not necessarily relevant from field conditions. Growth inhibition may help the plant to save and to redistribute resources that become limited under stress, but it can also be considered as counter-productive in terms of yield in agriculture (Skirycz and Inzé, 2010 ; Muller *et al.*, 2011; Skirycz *et al.*, 2011). Carbohydrates generated by photosynthesis are major building blocks and energy source for biomass production and maintenance. It thus appears important to determine in cultivated plants whether or not growth inhibition is a consequence of stress-induced decrease in photosynthesis.

As far as root chicory is concerned, the present work clearly showed that growth was strongly affected by drought conditions while photosynthesis exhibits resilience to those environmental constraints. Growth inhibition occurred in both shoots and roots, although the former was more affected

than the latter after 19 and 25 weeks of culture. Drought reduced the number of leaves, as well as the mean leaf area. It may then be hypothesized that the proliferation and subsequent expansion of founder cells recruited from the shoot apical meristem to form new leaves are altered in response to water stress (Beemster *et al.*, 2005).

The leaf net photosynthesis in root chicory is poorly influenced by the water regime when expressed on a surface basis, although a decrease in the specific leaf area may contribute to decrease photosynthesis on a dry weight basis. Stomatal conductance exhibited a weak correlation with net photosynthesis, as also demonstrated by Monti *et al.* (2005). According to these authors, water stress impact on root chicory photosynthesis was mainly due to non-stomatal causes. Our work demonstrates, for the first time in this species, that the efficiency of the light phase was maintained or even increased in stressed tissues, as indicated by a stress-induced decrease in NPQ and increase in q_p and ϕ_{PSII} (Fig. 5). A similar observation was reported in sunflower (Cechin *et al.*, 2008) but the underlying physiological reasons remain poorly documented. Several osmoprotectants are known to protect photophosphorylation and electron transport of chloroplast membranes against desiccation. This is especially the case for galactinol which is produced from galactose and myo-inositol (Nishizawa *et al.*, 2008). These two compounds increased in our stressed leaves (Table 3). Both Rubisco initial and total activities on the one hand, and pigments concentrations on the other hand, were reduced in response to water stress. Such a decrease, however, only had a marginal impact on net photosynthesis, suggesting that both Rubisco and chlorophylls are present in excess in control leaves. Wang *et al.* (2008) also reported that, besides a decrease in the total chlorophyll content, the maintenance of the Chl a/Chl b ratio is an important parameter involved in the stability of light phase of photosynthesis under stress. Response of Rubisco to water stress greatly varies among plant species (Parry *et al.*, 2002). The fact that the activation state was similar in control and stressed plants suggests that water stress did not reduce the *in vivo* activity of Rubisco expressed as a percentage of the carboxylation potential. Nevertheless, this carboxylation potential was clearly reduced by drought (Table 2), which could be related to the binding of inhibitors within the catalytic site of the enzyme.

Plant growth inhibition associated with the maintenance of photosynthesis activity leads to accumulation of soluble sugars within plant cells. This accumulation may have numerous impacts on plant metabolism since sugars play key roles in plants, not only as nutrient but also as signaling and protecting molecules (Bolouri-Moghadadam *et al.*, 2010; Pagter *et al.*, 2011). Total soluble sugars in leaves culminated one week after stress

imposition, and then decreased progressively until week 25, although it remained higher than in controls. The decrease in sugar concentration recorded in control plants is a developmentally-regulated process corresponding to a general decrease of physiological activity occurring at the end of the first year of growth in this biannual plant species, at a time when plants start to cope with late autumn-winter period. Although sugar accumulation in stressed plants correlated with the decrease in osmotic potential, a rough quantitative analysis based on the mean water content and the use of Van't Hoff equation leads us to determine that soluble sugars did not contribute to more than 8% to total lowering of osmotic potential. Other compounds, such as organic acids and proline which may assume key roles in osmotic adjustment (Hummel *et al.*, 2010) were not quantified in the present study.

The accumulation of the non-reducing sucrose did not only result from a passive growth inhibition, but also from an active stimulation of SPS activity (Fig. 6). Moreover, the fact that inulin concentration was not reduced by water stress (see below) indicates that sucrose transport from source leaves to sink roots was not severely hampered under stress. Not only sucrose, but also glucose and fructose accumulated at week 13 and 19 in leaves, at a time when acid invertase and, to a lesser extent, SuSy activities increased in stressed leaves compared to control leaves. Hexokinase is a glucose sensor with separated catalytic and signaling activities (Moore *et al.*, 2003) and the produced glucose may act as a signalling molecule (Rolland *et al.*, 2006). Hummel *et al.* (2010) recently reported that in *Arabidopsis thaliana* exposed to water deficit, rosette relative expansion rate was decreased more than photosynthesis, leading to a more positive C balance, and that water deficit has limited impact and often stimulating effects on enzyme activities. In this latter study, however, root growth was promoted while it was clearly inhibited in *C. intybus*. Such a discrepancy may be related to the pattern of root development which involves organ enlargement after initiation of the tap root, a process which is especially sensitive to water shortage but which does not occur in *A. thaliana*. However, the absence of drought effect on the root sugar content confirms the view of Hummel *et al.* (2010) that there is no global down-regulation of C metabolism under soil water deficit, in contrast to data obtained from drasting protocols involving drying out of the plant or immersion in osmotica (Verslues *et al.*, 2006).

Water stress hastened the leaf senescence process, at least between week 7 and 19 (Fig. 2). It may thus be argued that photosynthesis remained active in only a small proportion of the foliage which, in turn, may influence the

global plant C budget. Stress-induced ethylene oversynthesis is frequently reported to hasten senescence (Lim and Nam, 2005) but may also influence sugar metabolism and leaf development (Kendrick and Chang, 2008; Cho and Yoo, 2009). A slight burst in ethylene synthesis has been noticed in drought-treated root chicory (Lutts, unpublished results). In this species, however, stress-induced senescence mainly concerns the basal part of the rosette and not the most photosynthetically active young leaves. Although the ratio of the total leaf area/root dry weight decreased in response to soil water deficit, a simultaneous decrease in SLA mitigated the stress impact on shoot/root ratio. It is suggested that despite senescing processes, modification in the leaf structure associated with a more efficient photosynthesis light phase allow the plant to maintain sugar synthesis in order to fulfill requirements for reserves accumulation in the roots.

Oxidative stress may also be responsible for hastening senescence. Small soluble sugars and the enzymes associated with their metabolic pathways are connected to oxidative stress and ROS signaling. Although excess sugar production in source leaves may result in the generation of excess cytosolic H₂O₂, endogenous sugar availability may also feed the oxidative pentose phosphate pathway creating reducing power for glutathione production (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010). In the present case, the highest MDA concentration was observed at weeks 19 and 25 (Fig. 6A), at a time when soluble sugars already decreased in stressed leaves, while a low level of MDA was recorded at week 13, when total soluble sugar concentration was the highest, therefore suggesting that sugars may be involved in quenching reactive oxygen species (Couée *et al.*, 2006). Similarly, a low level of MDA in the root of *Cichorium intybus* could be, at least partly, related to the presence of inulin since fructan are efficient in membrane protection against drought and low temperatures (Van Laere and Van den Ende, 2002; Valluru and Van den Ende, 2008).

According to Schittenhelm (1999), water stress is a major factor affecting yield in root chicory. The present work shows that root growth, but no inulin synthesis, was the main parameter involved in the deleterious impact of water shortage. Indeed, in our experimental conditions, inulin concentration remained similar in control and stressed plants. Although *in vitro* activities of the enzymes involved in inulin synthesis (1-SST and 1-FFT) were significantly reduced in stressed plants at week 19 and 25 (Table 5), this has no impact on final inulin concentration (Table 4).

1-SST is involved in the initiation of inulin chain synthesis and its activity regularly decreased from week 7 to the end of the culture. Such a decrease was already mentioned by De Roover *et al.* (2000) and corresponds to a

precise pattern of root development: according to Druart *et al.* (2001), 1-SST is initiated only after a first phase of structural root growth, ending 42 days after seeding. The corresponding enzyme activity culminated 9 weeks after seeding and is involved in sink strength regulation (Améziane *et al.*, 1995). It thereafter decreased progressively until the end of the culture. It can be speculated that water stress effects on 1-SST started at a time when the enzyme activities already decreased and almost all inulin chains are initiated. De Roover *et al.* (2000) noticed that at the seedling stage, the drought-induced stimulation of 1-SST could lead to short term accumulation of fructan in the roots, as recorded two weeks after an abrupt stress imposition. The present work shows, however, that a progressive decline in water availability maintained on a long term basis had no detrimental impact on inulin concentration expressed on a dry weight basis, therefore suggesting that stressed-induced stimulation at the seedling stage should be regarded as transient.

Under our experimental conditions, water stress significantly reduced 1-FFT activity involved in inulin chain elongation. It also slightly increased 1-FEH activity catalyzing inulin chain depolymerization. A decrease in the mean DP of inulin chain was expected but water stress had no significant impact on this parameter (Table 4). The recorded FEH activities in the present study (Table 5) remained rather low comparatively to cold-induced FEH increase (Van Laere and Van den Ende, 2002) and it does probably not significantly contribute to depolymerization *in vivo*. Among the main parameters influencing regulation of inulin-metabolizing enzyme activities, soluble sugars, and especially sucrose, fructose and glucose, are frequently reported in the literature (Van Laere and Van den Ende, 2002; Van den Ende *et al.*, 2004, and references in these studies). The current work was nevertheless unable to detect any significant impact of water stress on the concentration of these compounds within the roots. We may also hypothesize that a phase transition to a gel like state occurs in the vacuole above a certain inulin concentration, which may sequester and inactivate fructan enzymes *in planta* but not *in vitro*.

Beside post-translational regulation, transcriptional regulation has also been reported for inulin-metabolizing enzymes. Kusch *et al.* (2009) recently demonstrated that numerous biochemical factors (including Ca^{2+} signaling, protein kinases and phosphatases) are directly involved in the modulation of expression of 1-FFT encoding gene. Similarly, FEH enzyme activity depends on three distinct isoforms (1-FEHI, IIa and IIb) which may exhibit various patterns of regulation (Van Laere and Van den Ende, 2002 ; Van den Ende *et al.*, 2004 ; Le Roy *et al.*, 2007; Kusch *et al.*, 2009).

It is concluded that *Cichorium intybus* displays a good level of water stress resistance, which could be, at least partly, related to its Mediterranean origin. Plant growth inhibition could be involved in this resistance strategy but leads to a significant decrease in the total inulin production. Nevertheless, the effect of water stress on Rubisco and sugar-metabolizing activities did not lead to modifications in inulin concentration expressed on a dry weight basis. Further experiments are therefore required to identify the major causes of root growth inhibition in this species.

Acknowledgement

This work was supported by Région Wallonne (DGTRE) of Belgium through the subventions D31-1062, D31 – 1123 and D31-1175 and Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS ; conventions n° 1.5.111.10F). The authors are also very grateful to FNRS for the PhD research grant of BV (Aspirant FNRS) and to B. Van Pee, B. Capelle and H. Dailly (CARI – UCL) for the valuable technical assistance.

References

- Améziane R, Limani MA, Noctor G, Morot-Gaudry JF.** 1995. Effect of nitrate concentration during growth and carbon partitioning and sink strength in chicory. *Journal of Experimental Botany* **46**, 1423-1428.
- Baert JRA.** 1997. The effect of sowing and harvest date and cultivar on inulin yield and composition of chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Industrial Crops and Products* **6**, 195-199.
- Beemster GTS, De Veylder L, Vercruysse S, West G, Rombaut D, Van Hummelen P, Galichet A, Griussem W, Inzé D, Vuylsteke M.** 2005. Genome-wide analysis of gene expression profiles associated with cell cycle transition in growing organs of Arabidopsis. *Plant Physiology* **138**, 734-743.
- Bolouri-Moghaddam MR, Le Roy K, Rolland F, Van den Ende W.** 2010. Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal* **277**, 202-207
- Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for determining microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Cechin I, Corniani N, Fumis TD, Cataneo AC.** 2008. Ultraviolet-B and water stress effects on growth, gas exchange and oxidative stress in sunflower plants. *Radiation and Environmental Biophysics* **47**, 405-413.
- Cho YH, Hoo SD.** 2009. Emerging complexity of ethylene signal transduction. *Journal of Plant Biology* **52**, 283-288.

- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A.** 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**, 449-459.
- De Roover J, Vandenbranden K, Van Laere A, Van den Ende W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* **210**, 808-814.
- Devacht S, Lootens P, Roldan-Ruiz I, Carlier L, Baert J, Van Waes J, Van Bockstaele E.** 2009. Influence of low temperatures on the growth and photosynthetic activity of industrial chicory, *Cichorium intybus* L. *Photosynthetica* **47**, 372-380.
- Dielen V, Notté C, Lutts S, Debavelaere V, Van Herck JC, Kinet JM.** 2005. Bolting control by low temperatures in root chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*). *Field Crops Research* **94**, 76-85.
- Druart N, De Roover J, Van den Ende W, Goupil P, Van Laere A, Rambour S.** 2001. Sucrose assimilation during early developmental stages of chicory (*Cichorium intybus* L.) plants. *Planta* **212**, 436-443.
- Du YC, Nose A, Kawamitsu Y, Murayama S, Wasano K, Uchida Y.** 1996. An improved spectrophotometric determination of the activity of Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Japanese Journal of Crop Science* **65**, 714-721.
- Fu JM, Huang BR, Fry J.** 2010. Osmotic potential, sucrose level, and activity of sucrose metabolic enzymes in tall fescue in response to deficit irrigation. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **135**, 506-510.
- Heath RL, Packer L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, 185-188.
- Hendry G.** 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans. A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* **123**, 3-14.
- Huber JL, Hite DRC, Outlaw WH, Huber SC.** 1991. Inactivation of highly activated spinach leaf Sucrose Phosphate Synthase by dephosphorylation. *Plant Physiology* **95**, 291-297.
- Hummel I, Pantin F, Sulpice R, Piques M, Rolland G, Dauzat M, Christophe , Pervent M, Bouteillé M, Stitt M, Gibon Y, Muller B.** 2010. Arabidopsis plants acclimate to water deficit at low cost through changes of carbon usage: an integrated perspective using growth, metabolite, enzyme, and gene expression analysis. *Plant Physiology* **154**, 357-372.
- IPCC, Fourth Assessment Report, Synthesis Report.** 2007. *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the*

- Intergovernmental Panel on Climate Change*. Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A. (Eds.) IPCC, Geneva, Switzerland, pp 104.
- Kendrick MD, Chang C.** 2008. Ethylene signalling: new levels of complexity and regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **11**, 479-485.
- Kerepesi I, Galiba G, Vanilla E.** 1998. Osmotic and salt stresses induced differential alteration in water-soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **46**, 5347-5354.
- King SP, Lunn JE, Furbank RT.** 1997. Carbohydrate content and enzyme metabolism in developing canola siliques. *Plant Physiology* **114**, 153-160.
- Kusch U, Greiner S, Steininger H, Meyer AD, Corbvière-Diviale H, Harms K, Rausch T.** 2009. Dissecting the regulation of fructan metabolism in chicory (*Cichorium intybus*) hairy roots. *New Phytologist* **184**, 127-140.
- Lefèvre I, Marchal G, Meerts P, Corréal E, Lutts S.** 2009. Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany* **65**, 145-152.
- Le Roy K, Verhaest M, Rabilns A, Clerens S, Van Laere A, Van den Ende W.** 2007. N-glycosylation affects substrate specificity of chicory fructan 1-exohydrolase: evidence for the presence of an inulin binding cleft. *New Phytologist* **176**, 317-324.
- Lichtenthaler HK.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350-382.
- Lim PO, Nam HG.** 2005. The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in Arabidopsis. *Current Topics in Developmental Biology* **67**, 49-83.
- Marschall M, Proctor MCF, Smirnoff N.** 1998. Carbohydrate composition and invertase activity of the leafy liverwort *Porella platyphylla*. *New Phytologist* **138**, 343-353.
- Maxwell K, Johnson GN.** 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**, 659-668.
- Mingeot D, Dauchot N, Van Cutsem P, Watillon B.** 2009. Characterisation of two cold induced dehydrin genes from *Cichorium intybus* L. *Molecular Biology Reports* **36**, 1995-2001.
- Monti A, Amaducci MT, Pritoni G, Venturi G.** 2005. Growth, fructan yield, and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) as related to photosynthetic capacity, harvest time and water regime. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1389-1395.
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J.** 2003. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**, 332-336.

- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y.** 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal of Experimental Botany* **62**, 1715-1729.
- Nishizawa A, Yukinori Y, Shigeoka S.** 2008. Galactinol and raffinose as a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology* **147**, 1251-1263.
- Pagter M, Lefèvre I, Arora R, Hausman JF.** 2011. Quantitative and qualitative changes in carbohydrates associated with spring deacclimation in contrasting *Hydrangea* species. *Environmental and Experimental Botany* **72**, 358-367.
- Parry MA, Andralojc PJ, Khan S, Lea PJ, Keys AJ.** 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* **89**, 833-839.
- Pilon-Smits EAH, Ebskamp MJM, Jeuken MJW, Weisbeek PJ, Smeekens SCM.** 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* **107**, 125-130.
- Roberfroid MB, Delzenne NM.** 1998. Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition* **18**, 117-143.
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J.** 2006. Sugar sensing and signaling in plants : conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 675-709.
- Schittenhelm S.** 1999. Agronomic performance of root chicory, Jerusalem artichoke and sugarbeet in stress and non-stress environment. *Crop Science* **39**, 1815-1823.
- Skirycz A, Inzé D.** 2010. More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 197-203.
- Skirycz A, Vandenbroucke K, Clauw P, Maleux K, De Meyer B, Dhondt S., Pucci A, Gonzalez N, Hoeberichts F, Tognetti VB, Galbiati M, Tonelli C, Van Breusegem F, Vuylsteke M, Inzé D.** 2011. Survival and growth of *Arabidopsis* plants given limited water are not equal. *Nature Biotechnology* **29**, 212-214.
- Spollen WG, Nelson CJ.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* **106**, 329-336.
- Stoyanova S, Geuns J, Hideg E, Van den Ende W.** 2011. The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **62**, 207-214.
- Valluru R, Van den Ende W.** 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2905-2916.
- Van den Ende W, De Coninck B, Van Laere A.** 2004. Plant fructan exohydrolases: a role in signaling and defense? *Trends in Plant Science* **9**, 1360-1365.

- Van den Ende W, Mintiens A, Speleers H, Amabilis AO, Van Laere A.** 1996. The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytologist* **132**, 555-563.
- Van Laere A, Van den Ende W.** 2002. Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* **25**, 803-813.
- Verhaest M, Lammens W, Le Roy K, De Ranter C, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W.** 2007. Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor. *New Phytologist* **174**, 90-100.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu JK.** 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal* **45**, 523-539.
- Volaire F, Lelièvre F.** 1997. Production, persistence, and water-soluble carbohydrate accumulation in 21 contrasting populations of *Dactylis glomerata* L. subjected to severe drought in the south of France. *Australian Journal of Agricultural Research* **48**, 933-944.
- Wang B, Li Z, Eneji AE, Tian X, Zhai Z, Li J, Duan L.** 2008. Effects of coronatine on growth, gas exchange traits, chlorophyll content, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in maize (*Zea mays* L.) seedlings under simulated drought stress. *Plant Production Sciences* **11**, 283-290.
- Wilson RG, Smith JA, Yonts CD.** 2004. Chicory root yield and carbohydrate composition is influenced by cultivar selection, planting and harvest date. *Crop Science* **44**, 748-752.
- Yemm EW, Willis J.** 1954. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal* **57**, 508-514.

Inter-chapitres 1 - 2

Arrivé au terme de cette étude, nous avons décidé de poursuivre certaines analyses, notamment en vue de comprendre l'impact du manque d'eau sur l'expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'inuline chez la chicorée. Avec l'aide de Nina Lycops (stagiaire IPL au GRPV) et d'Anne-Sophie Mathieu, nous avons donc comparé les cinétiques d'expression des gènes codant pour 1-SST, 1-FFT et 1-FEH sur les racines des plantes utilisées dans le cadre du chapitre 1.

L'objectif de ce travail était de comprendre si un lien direct pouvait être établi entre l'expression des gènes codant pour les enzymes responsables de la synthèse et de la dégradation de l'inuline et les activités enzymatiques de ces mêmes enzymes mesurées *in-vitro*. En outre, un lien peut-il être établi entre expression génétique et mesures de rendement ?

Les ARNm ont été extraits de fragments de racines conservées à -80 °C, selon un protocole habituel légèrement modifié pour tenir compte de teneurs en sucres importantes susceptibles de compromettre certaines étapes (Lycops, 2012). Après traitement à la DNase et vérification de la qualité des échantillons sur gel, les échantillons d'ARN ont été utilisés pour analyse par RT-PCR. Pour chaque séquence recherchée, une amorce spécifique a été utilisée. Les différents jeux d'amorces utilisés sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Séquences des amorces

<i>Cint UBC sens</i> (175pb) 5'- GGT ATC GGA GAT GGC AC-3'	<i>Cint UBC anti-sens</i> (175pb) 5'- GGA AAC GGA CAG TTG GAG -3'
<i>Cint 1-SST sens</i> (650pb) 5'- ATG GCT TCC TCT ACC ACC-3'	<i>Cint 1-SST anti-sens</i> (650pb) 5'- TTC CAA CTT TCC GGG AAC -3'
<i>Cint 1-FFT sens</i> (650pb) 5'- ATG AAA ACA GCC GAA CCC-3'	<i>Cint 1-FFT anti-sens</i> (650pb) 5'- CTG ATA GTG TTG AGC CGA AG-3'
<i>Cint 1-FEH-II sens</i> (150pb) 5'- ATG GCC TGT TGA GGA GAT TG-3'	<i>Cint 1-FEH-II anti-sens</i> (150pb) 5'- ACA TGT TTT CCC ACC AGC TC-3'

Les amorces 1-SST, 1-FFT et 1-FEH, ont été dessinées par la K.U.Leuven, où les différents gènes ont été identifiés et où ensuite les enchaînements des différents nucléotides ont été déterminés grâce à un séquençage. L'amorce pour l'UBC (ubiquitine C) a été dessinée par notre laboratoire, où ce gène contrôle a été identifié à partir de plantes de la famille des '*Asteraceae*'. Pour toutes les amorces, seulement une partie du gène codant a été

amplifié par PCR, et le nombre de paires de bases ont été mentionnées entre parenthèses dans le tableau 1.

Chaque échantillon testé contenait les éléments repris dans le tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7 : Contenu du mélange PCR

	volume (μl)
dNTP mix 10mM	1
enzyme Dream Taq ADN polymérase 5u/μl	0,5
tampon de réaction 5x	10
amorce sens 100μM	1
amorce anti-sens 100μM	1
H ₂ O	32,5
V_{total}=	46
ADN	4
V_{total final par échantillon}=	50

Pour chaque PCR, le nombre de cycles appliqués est de 27 pour UBC, 1-SST et 1-FFT et de 28 cycles pour 1-FEH. Les différentes températures retenues sont :

- o 94°C 2 min (pré-dénaturation)
- o 94°C 1 min (dénaturation des doubles hélices d'ADN)
- o 57°C 30 sec (hybridation)
- o 72°C 1 min (polymérisation)
- o 72°C 7 min (achèvement de la polymérisation)
- o revenir à 10°C (conservation)

Les résultats de la RT-PCR sont fournis ci-dessous (figure 8). L'expression du gène constitutif codant pour la synthèse d'ubiquitine C (UBC) a été choisie comme base de comparaison. L'ubiquitine C, présente chez tous les eucaryotes, intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que la régulation de la mitose, l'embryogenèse, la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription et l'apoptose.

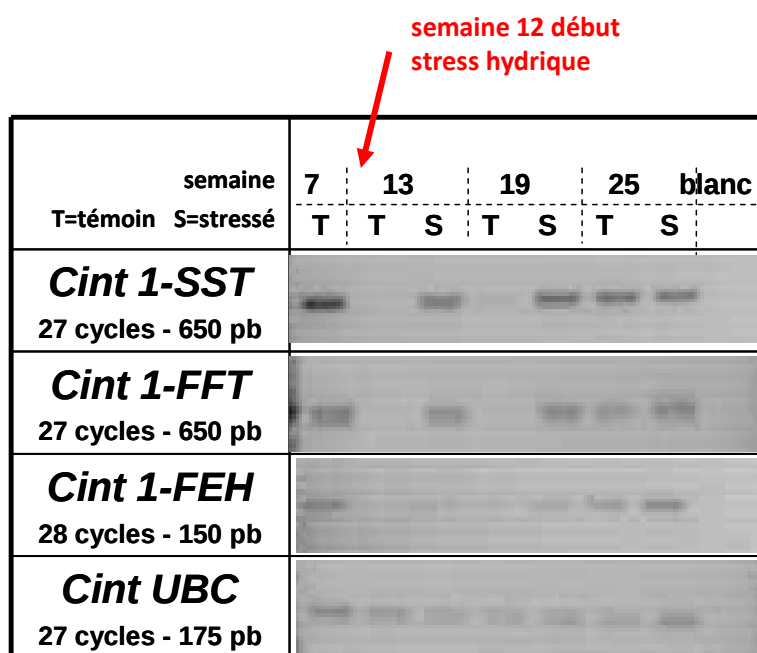


Figure 8: Comparaison du niveau d'expression des différents gènes codant pour les enzymes (1-SST, 1-FFT et 1-FEH) impliquées dans le métabolisme de l'inuline à l'expression obtenue pour UBC. *Cint* pour *Cichorium intybus*.

Pour commencer l'analyse, il y a lieu de suivre l'expression d'UBC. Il apparaît sur la figure 8 que les niveaux d'expression du gène codant pour l'UBC demeurent relativement stables si bien qu'il nous sera possible de juger pour chaque gène de la cinétique d'expression. Au niveau de la 1-SST, l'expression importante du gène 7 semaines après le semis est en adéquation avec la grande activité enzymatique mesurée *in-vitro* pour cette date (Tableau 5). Par la suite par contre, alors qu'au vu des activités enzymatiques mesurées nous nous attendions à une réduction progressive de l'expression de ce gène avec un effet plus marqué pour les plantes stressées, le résultat obtenu est tout à fait différent. Pour les plantes témoins, l'expression du gène disparaît entièrement à 13 et 19 semaines après le semis et réapparaît à un niveau élevé lors de la dernière récolte. Pour les plantes stressées, le niveau élevé d'expression de la semaine 7 est quant à lui maintenu tout au long des 25 semaines de croissance.

Le résultat obtenu en termes d'expression génétique pour le gène codant pour la 1-FFT est comparable à ce qui a été observé pour la 1-SST. Pour la 1-FFT, au vu des activités enzymatiques mesurées *in-vitro*, nous nous attendions plutôt à un faible niveau d'expression du gène en semaine 7 et à

un niveau d'expression plus important et légèrement supérieur chez les témoins lors des 3 autres récoltes.

Enfin, la cinétique mesurée pour la 1-FEH montre une expression faible du gène à 7 et 25 semaines après le semis pour les 2 traitements. Aux semaines 13 et 19, le niveau d'expression est particulièrement faible, voire même absent, pour les 2 traitements. Une très faible expression peut juste être observée pour les plantes stressées à la semaine 19. Si le faible niveau général d'expression génétique observé pour le gène codant pour la 1-FEH est en adéquation avec les activités négligeables mesurées pour cette enzyme *in-vitro*, nous nous attendions par contre à ce que ce faible niveau d'expression soit observé de manière équivalente à toutes les récoltes et pour tous les traitements.

Lors de l'étude précédente (Chapitre 1), au moment d'interpréter nos résultats, il nous était apparu que les activités enzymatiques des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation de l'inuline (Tableau 5) étaient en adéquation avec les mesures de rendement en inuline (Tableau 4). Nous constatons ici qu'il est par contre plus difficile d'établir un lien direct entre activités enzymatiques ou mesures de rendement et expressions des gènes. Une des hypothèses qui pourrait être formulée ici est que les enzymes nécessaires à la synthèse d'inuline sont synthétisées majoritairement dans les premières semaines de croissance, la 1-SST initiant la synthèse et la 1-FFT assurant l'élongation des chaînes. Par la suite, des mécanismes post-traductionnels peuvent intervenir pour réguler la quantité et/ou le niveau d'activité générale de ces enzymes. Un « stock » d'enzymes de synthèse serait donc présent et la plante pourrait réguler leur niveau d'activité en fonction de ses besoins. Le fait que l'expression des gènes codant pour la 1-SST et la 1-FFT soit maintenue en cas de stress hydrique pourrait s'expliquer par le fait que le stress aurait tendance à dégrader les enzymes nécessaires à la plante du fait, par exemple de l'activation de protéases, rendant de ce fait nécessaire une expression des gènes concernés.

Pour la 1-FEH, nous constatons sur la figure 8 que le niveau d'expression du gène est très faible et que le stress hydrique n'a pas tendance à activer cette expression. En guise de comparaison, il aurait été intéressant de pouvoir observer le niveau d'expression du gène en période de vernalisation, lorsque l'enzyme est supposée s'activer.

L'utilisation d'anticorps spécifiques pourrait permettre de tester la validité de nos hypothèses mais de tels anticorps ne sont pas, à notre connaissance, disponibles à ce jour.

Pour la suite de nos travaux, l'objectif est d'aller au-delà des observations classiques faites au niveau de la physiologie plante. Notre but est de comprendre le comportement de la racine en cas de stress hydrique.

De façon plus particulière, le chapitre 1 nous a permis de comprendre la réaction de la plante en cas de stress hydrique et les implications que cela engendre en termes de croissance, de rendement et de métabolisme de sucres. Le but du second chapitre à venir est de voir si la plante est capable de mettre en place des mécanismes d'adaptation racinaires vis-à-vis du stress hydrique. En particulier, nous souhaiterions savoir ce qu'il se passe au niveau de la prise d'eau. L'objectif est de suivre de près à la fois la croissance racinaire et la teneur en eau du sol. Sur base de ces informations, nous chercherons à localiser là où la plante puise son eau. Enfin, nous étudierons comment la croissance racinaire, la prise d'eau et la transpiration sont affectées par le stress.

Chapitre 2

Root water uptake dynamics of *Cichorium intybus* var. *sativum* under water-limited conditions

Vadose Zone Journal, submitted.

Vandoorne B^{1,2}, Beff L¹, S. Lutts² and M Javaux^{1,3}

1. *Earth and Life Institute – Environmental Sciences, Université catholique de Louvain, Croix du Sud, 2, L7.05.02, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.*
2. *Groupe de Recherche en Physiologie Végétale, Earth and Life Institute - Agronomy, Université catholique de Louvain, Croix du Sud, 5, L7.07.13, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.*
3. *Agrosphere (IBG-3), Institut für Bio- und Geowissenschaften - Forschungszentrum Juelich GmbH, Juelich, Germany*

Abstract

Chicory is a cash crop cultivated in Western Europe for inulin production. Due to actual and future climate changes, this plant could be exposed to severe water stress at the end of its growing period, leading to a decrease of its yield. The aim of this work was to investigate the chicory root water uptake dynamics and the plant ability to compensate a lack of water in the upper horizons. We performed a controlled experiment with 3 replicates under contrasted irrigation scenarios. We observed that, in case of drought, total root length decreased and root profiles developed deeper. We successfully used a 1-D Richards-based model with a stress function and a compensation mechanism (Hydrus 1-D) to inversely characterize the dynamics of the actual sink-term profiles under both irrigation scenarios. We could also use the model to assess the compensation thanks to a weighted stress index, consistent between replicates. The extraction profiles evolved differently under water-deficit and controlled situations. The passive compensation mechanism allowed chicory roots under water-limited conditions to take water deeper in the soil, where they had only few lateral roots. We found that, in case of drought, compensation started before the plants had to reduce their transpiration rate. Because the soil kept drying out, compensation was not sufficient anymore and the plants had to decrease its transpiration some days later. However, chicories maintained their metabolism and continued to transpire and to growth slowly. This allowed them to adapt thanks to an active compensation mechanism, by generating new lateral roots in wetter horizons. This study

also showed that there was no unique Feddes stress parameter set able to describe plant behavior under contrasted irrigation conditions or even under different plant development stages.

Introduction

According to the Intergovernmental Panel on Climate Change, scenarios with drier summers are expected to occur more frequently in Western Europe in the next decades (IPCC, Fourth Assessment Report). As a consequence, a better understanding of plant water relations is needed to assess how yield will be influenced by drought, and define appropriate water and crop management strategies in order to avoid or limit negative impacts.

This study focuses on root-chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*), a biannual cash crop cultivated in Western Europe and other parts of the world (e.g. Chile) to produce inulin. This molecule is a linear β (2,1)-type fructan that is widely used as a prebiotic in the colon with Bifidobacteria and Lactobacilla. Chicory has a taproot system with lateral roots growing from two opposite directions (Vuylsteker et al., 1998) along two lines evolving helically with depth (observed data).

Previous studies reported that chicory is rather drought resistant (Vandoorne et al., 2012; Schittenhelm, 1999; Skinner, 2008; Monti et al., 2005). Such a resistance may be related to the maintenance of the photosynthesis mechanisms during stress periods, without using its sugar reserves (inulin). Although the plant remains alive for long period, even at low soil moisture content, drought induces a strong reduction in leaf and root growth, and leads to a decrease in the shoot/root ratio, therefore suggesting that the assimilates are preferably translocated to the roots in case of drought, as observed in other plant species (Alvarez et al., 2011; Li et al., 2011). This strategy may be efficient on a short term basis but could nevertheless become damaging for plant on a longer term. Indeed, Vandoorne et al. (2012) observed that although chicory can modulate stomatal opening under stress conditions, stomata remain quite open in order to maintain gas exchanges. Those exchanges are essential to preserve photosynthesis but also generate water losses, which will deplete the soil water stock faster. The plant therefore needs to develop compensation strategies in order to extract water from deeper horizons where fewer roots are present. In soil hydrology, compensation is defined as the mechanism by which a reduced water uptake from a drier part of the rhizosphere is balanced by an increased uptake from another wetter region

of the rooting zone (Jarvis, 1989). This is a passive process resulting from the distribution of water potential in the root system and in the soil, which can be explicitly modeled in 3D models where water flow is simulated based on water potential gradient in and between soil and roots (Javaux et al., 2008). In soil hydrology, water uptake per soil volume profile (called 'sink' (S)) expressed in water volume per time and volume of soil) is typically defined as:

$$S(z) = \alpha(h) * b(z, t) * T_p(t)/w \quad \text{Eq. 1}$$

where α is a dimensionless stress function between 0 and 1 depending on the soil hydraulic status (Feddes et al. 1978), h is the soil matric head (L), $b(z, t)$ is the normalized root density (L^{-1}) at depth z and time t and T_p is the potential transpiration (L/T). Variable w is a compensation factor different than 1 for compensated conditions or equal to 1 for uncompensated cases. In order to estimate water uptake distribution in soils, it is often assumed that soil water extraction by roots is equivalent to soil water depletion (Dardanelli et al. 1997, Nelson et al. 2006, Garre et al. 2011). However, this assumption neglects the impact of water redistribution in the soil (Javaux et al., 2008, Asbjornsen et al. 2011) or hydraulic redistribution by plants (Burgess et al. 1998, Meinzer et al. 2004, Domec et al., 2010). For instance, if a cropped soil is continuously irrigated and if plants extract water at a constant rate, no soil water depletion would be observed while water uptake occurs. On the contrary, a change in water content profile may result from soil water redistribution and not from water uptake. These processes are modeled by the Richards equation (1931):

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial z} \left[-K(h) \frac{\partial h}{\partial z} + K(h) \right] - S \quad \text{Eq. 2}$$

where $K(h)$ is the soil hydraulic conductivity curve. It can be observed that a change of volumetric water content θ at a given depth can either result from redistribution (first right-hand term) or from root water uptake S . The relative impact of both terms on soil moisture profile dynamics will depend on soil hydraulic properties ($K(h)$ and $\theta(h)$), soil status and root extraction intensity. If soil properties are known and water depletion monitored at several depths, it should be possible to retrieve the actual uptake profile, S , by inverse modeling of Eq. 2 (Musters and Bouten, 2000; Vrugt et al., 2001; Zuo and Zhang, 2002).

The objective of this study is to characterize the chicory water uptake dynamics under water contrasted conditions, and how this is linked to plant physiological behavior (root growth, transpiration) and soil properties. We

particularly focus on the compensation mechanisms, which are hypothesized to be of importance when soil water content decreases. Our aim is also to provide and check a methodology for better characterizing the evolution of actual root water uptake (RWU) profiles *in situ* by combining physiological and soil observations and modeling (Draye et al., 2010).

In order to achieve these goals, and because we had no information about the root hydraulic characteristics of chicory, we decided to follow the 1-D macroscopic approach proposed by Simunek and Hopmans (2009) in term of water uptake modeling. The dynamics of the instantaneous sink term profile was retrieved by optimizing the Feddes function $\alpha(h)$ of Eq. 1, knowing $b(t)$ and allowing for full compensation.

Material and Methods

Experimental set-up

Six root-chicory plants were grown in PVC columns of 142 cm length and 38 cm i.d. filled with brusselean sand (Javaux and Vanclooster, 2004; 2006), characterized in table 1 and located into a temperature and air relative humidity controled phytotron. Soil was air-dried and repacked in order to obtain the same homogeneous bulk density in all columns. The bottom of the columns was filled with a 10 cm-height gravel layer to allow drainage. An outlet gage put 5 cm above the column bottom was connected to an irrigation water reservoir that could be moved upward to control the water table. Fine gravels and a PVC plate were placed at the column surface in order to avoid evaporation from the top soil. Several transparent PVC windows were inserted along the column walls to observe root impacts (see below). During the experiment they were covered with an opaque cloth in order to avoid algae proliferation or affect root growth.

Table 1: Soil characteristics (weight basis). Each value is the mean of 3 replicates and is given with its standard error.

Value	Mean and standard error
Clay ($< 2\mu\text{m}$; %)	5.7 ± 0.5
Fine silt (2 to $20\mu\text{m}$; %)	1.9 ± 0.6
Coarse silt (20 to $50\mu\text{m}$; %)	1.4 ± 0.1
Sand ($> 50\mu\text{m}$; %)	91.0 ± 0.3
pH (-)	8.1 ± 0.2
Conductivity ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	28.8 ± 2.9

In each column, Time Domain Reflectometry probes (TDR) were horizontally inserted at 8 different depths (12, 27, 42, 57, 72, 87, 103 and 125 cm depth). These home-made TDR probes consisted of three stainless steel rods (20 cm long and 0.5 cm diameter) with 2.5 cm rod spacing. Each probes was monitored every 30 minutes using a TDR 100 Time Domain Reflectometer connected to a SDMX50 multiplexer system (Campbell Scientific Inc., UK), which was controlled by a data logger and a computer to follow soil electrical impedance and permittivity. To avoid damage to the roots, the upper probe was only 9 cm length. An equipped column can be viewed on Fig. 1 A.

Four temperature NTC probes (Negative Temperature Coefficient thermistors) were horizontally inserted into one column for each treatment at 25, 52, 80 and 108 cm depth. Temperature measurements were recorded every hour. Mean temperatures at the TDR probe depths were calculated using a linear regression of the temperature measurements. The electrical impedance dataset was then corrected for the temperature effect (Campbell *et al.*, 1948) by assuming the same temperature distribution between columns receiving the same treatment.

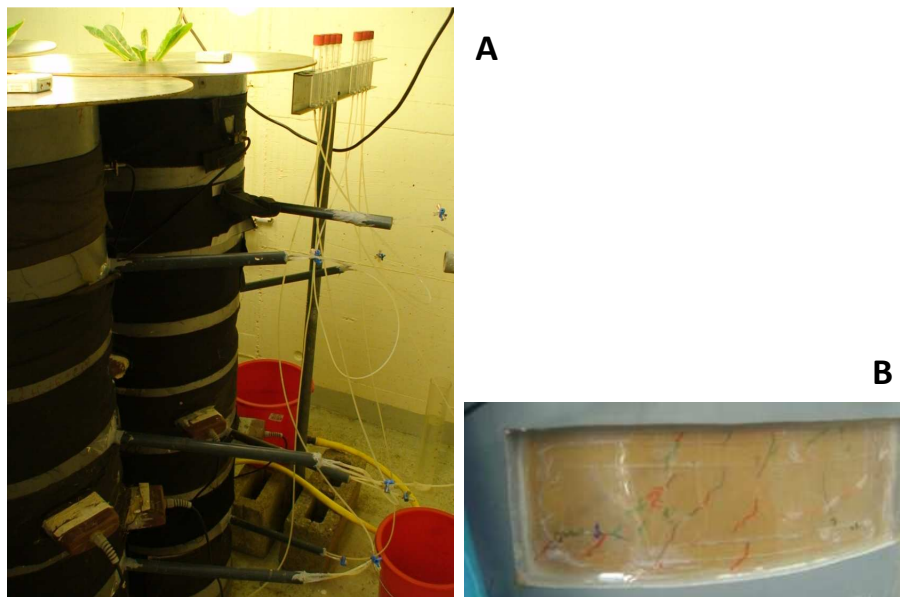


Figure 1: A. View of a column containing TDR probes (pink) and tensiometers (grey). The red bucket is the water reservoir connected at the bottom of the column. Windows are behind the black clothes. B. View of a windows with the root impacts.

Root growth monitoring

Lateral root impacts were followed thanks to 16 transparent windows made in the column walls at eight different depths: 12, 27, 42, 57, 72, 87, 103 and 125 cm depth (Fig. 1 B). Two openings were made at each depth, with a total open surface of 560 cm² at 12 cm depth, 600 cm² at 125 cm depth and 400 cm² for the others depths. The two windows at a same depth were inserted opposite to each other. The windows moved also to spiral down. Root growth and depth were estimated by following the appearance of new lateral root impacts on the transparent Plexiglas windows put in the openings of the columns. The growth was followed each 20 days thanks to marks put on a transparent plastic sheet attached on the windows.

As chicory develops its lateral roots radially, we assumed that the root impacts on a given window were a good index of the total amount of roots potentially extracting water present at that depth. The rooting depth was estimated by adding 19 cm to the depth of the deepest observed impact. We took the hypothesis that if a lateral root covers a lateral distance of 19 cm from the tap root to the window, the tip of the taproot will grow almost the same distance during this time.

Plant growth

Seeds of *Cichorium intybus* var. *sativum* (purified line issued from cultivar Crescendo kindly provided by Chicoline – Warcoing) were sown in the 6 columns. A small amount of loam (0.5 dm³- loam for professionals; DCM N.V) was added around the seeds to promote germination. Four days after germination, only one plant was maintained in each column. The mean temperature during the growing season was 25°C during the 16 hours day and 18°C during the 8 hours night. The mean relative humidity in the air was 45% and the light intensity was 210 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (fluorescent tubes Osram Lumilux® XT) at the top of the canopy. When irrigated, the plants were provided with a nutrient solution of pH 5.4 and electrical conductivity of 963 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ containing the following nutrients concentrations 250 μM NH_4NO_3 , 890 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2.4\text{H}_2\text{O}$, 990 μM KNO_3 , 515 μM KH_2PO_4 , 244 μM $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 0.415 μM $\text{MnSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, 6.45 μM H_3BO_3 , 0.161 μM $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, 0.0125 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$, 0.697 μM $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ and 10.12 μM Fe-EDDHA.

Plant water treatment

The six plants were submitted to the same treatment for a first period of 98 days. Then they were randomly split in two groups with three replicates,

one optimally irrigated three times a week (water load adjusted to compensate transpiration losses), while the second one did not receive water anymore to generate water stress (called “non-irrigated” hereafter). Initially, before sowing, the six columns were saturated with the nutrient solution by raising the nutrient solution reservoir connected to the column outlet for four days. Then the level was decreased to 0 and the water reservoir was disconnected to allow drainage (i.e., seepage face boundary condition). This was made to ensure static water equilibrium at the beginning of the experiment and to ensure enough water and nutrient for plant growth. In addition, a small amount of solution (total of 2.2 l) was given to the plants from the top of the column during the first 20 days of growth in order to guarantee a good development of the culture. Between days 20 and 98, no additional irrigation was performed, and plants used the solution contained in the soil.

Plant physiology

The stomatal conductance (g_s) was measured using an AP4 system (Delta-T Devices; (Cambridge, UK) on the first unfolded leaf and four other randomly-chosen leaves halfway the photoperiod. Gas exchanges were recorded with an InfraRed Gaz Analyser (IRGA, LCA4 8.7 ADC, Hertshire, UK) using a PLC Parkinson leaf cuvette on intact leaves for 1 min (20 records min^{-1}), with an air flow of 300 ml min^{-1} . Air taken in the phytotron was sent in a chamber in which a leaf portion of 6.25 cm^2 was introduced. The instantaneous transpiration rate (E) was estimated on the second and third fully unfolded leaves. Five plants were measured in each treatment.

Soil water content and mass balance

Soil permittivity values obtained from TDR measurements were transformed to water content by Topp equation (Topp, 1980). Validity of the Topp equation was checked at the end of the experiment by comparing soil coring water content and final TDR probe water content measurements. Long soil cores (1.3 m length, id. 0.04 m) were extracted from the columns at the end of the experiment. The cores were cut in pieces of ten centimeters length and moisture content was measured and compared with TDR final data at levels where probes were inserted. The Root Mean Square Error (RMSE) between TDR and soil core measurements was calculated following Eq. 3.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\theta v_{TDR}(z) - \theta v_{core}(z))^2}{N}} \quad \text{Eq. 3}$$

with $N=47$, the number of cores linked to TDR measurements. The Root Mean Square Error between those volumetric soil content measurements was 2.26%. No bias was observed (i.e., the 95% C.I. on the slope was between 0.96 and 1.08).

Soil hydraulic properties

Soil hydraulic properties and van Genuchten-Mualem parameters (Fig. 2) were obtained by inverse modeling of Richards equation using a Multistep Outflow experiment (VanDam et al., 1994, Weynants et al., 2011). The method is based on the measurement of the outflow from an initially saturated soil sample submitted to increasing steps of suction/pressure. Two soil samples of 1L, re-packed in order to get the same bulk density as in the large columns, were placed on a porous plate (EcoTech, Germany). From saturation to 80 cm of suction head, the system works on a suction mode thanks to a height difference between the top of the sample and a water tank. After 80 cm of suction head, the system works with a pneumatic pressure (Pressure regulator from EcoTech, Germany) at the sample upper boundary. Miniature tensiometers (EcoTech, Germany) were inserted in the soil samples in order to monitor soil suction during the experiment. Using this setup and after inversion, we obtained the different parameters of the van Genuchten-Mualem equations.

$$\theta(h) = \theta_r + (\theta_s - \theta_r) \left[1 + |ah|^n \right]^{-m} \quad \text{with } m = 1 - \left(\frac{1}{n} \right) \quad \text{Eq. 4}$$

$$K(\theta) = K_s Se^l \left[1 - (1 - Se^{1/m})^m \right]^2 \quad \text{with } Se = (\theta - \theta_r) / (\theta_s - \theta_r) \quad \text{Eq. 5}$$

where the residual water content (θ_r) was $0.022 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ and the saturation water content $0.419 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$. The saturated soil hydraulic conductivity (K_s) reached a value of 442.7 cm/day . Finally, the calculated van Genuchten-Mualem parameters α , n and λ were respectively equal to 0.027 cm^{-1} , 2.745 and 0.82.

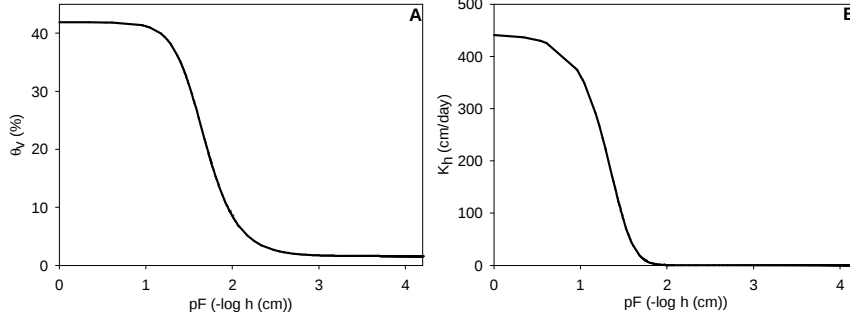


Figure 2: Soil characteristic curves modeled with van Genuchten-Mualem equations. **A** water retention curve; **B** soil hydraulic conductivity curve.

Forward model

Our aim was to retrieve the actual sink term profile by fitting the final measured water content profiles for short periods with a 1D hydrological model solving Eq. 2. We used Hydrus-1D, Version 4 (Simunek and Hopmans, 2009) with the sink term defined by Eq. 1, which allows the generation of sink terms potentially independent to the root profile, thanks to compensation. This compensated sink (S_c) is equal to (Simunek and Hopmans, 2009; Jarvis, 1989):

$$S_c(t) = \alpha(h) * b(z, t) * \frac{T_p(t)}{\max[\omega(t), \omega_c]} \quad \text{Eq. 6}$$

where ω_c the compensation factor and $\omega(t)$ the weighted stress index (Jarvis 2011). The depth-integral of Eq. 6 gives the actual (potentially compensated) transpiration T_a . The Feddes function $\alpha(h)$ ($0 < \alpha < 1$) is a typical piecewise linear function characterizing the impact of soil limitation to water uptake (see Fig. 3), which has been derived from experimental data (Feddes and Raats, 2004). When soil limits the uptake, $\alpha < 1$. The weighted stress index is defined as:

$$\omega(t) = \int_0^L \alpha(h) * b(z, t) * dz \quad \text{Eq. 7}$$

where L is the maximum root depth. This index varies from 0 to 1. When equal to 1, the root water uptake profile (represented by the sink term distribution) is proportional to the root profile, meaning that the soil is not limiting. When $\omega < 1$, soil is limiting the uptake at least at one depth and sink and root profiles differ. Compensation may then potentially occur,

following the value of a user-defined compensation factor ω_c (Jarvis, 2011) in Eq. 6. As long as $\omega > \omega_c$, compensation occurs and $T_a = T_p$. On the opposite, when $\omega_c > \omega$, stress occurs. When $\omega_c = 0$, the uptake is fully compensated and the compensated actual transpiration always equals the potential one.

Inverse modelling

In order to retrieve the evolution of the sink profile, we would need to optimize $\alpha(h)$ and ω_c of Eq. 6, which could be an ill-posed problem. We thus chose to optimize $\alpha(h)$ only and to impose $\omega_c = 0$. With such a parameterization, this model allows a very flexible description of the sink term profile, potentially independent of the root profile $b(z,t)$. In addition, the imposed (observed) transpiration is always met by the model, even when $\alpha < 1$ in a given location. The weighted stress index $\omega(t)$ (estimated based on optimal $\alpha(h)$ with Eq. 7) becomes then an index of dissimilarity between the root profile $b(z)$ and the sink term $Sc(z)$. If the soil is not limiting, $\omega(t)$ will be equal to 1 and the sink profile will be similar to the root profile. In case $\alpha < 1$ in one depth, Sc and b profiles will be dissimilar.

To account for the temporal evolution of the extraction profile, the growing season was divided into nine periods, starting from 22 until 204 DAS. Those periods were chosen in function of the root impact information collection. Due to interventions on the bottom of the columns (water extraction in order to guarantee a drought stress after 99 DAS), the interval between 62 and 85 DAS was not studied. Table 2 gives the distribution of the nine periods. During periods 1 to 5, all the plants received the same amount of water (2.2 l during the first days). Between periods 6 to 9, only 3 plants were irrigated.

Table 2: Distribution of the 9 periods along the growing season

Period	Distribution	
	<i>From day</i>	<i>To day</i>
1	22	32
2	33	42
3	43	52
4	53	61
5	86	98
6	99	127
7	128	157
8	158	189
9	190	204 or 206

→ Treatment discrimination

Geometry and boundary conditions. Geometrical and hydraulic inputs consisted in the depth of the soil column (132 cm with $dz=1$ cm) and the soil hydraulic parameters (Fig. 2). For each period, the TDR-observed water content profile was given as initial condition. The upper boundary condition for the soil was no-flow, except when irrigation occurred. The soil upper boundary condition was defined as atmospheric conditions with no evaporation and the imposed irrigation time series. The lower boundary condition was a seepage face with $h = 0.1$ cm. This condition mimics the open outlet put at the bottom of the columns.

Plant conditions. The daily potential transpiration time series within each period was estimated as the daily loss of soil water calculated by depth-integration of TDR measurements for all treatments. As no drainage was observed during the experiment, this assumption is supposed to be accurate. With the condition $\omega_c=0$, this transpiration rate will always be met by the model and fit the observed values.

Root distribution. For each simulated period, we used the root impact profile measured in the middle of this period (i.e., the root growth is neglected within a given period) for determining $b(z,t)$ of Eq. 6, making the assumption that the tap root does not take up water. We linearly interpolated between measurements to obtain values between observation windows.

Optimization. We optimized two parameters describing the Feddes function, while imposing a constant $\omega_c=0$ (full compensation). A standard Feddes function with the main parameters P_0 , P_1 , P_2 and P_3 is shown in Fig. 3. We imposed P_0 to -5 cm and P_{opt} of -10 cm and no dependency of the Feddes function to transpiration rate (i.e., P_{2H} was equal to P_{2L} and thus $r_{2H}=r_{2L}$). We optimized P_2 the threshold value of the matrix potential beyond which soil becomes limiting, and $\Delta P=P_3-P_2$, the matrix potential range in which soil limits uptake ($0<\alpha<1$). For each optimized set, and given the soil pressure head distribution, a $\omega(t)$ value was calculated by the model (Eq. 7), and a potentially compensated sink term was obtained with Eq. 6.

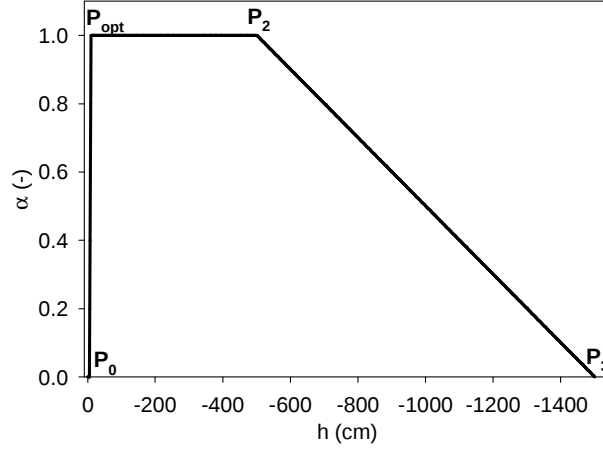


Figure 3: Feddes function with the smallest P_2 and P_3 values.

The optimization of the stress parameters was performed in a systematic way. Hydrus was run for each period and each column, with 2500 sets of P_2 and P_3 ($=P_2+\Delta P$) values. We worked on 50 different P_2 values, logarithmically distributed from -10 to -500 cm and 50 different ΔP values logarithmically distributed from -1 to -1000 cm. Maximum and minimum values for P_2 and ΔP were chosen to encompass the range of suction where water content passed from saturation to residual water content. For each period and column, the 2500 simulated water profiles at the end of the period were then compared to the TDR measurements using the following objective function:

$$\varepsilon_{\theta}(P_2, \Delta P, t_{end}) = \ln \left[\frac{\sum_{i=1}^8 (\theta v_{TDR}(z_i, t_{end}) - \theta v_{hydrus}(z_i, P_2, \Delta P, t_{end}))^2}{8 * (rmse_{TDR})^2} \right] \quad \text{Eq. 8}$$

$RMSE_{TDR}$ was calculated following Eq. 3. In the Eq. 3, $\theta_{v,core}$ was replaced by $\theta_{v,hydrus}$ obtained at the given depth for the optimal P_2 - ΔP set of parameters. For each period, the optimal P_2 - ΔP set was obtained by minimizing Eq. 8. In order to analyze the sensitivity, contour plots of Eq.8 were drawn. They allow the observation of the shape of the error function, in particular around the absolute minimum.

As our aim was to obtain a well defined sink term, we computed the sink term comparison function ε_s , which characterizes how similar is the

optimized sink term profile (obtained with the optimal P_2 and ΔP) to other sink term profiles in the P_2 - ΔP domain:

$$\varepsilon_S(P_2, \Delta P, t_{prof}) = \left\{ \frac{\sum_{i=1}^{101} abs[S(z_i, P_2, \Delta P, t_{prof}) - S_{opt}(z_i, P_{2,opt}, \Delta P_{opt}, t_{prof})]}{101 * S_{mean}(P_2, \Delta P, t_{prof})} \right\} * 100 \quad \text{Eq. 9}$$

where 101 is the number of layers in the soil profile, S_{opt} is the sink of the optimal P_2 - ΔP couple at the time of the root profile measurement and S_{mean} is the mean sink of the optimal P_2 - ΔP couple at the time of the root profile measurement (t_{prof}). When $\varepsilon_S = 0$, sink terms are not discriminable, although they rely on different parameter sets ΔP and P_2 . This equation will allow us to check to which extent non-unique ΔP - P_2 optimal parameter sets will generate different sink profiles.

The third criterion computed in the P_2 - ΔP domain is the weighted stress index, as described by Eq. 7, where α is a function of P_2 and P_3 . This criterion helps evaluate whether the compensation term is sensitive to changes in the P_2 - ΔP couple.

Statistical data analyses

The statistical analysis was performed using the SAS software (SAS System for Windows, version 9.1). The normal distributions of the data were analyzed using a Shapiro-Wilk test. When needed, the data were transformed (inverse or logarithm of the data) in order to have a normal distribution.

Data were then subjected to an analysis of variance (ANOVA I) considering the presence or absence of stress as factor. The statistical significance of the results was analyzed by the Student-Newman-Keuls test at the 5 % level.

Results and Discussion

Impact of treatments on transpiration, root development and volumetric water content profile dynamics

Figure 4 shows the mean transpiration for each treatment before and after period 5. Irrigated plants obviously transpired 2 to 12 times more than non-irrigated plants. Variations between treatments are much higher than intra-treatment variability as shown by the standard error.

The ratio between the two treatments is shown above the histograms of irrigated plants (Fig. 4) and in Table 3. It was calculated thanks to the daily transpirations coming from TDR measurements (first value) and also using the instantaneous transpirations measured with the IRGA (second value). We observe on the graph that the stress magnitude increased a lot for the last period. Indeed, for both methods, stress factors were quite small at period 9. For periods 6 and 7, the huge difference in the factors values could be explained by the fact that the instantaneous transpiration was just measured once during the periods and only on young leaves. The stress factor coming from IRGA measurements were thus less reliable than factors issued from TDR measurements. Before period 6, it is assumed that no stress occurred and that the stress factor was equal to 1 ($T_a = T_p$).

This factor was yet calculated for periods 1 to 5 in order to see if an intrinsic difference exists between future irrigated and non-irrigated plants (Data not shown). Looking at those values, future non-irrigated chicories presented a significant better vigor than future irrigated ones only at period 3 (ANOVA I). For the other periods, the difference was not significant.

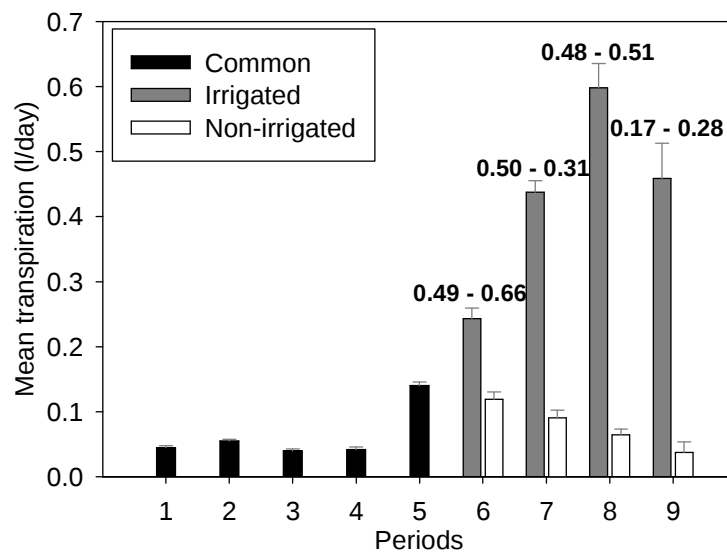


Figure 4: Evolution of the actual transpiration during the 5 first periods of growth (common) and for irrigated and non-irrigated plants for periods 6 to 9. For periods 1 to 5, the values are the mean of 6 replicates. For periods 6 to 9, values calculated for irrigated and non-irrigated plants are the mean of 3 replicates. Vertical bars are the standard errors. The numbers above the irrigated histograms indicate the ratio between irrigated and non-irrigated plant transpirations for the period. The first index is calculated using TDR measurements, the second using the instantaneous transpirations.

Table 3: Ratio of transpiration between non-irrigated (T_{ni}) and irrigated plants (T_i) at the day of measurement of the root impacts. Minimal and maximal values (between treatments) are given. Mean values are put between brackets.

PERIOD	T_{ni}/T_i (-)	
	<i>TDR measurements</i>	<i>IRGA measurements</i>
6	$0.37 < T_{ni}/T_i < 0.62$ (0.49)	$0.48 < T_{ni}/T_i < 0.87$ (0.66)
7	$0.46 < T_{ni}/T_i < 0.58$ (0.50)	$0.23 < T_{ni}/T_i < 0.40$ (0.31)
8	$0.37 < T_{ni}/T_i < 0.58$ (0.48)	$0.36 < T_{ni}/T_i < 0.71$ (0.51)
9	$0.13 < T_{ni}/T_i < 0.21$ (0.17)	$0.24 < T_{ni}/T_i < 0.35$ (0.28)

Figure 5 shows the evolution of the normalized root impacts profiles. During the 5 first periods of growth, root development occurred mostly between 27 and 72 cm depth. 85% of the root impacts were observed in this zone during the 5 first periods, with a peak of lateral root impacts at 42 cm at period 5 (Fig. 5 A).

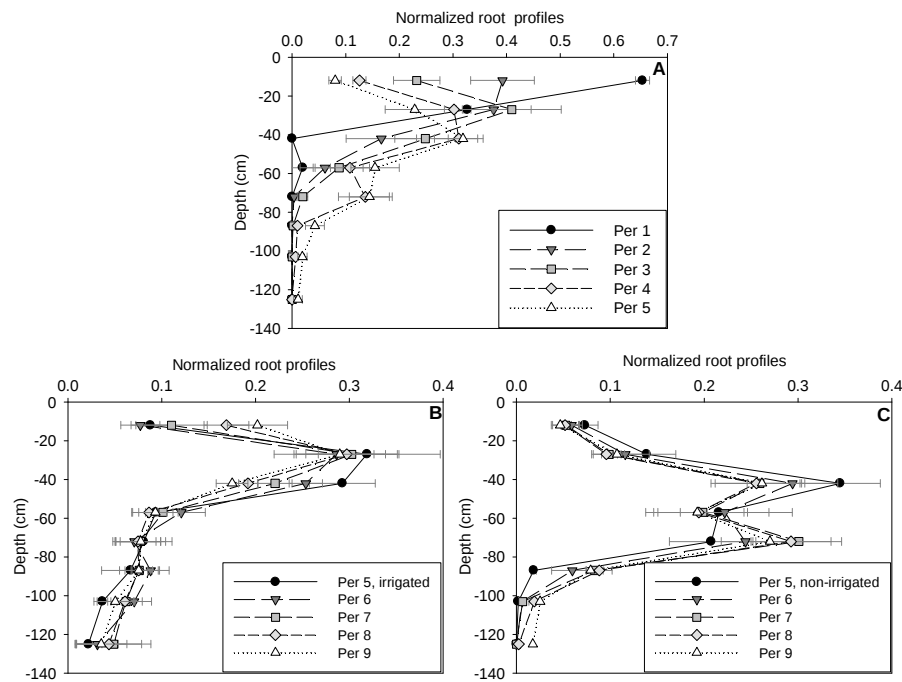


Figure 5: Evolution of the normalized root profiles observed on the lateral windows when the 6 plants received the same treatment during periods 1 to 5 (A), for the 3 irrigated plants during periods 6 to 9 (B) and for the 3 non-irrigated plants during periods 6 to 9 (C). For figures B and C, values of period 5 are respectively the mean root profiles of the future irrigated and non-irrigated plants. Irrigation started 99 days after sowing, at the beginning of period 6. Each value is the mean of 6 (A) or 3 (B and C) replicates and horizontal bars are the standard errors.

Comparing profiles from period 5 at Fig. 5 B and C, it appears that a preliminary difference between plants already existed before treatment was imposed. Indeed, although irrigated and non-irrigated plants were chosen randomly, the plants intended to be non-irrigated presented a better investigation of the soil profile in depth already before treatment. This could be a consequence of the significantly higher transpiration observed for future non-irrigated plants at period 3 as it was mentioned before.

Nevertheless, Fig 5 B and C show that the evolution of the root profiles was more and more discriminatory with time. Indeed, irrigated plants (Fig. 5 B) showed new lateral roots mainly in the upper depths of the columns: 55% of the total new root impacts between periods 6 and 9 appeared between 0 and 30 cm-depth (total of 300 new impacts observed). It can be clearly observed on Fig. 5 B that the number of impacts observed at 12 cm depth took more and more importance in the normalized root profile. At the 6 other depths, the increase was quite uniform and represented almost 7.5% of the total new observed impacts during periods 6 to 9 (between minimum 6% and maximum 9%; Fig. 5 B). At the end of the experiment, from 57 cm depth to the bottom of the column, the number of root impacts observed at the different depths represented always less than 10 % of all the root impacts (Fig. 5 B).

On the opposite, non-irrigated plants slowed down their root development. The number of new impacts was 3 times smaller for non-irrigated than irrigated plants (roughly 100 new impacts during periods 6 to 9). The localization of the root development was also different from irrigated plants: 47% of the new impacts were observed at 72cm depth, and 94% between 42 and 89 cm depth (Fig. 5 C). By comparing the normalized root profiles at periods 5 and 9, it is measured that only the depths from 72 cm to the bottom of the column increased their contribution in the root profile.

Figure 6 shows the evolution of the water content before treatment application (Fig. 6 A), and after under well-water (Fig. 6 B) and non-irrigated conditions (Fig. 6 C).

During the 4 first periods of growth, when the plants received the same treatment and before the water extraction at the bottom (between period 4 and 5), the soil dried mostly between 12 and 42 cm depth. Between the middle of the fourth and fifth periods, after the extraction of some solution at the bottom of the columns, water content decreased at all depths (Fig. 6 A). After irrigation was started, although irrigation doses was tuned to compensate the actual transpiration, water content raised in the upper depths (above 72 cm) but decreased below 72 cm depth during periods 6 and 7. During periods 8 and 9, soil water content increased a lot under 60

cm depth while keeping constant above this depth (Fig. 6 B). For the non-irrigated plants, the water content below 57 cm depth decreased all the time. Above this depth, it decreased only during period 6 and came rapidly to a minimum (Fig. 6 C).

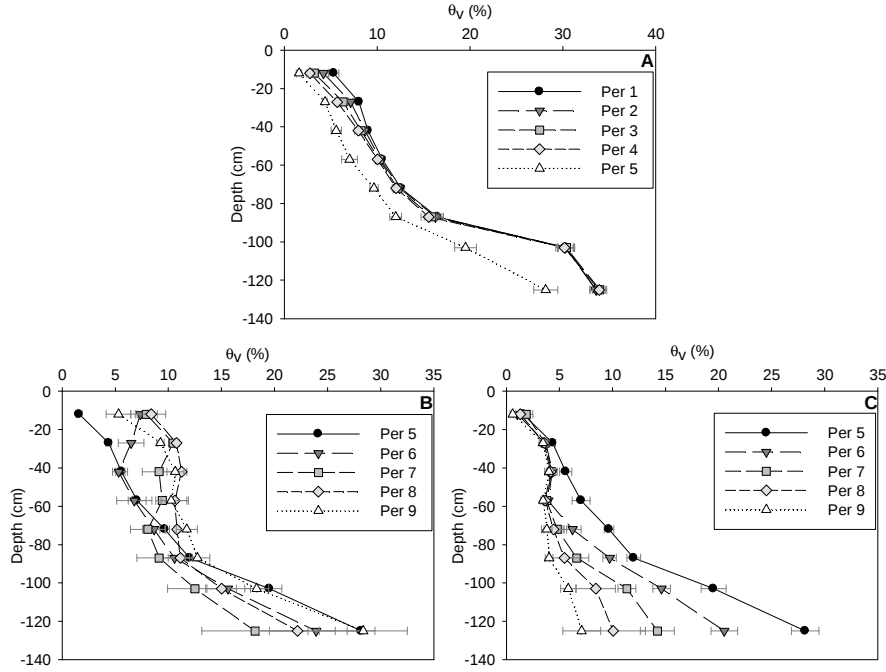


Figure 6: Volumetric water content profiles for the 6 plants receiving the same treatment during periods 1 to 5 (A), for the 3 irrigated plants during periods 6 to 9 (B) and for the 3 non-irrigated plants during periods 6 to 9 (C). Irrigation started 99 days after sowing, at the beginning of period 6. Each value is the mean of 6 (A) or 3 (B and C) replicates and horizontal bars represent the standard errors. The water content profiles are shown at the middle of the periods (Days 26, 37, 47, 56, 92, 114, 142, 173 and 198), close to the root profile measurements.

Optimization of plant parameters under well-watered treatment

We computed ε_θ function based on Eq. 11 for each period and each plant. Note that an error level of 0 means that the error between simulated and measured water content profiles is equal or lower than the measurement error level (Eq. 3).

In general, for periods under well irrigated conditions (before period 5 or irrigated treatment after period 5), all ε_θ contour plots were similar. Figure 7 A illustrates one typical example (period 8 of an irrigated plant) with a flat region with almost no error covering a large part of the parameter domain and a small region with higher error levels for high P_2 and small ΔP . The

black zone in Fig. 7 A represents the optimal solutions within which the errors between simulated and measured water content profiles at the end of the period (Eq. 11) are below the measurement error level, i.e. objective function is 0. Typically, as no stress was expected for this period, it is obvious that stress parameters cannot be identified.

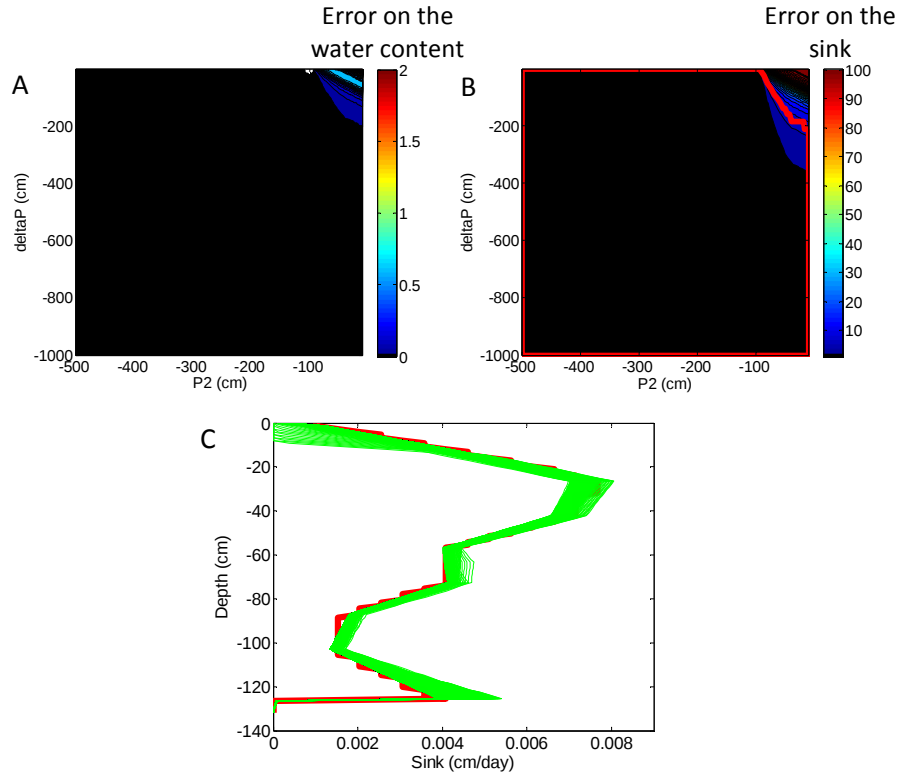


Figure 7: **A:** Error between the volumetric water content profile measured by the TDR probes at the end of period 7 and the water profile simulated by Hydrus, for an irrigated column (Eq. 8). The white point represents the optimal parameter set. **B:** Errors on the root water uptake profiles (sink of Hydrus) between the optimum solution and all the P_2 - ΔP couples. Calculations were performed following Eq. 9. The red line delineates the domain in which the objective function is 0 (Fig. 7 A). **C:** Green lines show all the sink-term profiles corresponding to the optimal P_2 - ΔP couples located in the red zone of Fig. 7 B; the red line represents the non-stressed sink term, similar to the root profile.

However, one may wonder whether the sink-term distribution can be retrieved. This is shown in Figs 7B and C, where we plotted the function ε_s (Eq. 12), showing the discrepancy in term of sink-term profiles between the optimal parameter set (white point in fig 7 A) and other parameters sets. The difference between the black zones in figures 7A and B (or, in Fig. 7 B, the difference between the red envelope and the black zone) represents

parameters sets, which generated the same final water content profile but with different optimized sink-term profiles, in this case slightly different than the root profile. This region however has still quite similar uptake profile, different to maximum 20% to the root term profile. These slight differences are observed on Fig. 7 C where all the optimal sink-term profiles (i.e., for which $\varepsilon_\theta < 0.04$) are plotted in green and an optimal extraction profile without stress (similar to the root impacts profile) in red. Some sink-term profiles (green lines) did not match with the root profile (red line). A few parameter sets for which the P_2 was higher than -100 cm and the ΔP smaller than -220 cm show slight compensation.

In summary, we can conclude that P_2 and ΔP cannot be optimized in unstressed condition; however, the sink term profile can still be well identified by inverse modeling from water content profile. Indeed, in our case, even when redistribution occurs, most sink-term profiles remained quite similar to the root profile (only slight compensation).

Optimization of plant parameters under non-irrigated conditions

Another picture is given when the soil was less or not irrigated anymore. When the soil started to dry, just before the beginning of the differentiated treatments (period 5), the size of the flat minimal region in ε_θ tended to decrease, i.e., the optimal P_2 - ΔP parameters can better be identified (Fig 8 A).

However, in this case, there were more differences between sink-term profiles generated from these optimal sets (see red line in Fig. 8 B; up to 40%) then what was observed before (Fig. 7 B; maximum 10% in red zone). It is clearly observed in Fig. 8C that the compensation mechanism was already present in the columns at period 5. Indeed, the water extraction profiles (green lines in Fig. 8C) corresponding to the red-delimited area in figure 8B are clearly different from an ideal water uptake profile, which would occur when the uptake is proportional to the root density profile (red line in Fig. 8C).

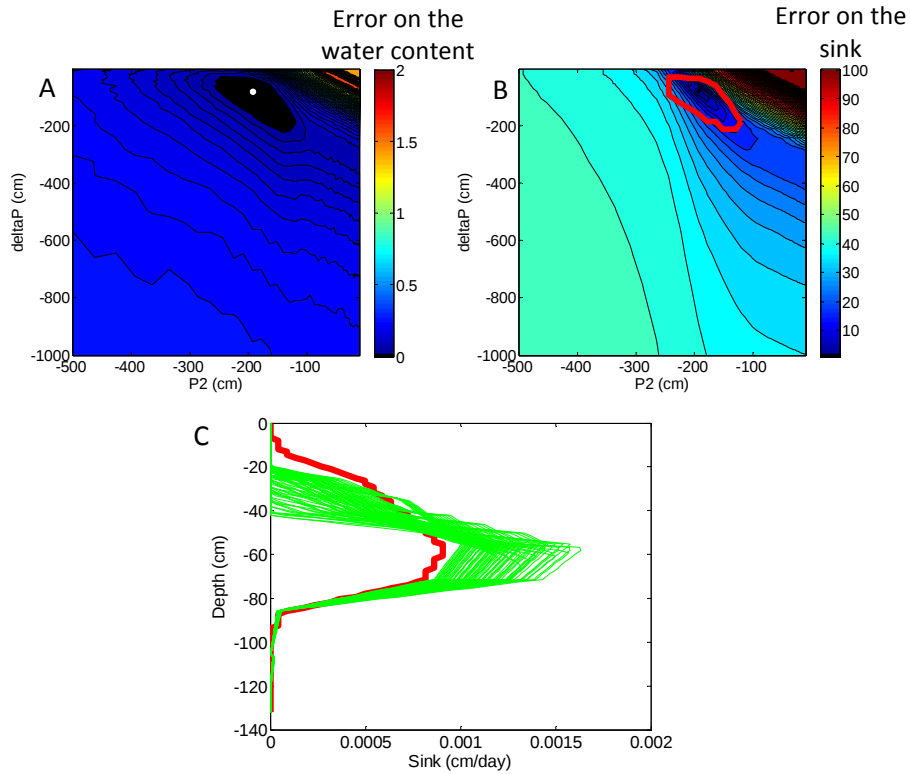


Figure 8: **A:** Error between the volumetric water content profile measured by the TDR probes at the end of period 5 and the water profile simulated by Hydrus at the same time (Eq. 8). The white point represents the optimal parameter set. **B:** Differences on the root water uptake profiles between the optimum solution and all the P_2 - ΔP couples (Eq. 9). The red line delineates the domain in which the objective function is 0 (black zone in Fig. 8 A). **C:** Green lines show all the sink-term profiles corresponding to the optimal P_2 - ΔP couples located in the red-delineated zone of Fig. 8 B; the red line represents a potential non-stressed sink term, similar to the root profile.

Finally, in the case drought stress was well established, the region with the minimal errors on the volumetric water content reduced further. Figure 9 shows that there were still fewer possibilities to reproduce the actual final volumetric water content profile (black zone in Fig 9 A) and in parallel also few possibilities to match the optimal sink-term profile (Fig 9 B). The sink-term profile was thus quasi-uniquely related to the water content profile and to one stress parameter set. Figure 9C shows that compensation was important at this time in stress situation. Indeed, the extraction profiles of the red-delineated zone of figure 9B (green lines) were all very different from an ideal non-stressed root water uptake profile (red line). In conclusion, when the stress increases, the minimum zone for ε_θ becomes more restricted and the optimal parameter couples are better defined.

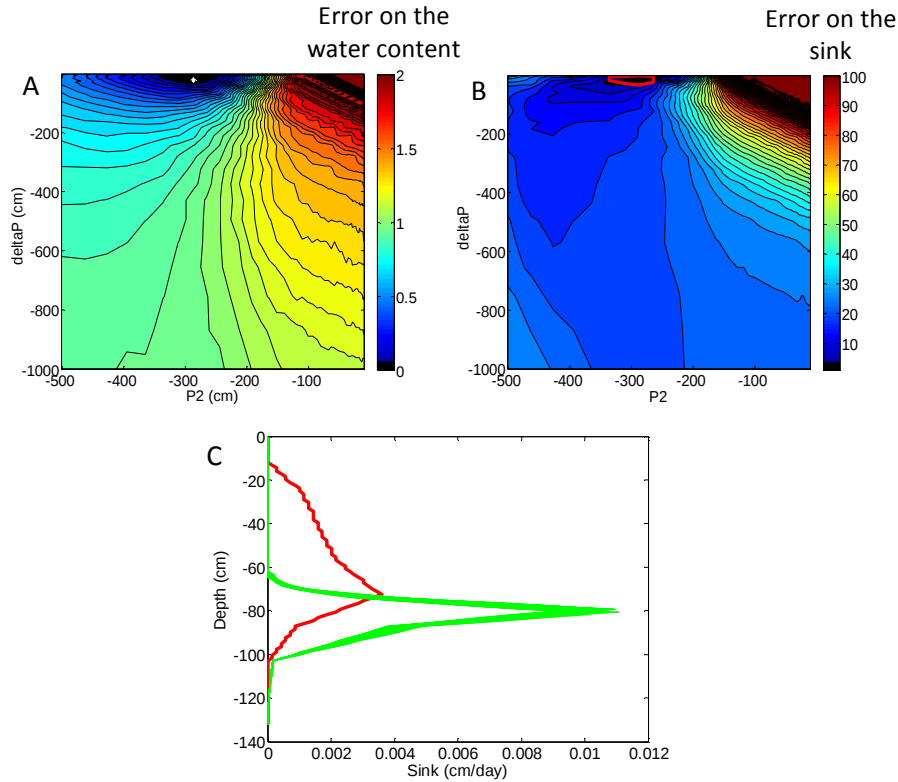


Figure 9: **A:** Error between the volumetric water content profile measured by the TDR probes at the end of period 8 and the water profile simulated by Hydrus at the same time, for a non-irrigated column (Eq. 8). The white point represents the optimal parameter set. **B:** Differences on the root water uptake profiles between the optimum solution and all the P_2 - ΔP couples (Eq. 9). The red line delineates the domain in which the objective function is 0 (Fig. 9 A). **C:** the green lines show the optimized sink-term profiles corresponding to the optimal P_2 - ΔP couples located in the red-delineated zone of Fig. 9 B; the red line represents the non-stressed sink term, similar to the root profile.

Compensation

The next question was to investigate whether this type of experiment brings information on the occurrence of compensation processes. Figure 10 shows the weighted stress index as defined by Eq. 7 for the P_2 - ΔP domain. In theory, this index represents the transpiration loss, which would have occurred without compensation. In our case it represents the similarity between sink and root profiles. When its value is 1, the uptake profile is similar to the root profile. For values lower than 1, compensation occurs, uptake and root profiles do not overlap. As compensation depends on the soil (and plant) hydraulic status, $\omega(t)$ will change with columns and periods.

In Figure 10, we plotted the envelope of the optimal parameter sets obtained from the objective function contour plots (Figs 7A, 8A and 9A). Its intersection with the compensation contour plot shows that whatever the soil hydraulic status, a very good retrieval of the weighted stress index with an uncertainty of about 0.1.

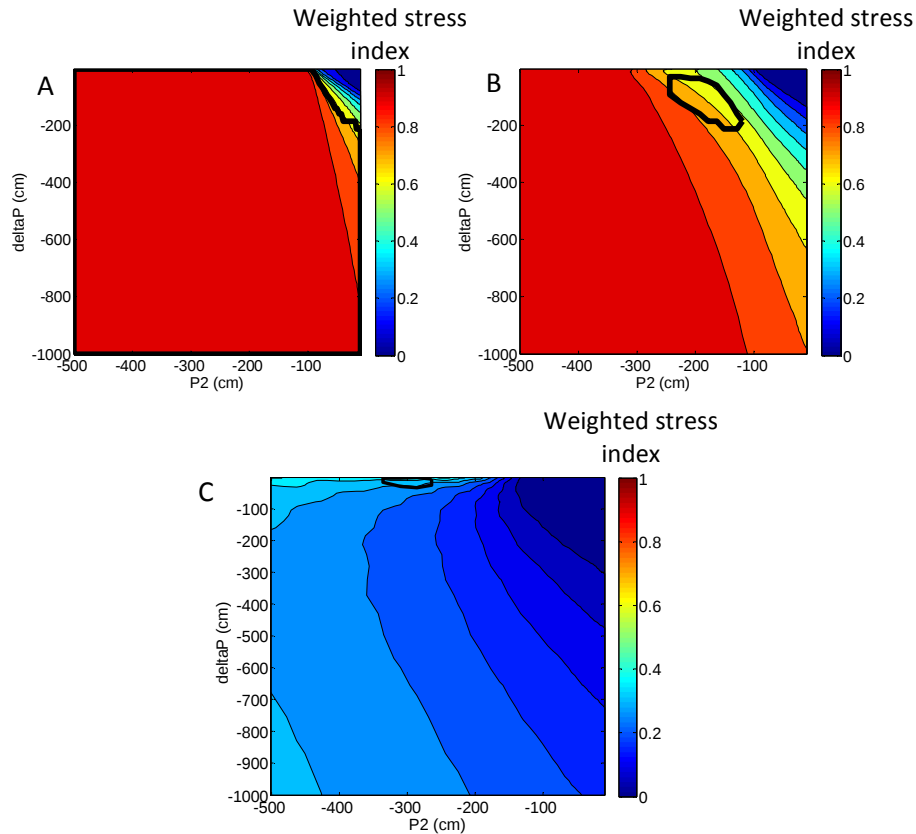


Figure 10: Value of the weighted stress index in function of the P_2 - ΔP parameters at the day of root profile measurement. **A:** Weighted stress indexes corresponding to the Fig. 7. **B:** Weighted stress indexes corresponding to Fig. 8. **C:** Weighted stress indexes corresponding to Fig. 9. Black zones represent the minimal region for the error on volumetric water content (respectively figs. 7-8-9 A).

Characterization of the Feddes function

We used the water content profiles to characterize Feddes function parameters ΔP and P_2 . Figure 11 represents all the optimized Feddes parameters for each periods and plants under both irrigated and non-watered treatments.

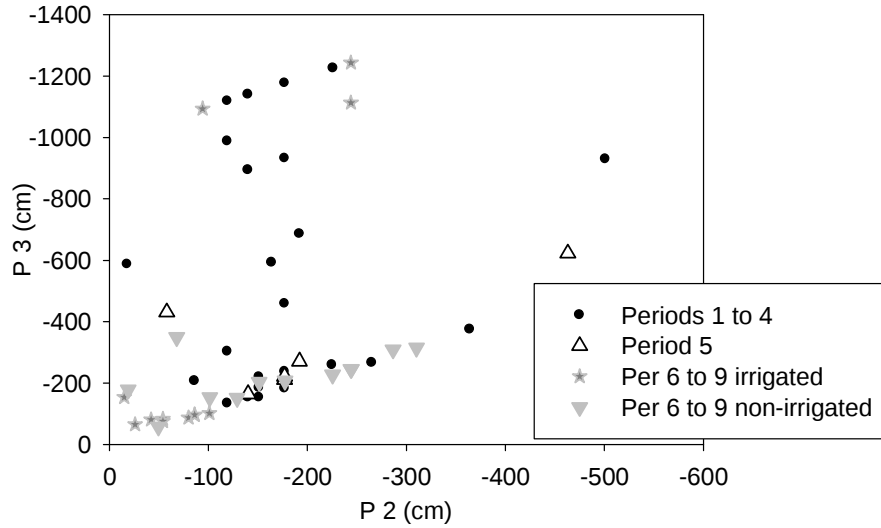


Figure 11: Optimized Feddes parameters for all periods, treatments and plant replicates. Black circles are for all plants from period 1 to 4, white up-triangles for all plants at period 5, grey stars for irrigated plants from period 6 to 9 and grey down-triangles for non-irrigated plants from period 6 to 9.

It is observed that, with our parameterization of the compensation factor ($\omega_c=0$), the optimal parameter set changes with time, plant and treatment. Although it is expected that Feddes parameters could not be optimized in the absence of stress, our study demonstrates that even under stress, the parameterization differs between plants and periods. As the objective function under stress showed a unique minimum for each plant and period (i.e. that the inverse problem for the sink-term profile was well-posed) this questions the accuracy of the Feddes model, when full compensation is considered. It also questions the extrapolation of this function when optimized on one dataset to another dataset with other conditions or plants.

Evolution of the optimized uptake profiles

Figures 12, 13 and 14 show the mean and the standard error (between replicates) of the sink-profiles optimized with Hydrus on each replicate (solid lines), for periods 1 to 5, and after period 5 for irrigated and non-irrigated treatments, respectively. For sake of comparison unstressed uptake profiles (dashed lines) are shown in parallel, as if there were no soil limitations ($\alpha=1$ and $w=1$ in Eq. 1). To illustrate the soil redistribution

process, we define the water content depletion between the beginning (t_1) and the end of the period (t_2) according to Garré et al. (2011):

$$\Delta\theta_v = \frac{\theta_{v,t_2} - \theta_{v,t_1}}{\Delta t} * 100 \quad \text{Eq. 13}$$

When $\Delta\theta_v$ is negative, soil water is depleted. In general, $\Delta\theta_v$ always differ to the sink-term profiles. Typical assumption that soil water depletion represents the sink-term profile would be clearly wrong here, due to non-negligible soil water redistribution.

For periods 1 to 4 (Fig. 12) the optimized sink-term and root profiles were quite similar. However, slight differences can be observed between 0 and 10 cm depth, probably due to a poor knowledge of the actual root distribution at that level. At all depths standard errors for potential and optimized sink-term profiles overlapped indicating small differences between both situations. For period 5, root and sink-term profiles differentiated a bit more, even if uptake variability (represented by the horizontal standard error bars) covered the root profiles.

During period 6 to 9, for irrigated treatments, the water uptake followed approximately the measured root profile (Fig. 13). Due to differences in root development and in irrigation doses among irrigated plants, the errors bars are huge in the first horizons of the columns at periods 8 and 9. It is interesting to observe that the water depletion profiles changed dramatically between periods 6 - 7 and 8 - 9. While, at periods 6 and 7, water depleted mainly at the bottom of the soil columns, the depletion took place at the upper half of the column for periods 8 and 9. This was the result of our irrigation scheme, which was probably slightly overestimated for periods 6, where an increase of the water content was observed above 60 cm depth. The increase in the bottom of the columns for the other periods illustrated the water redistribution.

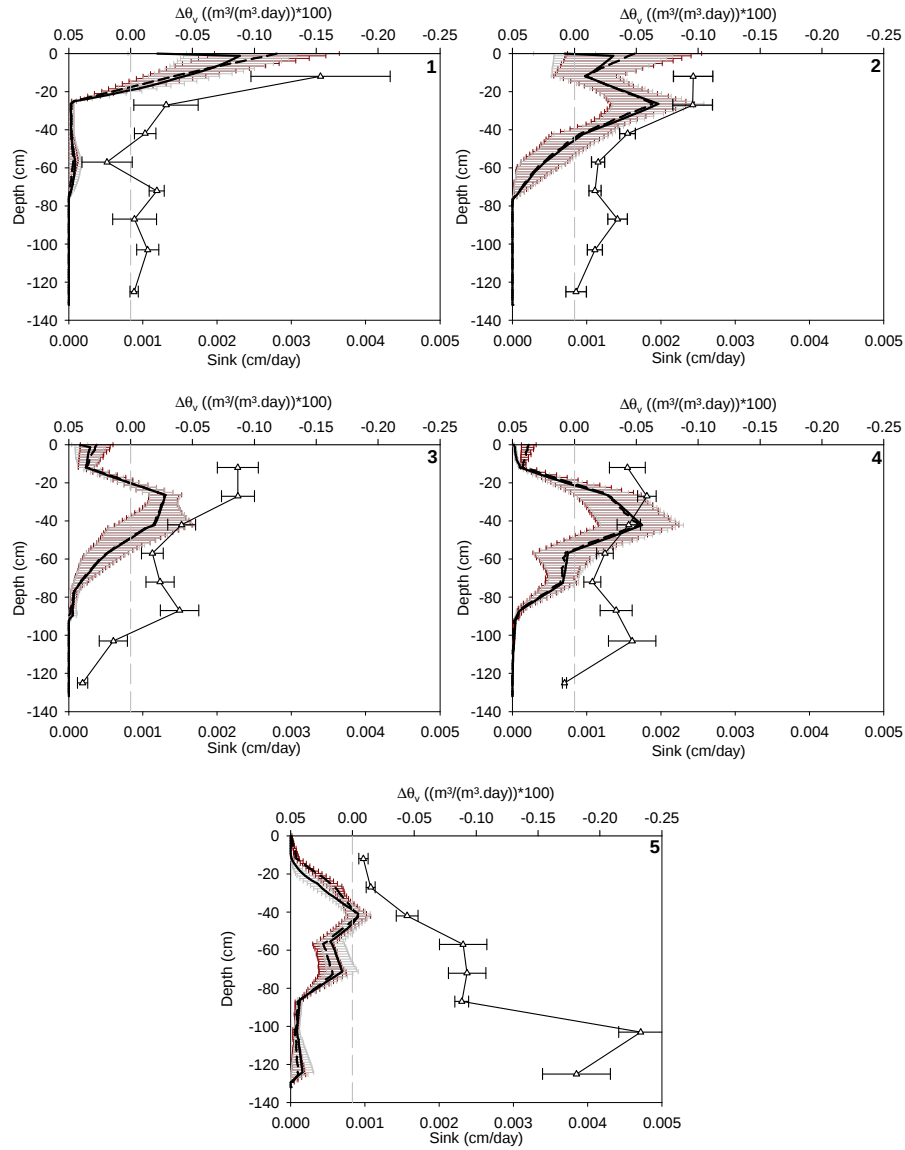


Figure 12: Evolution of the optimized sink-term profiles (bold solid lines) for periods 1 to 5 (see period number in the upper right corner of the subplots). Potential root water uptake profile is represented by the dashed line. Water content changes in the profile (TDR data) during the period are represented with white triangles. Negative values are for soil drying, positive for soil moistening. All data are mean values of 6 replicates at each depth; horizontal bars are the standard errors. Red bars are for the unstressed sink-term profiles, light grey for the actual sink-term profiles and black ones for water content changes.

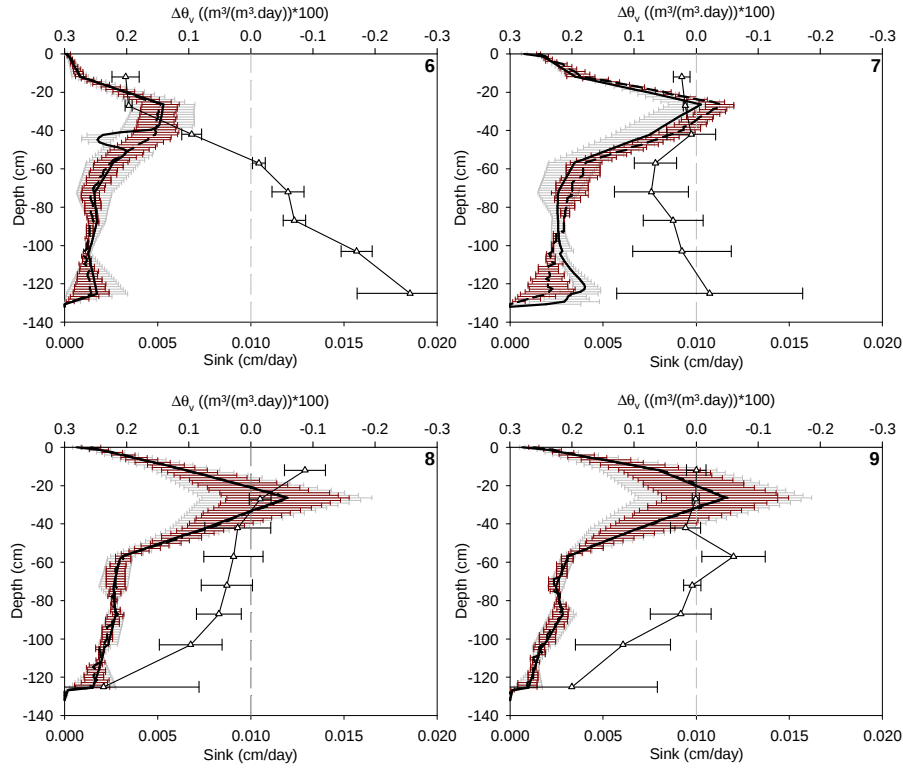


Figure 13: Evolution of the sink-term profiles simulated by Hydrus 1D program (bold solid lines) for periods 6 to 9 (see period number in the upper right corner of the subplots) for irrigated plants. Potential root water uptake profile is represented by the dashed line. Water content changes in the profile (computed from TDR data) during the period are represented with white triangles. Negative values are for soil drying, positive for soil moistening. All data are means values of 3 replicates at each depth; horizontal bars are the standard errors. Red bars are for the unstressed sink-term profiles, light grey for the actual sink-term profiles and black ones for water content changes.

Under non-irrigated treatment, plants clearly showed compensation (Fig. 14). The sink actual profiles were different from the potential ones. Indeed, in those cases, the errors bars did not always overlap. With time, the maximum root water uptake depth went down. At the end of the experiment (period 9), only few lateral roots contributed to water extraction thanks to the compensation mechanism.

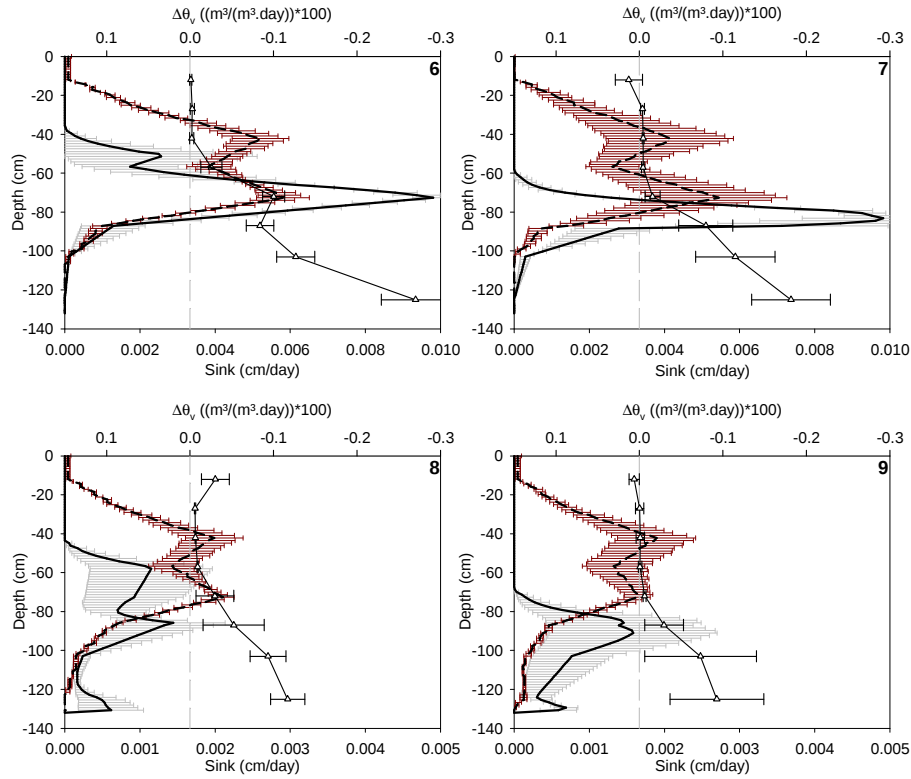


Figure 14: Evolution of the sink-term profiles simulated by Hydrus 1D program (bold solid lines) for periods 6 to 9 (see period number in the upper right corner of the subplots) for non-irrigated plants. Potential root water uptake profile is represented by the dashed line. Water content changes in the profile (computed from TDR data) during the period are represented with white triangles. Negative values are for soil drying, positive for soil moistening. All data are means of 3 replicates at each depth; horizontal bars are the standard errors. Red bars are for the unstressed sink-term profiles, light grey for the actual sink-term profiles and black ones for water content changes.

Water depletion is again misleading for predicting root sink (Fig. 14), even under these dry conditions (which are supposed to prevent soil water redistribution). In general the depth of maximum uptake (sink) is higher than the maximum depletion depth ($\Delta\theta_v$). Indeed, the substrate in the bottom of the column is always wetter than the rest, which allows water redistribution from the bottom to upper zones, where most of the root uptake takes place. In our case, $\Delta\theta_v$ profiles were more closely related to water content (and hydraulic conductivity) than to sink term profiles.

Evolution of the weighted stress index obtained by optimization

Table 4 shows the ranges and the means of the weighted stress index estimated for each period and all the replicates ($n=6$ before period 6, and 3 after). For the five first periods, it is observed that the mean weighted stress index ranges between 0.77 and 0.92, meaning that the actual sink term profile was closed (but not exactly similar) to the root distribution profile. This can be explained by the uncertainty on the root profile for these periods. This was especially the case for the first period for which, only a few lateral root impacts were observed and most of the root growth occurred above 12 cm depth. This brings a huge uncertainty because we have no information on root growth above this depth. For period 5, there was a decrease in the weighted stress index (minimum of 0.61). This confirms what was observed in Figure 11, namely that plants started their compensation mechanism during the period preceding the beginning of the treatments, while the transpiration was still optimal (confirmed here after).

Table 4: Weighted stress indexes for the different periods at the day of measurement of the root impacts. Minimal and maximal optimized values (between treatments) are given. Mean values are put between brackets.

PERIOD	WEIGHTED STRESS INDEX (-)	
1	0.73 < ω < 0.85 (0.79)	
2	0.85 < ω < 0.91 (0.89)	
3	0.88 < ω < 0.95 (0.92)	
4	0.88 < ω < 0.96 (0.92)	
5	0.61 < ω < 0.94 (0.77)	
	<i>Irrigated</i>	<i>Non-irrigated</i>
6	0.84 < ω < 0.95 (0.89)	0.46 < ω < 0.75 (0.61)
7	0.78 < ω < 0.90 (0.82)	0.24 < ω < 0.63 (0.41)
8	0.85 < ω < 0.96 (0.92)	0.01 < ω < 0.19 (0.09)
9	0.94 < ω < 0.96 (0.95)	0.00 < ω < 0.07 (0.02)

We observe a huge decrease in the weighted stress index in non-irrigated plants between periods 5 and 6. This value was then almost stable at period 7. Looking at Figure 14, it appears clearly that most of the water was taken around 72 cm depth at this time (periods 6 and 7) explaining the small weighted stress index.

At period 8, the actual sink intensity decreased a lot in the non-irrigated scenario (Fig. 14) and the potential and actual profiles remained really different (small weighted stress index). For the last period, the value of the

weighted stress index became rather small for the non-irrigated plants. Due to a huge lack of water in the non-irrigated columns, the chicories plants had to take the remaining available water in the bottom of the columns (Fig. 14). At this time, the sink term was totally different from the root profile, explaining the small value of the weighted stress index.

For the irrigated plants, we observe that the weighted stress index was always quite high indicating that the sink and root profiles were close together for this treatment (Fig. 13). At periods 6 and 7, compensation decreased slightly indicating that, even without stress, the water content distribution controlled the process, probably due to inadequacy in the irrigation schedule for these periods. Indeed, Fig. 13 shows that the soil continued to dry a lot in the bottom of the columns. Root and sink-term profiles were also quite different at this time (Fig. 13). Finally, to explain those values at periods 6 and 7, a lack of knowledge of the real root profile could not be excluded.

Compensation as first reaction against drought

Looking at the transpiration of the whole plant, we observed that transpiration started to slightly decrease for non-irrigated plants between periods 5 and 6 (Fig. 4). The actual transpiration of young leaves (Table 5) decreased for non-irrigated plants at period 6. It remained then always smaller in the non-irrigated scenario than for control plants. Analyzing the situation of period 5, no statistical difference was observed between future treated plants ($E_{\text{control}} = 1.04 \pm 0.12$ and $E_{\text{stress}} = 0.84 \pm 0.18$). Moreover, the instantaneous transpiration of young leaves remained high at this period, suggesting that the compensation started before any reduction in the gas exchanges. Indeed, as stated before, it seems that compensation started already at period 5 (Fig. 12).

Table 5: Mean instantaneous transpiration for control and non-irrigated plants. Values are given with their standard error. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Period	Instantaneous transpiration (E (mmol _{H₂O} .m ⁻² .s ⁻¹))	
	Control	Drought
1	-	
2	1.08 ± 0.07	
4	0.85 ± 0.07	
5	0.94 ± 0.11	
6	0.93 ± 0.09	0.61 ± 0.12*
7	1.17 ± 0.12	0.36 ± 0.06***
8	0.90 ± 0.13	0.46 ± 0.09*
9	1.79 ± 0.31	0.51 ± 0.01*

Compensation as a precursor for root growth

Figure 15 shows the evolution of the Feddes stress parameter (α) profiles for control (A = before treatments, B = after irrigation) and non-irrigated plants (C, D), together with root development. When α equals one, there is no soil-limitation (and therefore no compensation). When soil limits water uptake, $\alpha < 1$ and compensation may occur. Looking at figure 15 A and B, it appears that at the beginning of the growing season (Fig. 15 A) or when plants were irrigated (Fig. 15 B) there was no soil limitation (α very close to 1). In those situations, root growth occurred mostly at the top of the columns.

The situation was totally different in a non-irrigated situation (Fig 15 C and D). Indeed, in case of stress and when there was still some root development, it appears that the root growth took place mostly just under the zones where the stress function went from 0 to 1. This is a clear indication that the plant sent lateral roots just under the critical depletion zone.

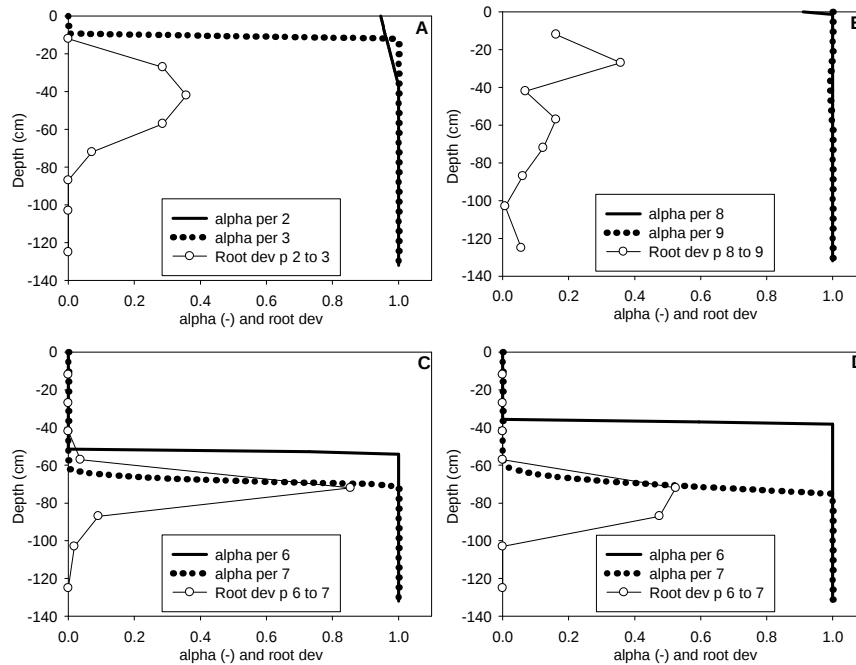


Figure 15: Evolution of the stress function (α) in different situations. A: between periods 2 (solid line) and 3 (dashed line) for a control plant. B: between periods 8 (solid line) and 9 (dashed line) for an irrigated plant. C and D: between periods 6 (solid line) and 7 (dashed line) for two non-irrigated plants. Each graph contains also the proportion of the total root development for the eight observed depths (white circles).

Conclusion

We developed a methodology to characterize the sink term dynamics of chicory under well-watered and water-deficient treatments. Physiological measurements (IRGA) and comparison of control to water deficient transpiration confirmed that the treatments succeeded and stress was observed for 3 of the 6 plants after period 5, as expected. Root growth and sink dynamics were shown to be different between water-deficient and control situations (Figs. 5, 6, 12, 13 and 14). The shape of the root distribution was clearly affected by the lack of water: total root length decreased and root profiles developed deeper.

A 1-D Richards equation model with a sink term described with a Feddes stress function and a compensation mechanism was used as forward model. It was shown that under unstressed conditions, Feddes function was

logically not sensitive but this had no impact on the sink-term determination. Under water-limited conditions, the Feddes parameters were better defined. However, optimized Feddes parameters evolved from period to period, and changed in function of the treatment proving that this model is not unique for a given plant type (Fig. 11). On the opposite, uptake profiles were shown to be consistent between replicates and well defined for a given period, evolving consistently with time, efficiently discriminating stressed from unstressed conditions.

Compensation was considered on the basis of a weighted stress index ω estimated from the distribution of the stress function with depth. Compensation was observed for all periods, partly in relation to a lack of accuracy in the root profile estimates. However, compensation magnitude increased with time and water distribution. It was observed under water-deficit irrigation that compensation occurred before reduction in transpiration, as a consequence of a lack of water at the upper soil layers. It is a passive mechanism, which helps plants sustain a suboptimal soil water distribution. In stress conditions, the chicories took 99% of their water with 40% of the lateral roots (roots located under 60 cm depth: Fig. 14-9).

It was also observed that with stress, a physiological compensation process was launched by the plant, which produced more roots in the wetter zone, below the water extraction front. While hydraulic compensation occurred instantaneously, root growth compensation took place within a week delay. The fact that chicory keeps some gas exchanges and growth in drought conditions allows it to react against stress and adapt its lateral root growth. The physiological rationale of this mechanism may be linked to root to shoot signaling. The type of signaling (hydraulic, hormonal, or other) should be further investigated.

Acknowledgement

The authors are very grateful to FNRS for the PhD research grant of BV (Aspirant FNRS) and to G. Rentmeesters, B. Van Pee and B. Capelle for the valuable technical assistance.

References

- Alvarez S., Navarro A., Nicolas E. & M.J. Sanchez-Blanco,** 2011. Transpiration, photosynthetic responses, tissue water relations and dry mass partitioning in *Callistemon* plants during drought conditions. *Scientia Horticulturae* **129**: 306-312.

- Asbjornsen H., Goldsmith G.R., Alvarado-Barrientos M.S., Rebel K., Van Osch F.P., Rietkerk M., Chen J., Gotsch S., Tobon, C., Geissert D.R., Gomez-Tagle A., Vache K. & T.E. Dawson**, 2011. Ecohydrological advances and applications in plant-water relations research: a review. *Journal of Plant Ecology* **4**: 3-22.
- Burgess S.S.O., Adams M.A., Turner N.C. & K.O. Chin**, 1998. The redistribution of soil water by tree root systems. *Oecologia* **115**: 306-311.
- Campbell, R.B., Bower, C.A. & L.A. Richards**, 1948. Change of electrical conductivity with temperature and the relation of osmotic pressure to electrical conductivity and ion concentration for soil extracts. *Soil Sci. Soc. Proc.* 66-69.
- Dardanelli J.L., Bachmeier O.A., Sereno R. & R. Gil**, 1997. Rooting depth and soil water extraction patterns of different crops in a silty loam Haplustoll. *Field Crops Research* **54**: 29-38.
- Domec J.C., King J.S., Noormets A., Treasure E., Gavazzi M.J., Sun G. & S.G. McNulty**, 2010. Hydraulic redistribution of soil water by roots affects whole-stand evapotranspiration and net ecosystem carbon exchange. *New Phytologist* **187**: 171-183.
- Draye, X., Y. Kim, G. Lobet, and M. Javaux**. 2010. Model-assisted integration of physiological and environmental constraints affecting the dynamic and spatial patterns of root water uptake from soils. *Journal of Experimental Botany*, **61**:2145-2155.
- Feddes R.A., Kowalik P.J. & H. Zaradny**, 1978. Simulation of field water use and crop yield. Simulation Monograph, Pudoc, Wageningen.
- Feddes R.A. & P.A.C. Raats**, 2004. Unsaturated-zone modelling; progress, challenges and applications. Chapter 4: Parameterizing the soil-water-plant root system. Wageningen UR Frontis series, Kluwer Academic Publishers.
- Garre S., Javaux M., Vanderborght J., Pages L. & H. Vereecken**, 2011. Three-Dimensional Electrical Resistivity Tomography to Monitor Root Zone Water Dynamics. *Vadose Zone Journal* **10** : 412-424.
- Huisman J.A., Lin C.P., Weihermuller L. & H. Vereecken**, 2008. Accuracy of bulk electrical conductivity measurements with time domain reflectometry. *Vadose Zone Journal* **7**: 426-433.

- Jarvis, N.J.**, 1989. A simple empirical-model of root water-uptake. *Journal of Hydrology* **107**: 57-72.
- Jarvis, N.J.**, 2011. Simple physics-based models of compensatory plant water uptake: concepts and eco-hydrological consequences. *Hydrology and Earth System Sciences* **15**: 3431-3446.
- Javaux, M. and M. Vanclooster**. 2004. In situ long-term chloride transport through a layered, non saturated subsoil. 1. Dataset, interpolation methodology and results. *Vadose Zone Journal* **3**:1322-1330.
- Javaux, M. and M. Vanclooster**, 2006. Scale-dependency of the hydraulic properties of a variably saturated heterogeneous sandy subsoil. *Journal of Hydrology* **327**(3-4):376-388.
- Javaux, M., T. Schroeder, J. Vanderborght, and H. Vereecken**. 2008. Use of a three-dimensional detailed modelling approach for predicting root water uptake. *Vadose Zone Journal* **7**:1079–1088.
- Li W.D., Hou J.L., Wang W.Q., Tang X.M., Liu C.L. & D. Xing**, 2011. Effect of water deficit on biomass production and accumulation of secondary metabolites in roots of *Glycyrrhiza uralensis*. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**: 538-542.
- Meinzer F.C., Brooks J.R., Bucci S., Goldstein G., Scholz F.G. & J.M. Warren**, 2004. Converging patterns of uptake and hydraulic redistribution of soil water in contrasting woody vegetation types. *Tree Physiology* **24**: 919-928.
- Monti A, Amaducci MT, Pritoni G, Venturi G**, 2005. Growth, fructan yield, and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) as related to photosynthetic capacity, harvest time and water regime. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1389-1395.
- Musters P.A.D. & W. Bouten**, 2000. A method for identifying optimum strategies of measuring soil water contents for calibrating a root water uptake model. *Journal of Hydrology* **227**: 273-286.
- Nelson P.N., Banabas M., Scotter D.R. & M.J. Webb**, 2006. Using soil water depletion to measure spatial distribution of root activity in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations. *Plant and Soil* **286** : 109-121.
- Richards L.A.**, 1931. Capillary conduction of liquids through porous mediums. *Physics* **1**: 318–333.

- Samouelian A., Cousin I., Tabbagh A., Bruand A. and Richard G., 2005.** Electrical resistivity survey in soil science: a review. *Soil & Tillage Research* **83**: 173-193.
- Schittenhelm S., 1999.** Agronomic performance of root chicory, Jerusalem artichoke, and sugarbeet in stress and nonstress environments. *Crop Science* **39**: 1815-1823.
- Simunek J. & J.W. Hopmans, 2009.** Modeling compensated root water and nutrient uptake. *Ecological Modelling* **220**: 505-521.
- Skinner R.H., 2008.** Yield, root growth, and soil water content in drought-stressed pasture mixtures containing chicory. *Crop Science* **48**: 380-388.
- Topp G.C., 1980.** Electromagnetic determination of soil water content: measurements in coaxial transmission lines. *Water Resources Research* **16**: 574-582.
- VanDam J.C., Stricker J.N.M. & P. Droogsters, 1994.** Inverse method to determine soil hydraulic functions from multistep outflow experiments. *Soil Science Society of America Journal* **58**: 647-652.
- Vandoorne B., Mathieu A.-S., Van den Ende W., Vergauwen R., Périlleux C., Javaux M. & S. Lutts, 2012.** Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. *sativum*) independently of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. (In press).
- Vrugt J.A., Hopmans J.W. & J. Simunek, 2001.** Calibration of a two-dimensional root water uptake model. *Soil Science Society of America Journal* **65**: 1027-1037.
- Vuylstekker C., Dewaele E. & S. Rambour, 1998.** Auxin induced lateral root formation in chicory. *Annals of Botany* **81**: 449-454.
- Weynants M. 2011.** Linking soil hydraulic properties to structure indicators: experiments and modelling. PhD thesis. Université catholique de Louvain, Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale, pp 144.
- Zuo Q. & R. Zhang, 2002.** Estimating Root-Water-Uptake Using an Inverse Method. *Soil Science* **167**: 561-571.

Inter-chapitres 2 - 3

Arrivé au terme de ces 2 premiers chapitres, il nous a été possible de comprendre que la chicorée est une plante capable de résister au manque d'eau. Le premier chapitre nous a montré que la plante est capable de mettre sa croissance en veille en cas de stress hydrique tout en gardant un métabolisme actif. La photosynthèse et la synthèse d'inuline par exemple sont toujours aussi efficaces mais doivent simplement se faire selon des échanges gazeux réduits de part la fermeture des stomates et la réduction de surface foliaire. Si les mécanismes sont toujours efficaces, l'accumulation de matière est quant à elle fortement réduite. Il n'est donc pas possible de parler de tolérance de la plante vis-à-vis du manque d'eau d'un point de vue agronomique.

Le second chapitre nous a quant à lui informé sur le comportement de la racine. Il est en effet apparu qu'en cas de manque d'eau dans le substrat, un phénomène de compensation se met en place. La dynamique de prise d'eau en ressort fortement modifiée. En effet, contrairement à ce qui se passe en cas de sol bien pourvu en eau, nous avons pu modéliser que la prise d'eau n'est plus proportionnelle au profil racinaire en cas de sécheresse. La prise d'eau a lieu là où l'eau se trouve. Outre ce mécanisme passif, lorsque le stress perdure la plante réduit ses échanges gazeux et envoie des racines latérales là où l'eau se trouve. Elle met donc en place également des mécanismes actifs pour s'adapter au manque d'eau.

Au vu des méthodes utilisées, l'étude de la dynamique de la prise d'eau n'a pu se faire que selon la profondeur, c'est-à-dire en une dimension. Dans le cadre d'un troisième chapitre, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'aller voir au-delà de l'étude en une dimension et de chercher à observer le comportement racinaire dans les 3 dimensions de l'espace.

Peu de chercheurs se sont jusqu'ici attelés à ce genre d'études si bien qu'une grosse partie du chapitre 3 consistera en une validation de la méthode de visualisation de la teneur en eau du sol en 3 dimensions. Une fois la méthode validée, il sera intéressant de chercher à suivre l'évolution de la teneur en eau du sol dans le cadre de 2 scénarios d'irrigation contrastés. Nous chercherons à relier les évolutions de teneurs en eau observées avec le comportement racinaire. Après avoir étudié le comportement racinaire selon la profondeur dans le chapitre précédent, nous regardons également dans le chapitre suivant comment la plante se comporte en termes de prise d'eau à une profondeur donnée. Il sera intéressant de voir si la racine a tendance à homogénéiser le contenu en

eau du sol d'un horizon ou au contraire tend à augmenter la variabilité de la teneur en eau.

S'il ne sera pas possible de tirer des grandes conclusions physiologiques sur base de l'étude de 2 plantes, il sera cependant intéressant d'aller voir comment la transpiration, la croissance racinaire, le rendement,...évoluent dans des situations d'irrigation contrastée. Le but ici est d'établir des hypothèses du comportement de la chicorée. Ces dernières pourront être vérifiées par la suite.

Chapitre 3

3-D soil water depletion due to chicory root water uptake monitored by Electrical Resistivity Tomography

In preparation.

Vandoorne B.^{1,2}, Beff L.¹, al Barri B.^{1,2}, Lutts S.² and M. Javaux^{1,3}

1. *Earth and Life Institute – Environmental Sciences, Université catholique de Louvain, Croix du Sud, 2, L7.05.02, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.*
2. *Groupe de Recherche en Physiologie Végétale, Earth and Life Institute - Agronomy, Université catholique de Louvain, Croix du Sud, 5, L7.07.13, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.*
3. *Agrosphere (IBG-3), Institut für Bio- und Geowissenschaften - Forschungszentrum Juelich GmbH, Juelich, Germany*

Abstract

This study investigates the potential of Electrical Resistivity Tomography (ERT) to monitor soil water content, root water uptake and plant transpiration in soil containers. We wanted to investigate the sensitivity of root-chicory, a cash crop cultivated in Western Europe to produce inulin, to water stress. Two plants were grown in different soil columns (1.4 m height and 0.4 m i.d.) equipped with electrodes for ERT monitoring and subject to contrasted irrigation scenarios. Thanks to mass balance comparison, we could assess that the accuracy of ERT on the integrated mass was 97 %. In term of plant physiology, this study confirms that chicory was able to adapt its growth when there is a lack of water in the soil. In particular, the leaf surface was reduced in order to limit the water depletion. Nevertheless, some gas exchanges still occur and general metabolism was maintained. Finally, this study showed clearly that compensation is very important for the plant. The water uptake was proven not to be directly proportional to the root profile, but water depletion was occurring at depths where water was present. Yet, water uptake tends to increase the lateral coefficient of variation of the water content.

Introduction

Although plants play an important role on the terrestrial water cycle, monitoring in situ water depletion due to plant root water uptake (RWU) still remains challenging. Traditionally soil coring (Sharp and Davies, 1985)

has been widely used for sake of simplicity and robustness but is a destructive, really invasive and time consuming technique. Other techniques were thus developed like the TDR (Time Domain Reflectometry; Hupet and Vanclooster, 2002; Robinson *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2004) or the neutron probe (Hupet and Vanclooster, 2002; Koumanov *et al.*, 2006) and gave new insight on the impact of RWU on water depletion dynamics. However, those methods give only a local information and induce soil perturbations.

In 2D rhizotrons, light transmission was used to visualize 2D water depletion around maize roots (Garrigues *et al.*, 2006). At the column scale, Garré *et al.* (2010) used the ERT (Electrical Resistance Tomography) technique to follow 3-D soil water depletion under barley without irrigation. Werban *et al.* (2008) used ERT in 2D to monitor soil water content in the root-zone of a lupine plant grown in pots of 30 cm radius and 50 cm height at the day time-scale. Using this technique, they were able to observe diurnal fluid movements and uptake and night redistribution on a 2D plan. Using surface and borehole configurations, al Hagrey and Petersen (2011) confirmed that ERT should be able to follow centimeter range processes like root-growth and water uptake, even in 3 dimensions. Nevertheless, in this last paper, the authors did not quantify the process in terms of water content. Our aim is to apply ERT at the column scale to investigate plant water uptake behavior.

In this study we combined ERT with other physiological methods to investigate the sensitivity of chicory to water stress. Chicory is a biannual cash crop cultivated in Western Europe and other parts of the world to produce inulin, i.e. a linear β (2,1)-type fructan (Wilson *et al.*, 2004). It has been shown that the yield of this plant may suffer from further climate change in particular in drought conditions (Vandoorne *et al.*, 2012; A). Chicory has a particular rooting system with a big tap root connected to thin lateral roots which are originated helicoidally along the tap root (Vandoorne *et al.*, 2012; B). Root architecture has been mentioned as an important factor for uptake (Pierret *et al.*, 2006). It is expected that this architecture, combined with different soil water content distribution may affect the distribution of the uptake at the plant scale. We therefore developed a specific protocol to assess in parallel water content dynamics by ERT and root development under different irrigation scenarios. In addition, chicory physiological parameters like leaf surface and transpiration were monitored to clarify the link between water uptake and plant physiology.

In this study we used ERT and physiological measurements to investigate the reaction of root-chicory and soil water dynamics under contrasted irrigation scenarios during the 3 last months of the 6 months growing period of this crop. The objectives of this study were twofold: (1) to validate the use of ERT at the tank scale to monitor 3-D soil water dynamics and (2) to use this monitoring to investigate and understand the RWU dynamics under different watering schemes.

Material and methods

Experimental set-up

Two root-chicory plants were grown in PVC (1.42 m high, 0.38 m i.d.) columns filled with repacked brusselean sand, in a phytotron, in a similar set-up than in Vandoorne *et al.* (2012; B). The mean temperature during the growing season was 24°C during the 16 hours day and 18°C during the 8 hours night. The mean relative humidity in the air was 55% and the light intensity was 370 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (reached with fluorescent tubes Osram Lumilux® XT) at the top of the canopy. Soil hydraulic properties can be found in Vandoorne *et al.* (2012; B).

Column outlets were connected to a nutrient solution reservoir at the bottom. This reservoir could be moved upward to generate a raise of the water table. These columns were equipped with electrodes for performing ERT monitoring and with temperature probes. Transparent windows located along the column wall allowed the assessment of lateral root impacts (for more details see Vandoorne *et al.* 2012; B). Each root hitting the window or crossing it was counted as an impact. Lateral roots are assumed to be mainly used for RWU. Regularly, the columns were weighted to further mass balance check.

Treatments

Seeds of *Cichorium intybus* var. *sativum* (purified line from cultivar Crescendo kindly provided by Chicoline – Cosucra, Warcoing) were sown in both columns under static equilibrium with the nutrient solution. In addition, a small amount of solution (total of 3.6 L) was given to the plants from the top of the column during the first 99 days of growth in order to guarantee a good establishment of the culture (Figure 1). After this 99-day period, differentiated treatments started between both columns (referred to as A and B).

In order to start the treatments with the same amount of water in both columns, we removed 4L of solution from the bottom of column A using a vacuum pump at 92 DAS (Days After Sowing). The aim was to homogenize the water content for both columns. This was achieved at DAS 99.

From DAS 99, column A was regularly irrigated from the top of the column while column B did not receive water anymore to generate a drought stress later in the growing season. The timing and amount of input/output water can be found on Fig. 1.

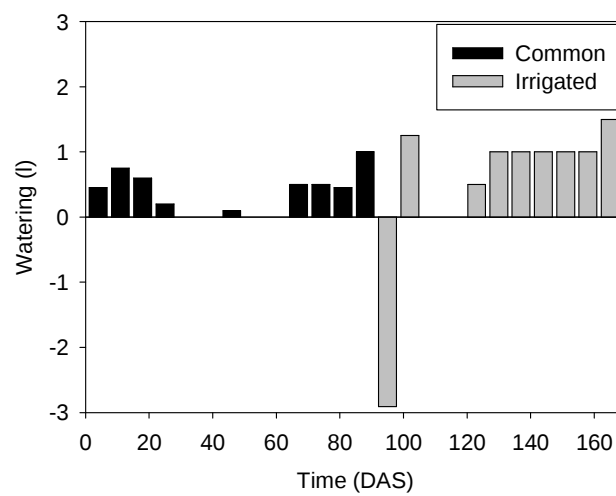


Figure 1: Balance of the quantities of solution brought and removed per week during the common period and for the irrigated plant after DAS 99.

Column equipment

Each column was equipped with 116 electrodes made of stainless steel bolts of 0.8 cm diameter and 2.5 cm length: 2 cm of those bolts were inserted in the soil.

Ninety electrodes were distributed along column walls in nine different rows. They were separated by 12.6 cm on a same row. Starting from the top, the 8 first rows were spaced by 15 cm and the 2 last by 20 cm (Fig. 2 A and C). Six probes were also inserted in the center of the columns at 55, 69, 83, 96, 110 and 130 cm depth (Fig. 2B). Finally, 10 probes were also distributed concentrically on two cross sections at 4 and 130 cm depth (Fig. 2B).

Four temperature NTC probes (Negative Temperature Coefficient thermistors) were horizontally inserted into one column at 25, 52, 80 and

108 cm depth (Fig. 2A). Temperature measurements were recorded every hour. Mean temperatures at the probe depths were calculated using a linear regression of the temperature measurements. The conductivity dataset was then corrected for the temperature effect (Campbell *et al.*, 1948).

Plant and soil Monitoring

Root growth, stomatal conductance and gas exchanges were regularly monitored during the experiment. The methodology was the same as what was done in Vandoorne *et al.* (2012; B). The growth was followed each 20 days thanks to marks put on the transparent plastic sheet attached on the windows.

The soil water content (SWC) was monitored 22 times during the growing season. Two methods were used: weight measurements and Electrical Resistance Tomography (ERT). Both measurements were performed during the same day.

At the end of the experiment, 100 cm³ soil cores were extracted from the column for water content measurements. They were used to check the validity of the soil water content measurements for the last day.

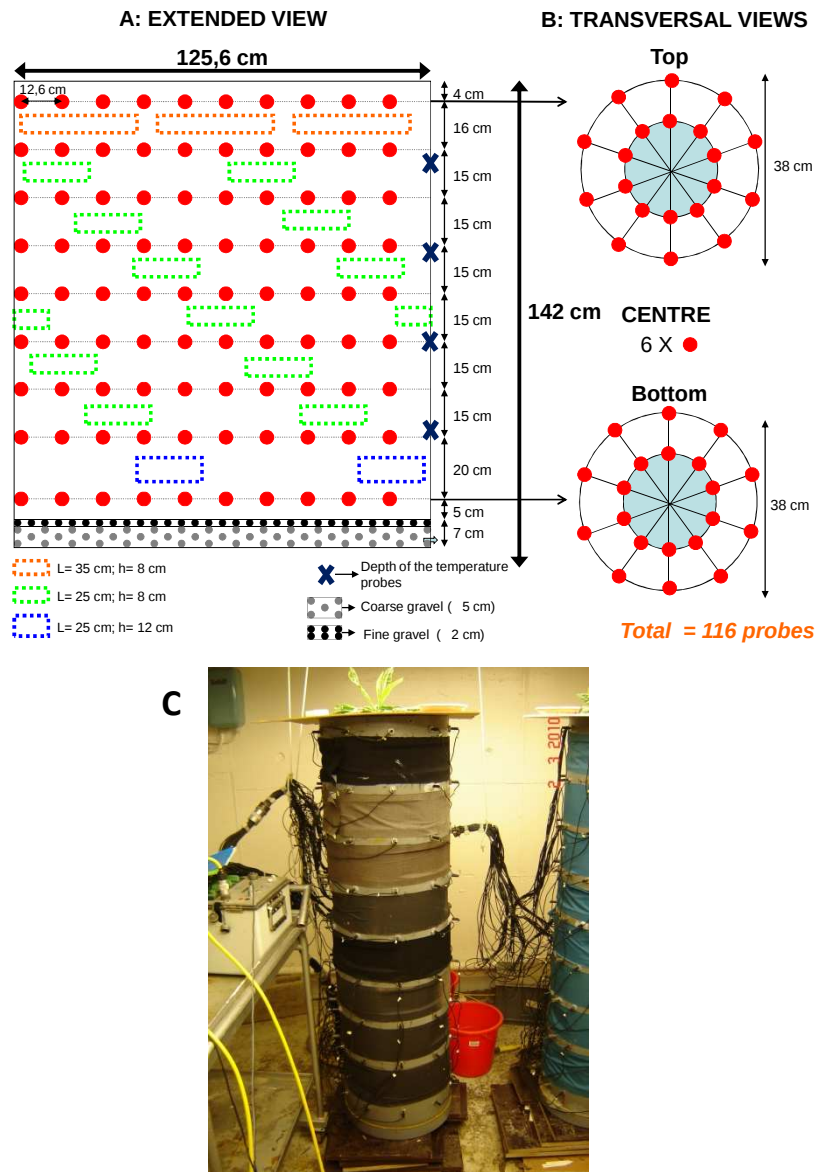


Figure 2: Experimental setup. **A:** Extended column; red points are the probes, dashed lines the openings made to observe lateral roots and blue crosses the depth of the temperature probes. **B:** Transversal sections made at 4 and 130 cm depth to represent the probes inserted in the column. **C:** Irrigated column during the experiment.

ERT measurements

We used the ten-channel SYSCAL PRO instrument with the corresponding relay box (SWITCH PRO) for electrodes switching to carry out the ERT measurements (manufactured by Iris Instruments, France; figure 3). ERT provides apparent resistance distribution based on dipole-dipole measurements. During the experiment, 22 measurement frames with 3396 measurements were made for each column, which take 3 hours for each frame. The measurement scheme was built in order to avoid too large distance between injection and measurement electrodes. In order to assess data quality, all these measurements were realized in the forward and the reciprocal mode (Labrecque *et al.*, 1996; Koestel *et al.*, 2008; Garré *et al.*, 2010), where current and potential dipoles are switched. The injection current was fixed at 50 mA.

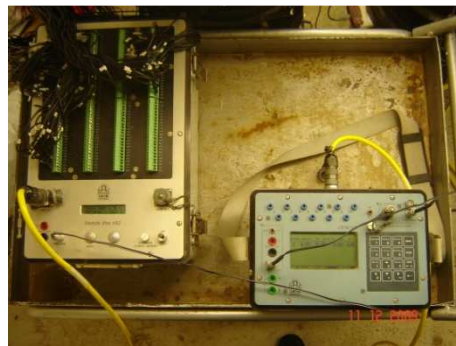


Figure 3: On the left of the relay box (SWITCH PRO) and on the right the ten-channel SYSCAL PRO instrument (Iris Instruments, France)

A data filtering was made on our measurements. All data outside of the predefined bounds of measured resistivity (between 5 and 500 ohm.m) and geometric factor (between -200 and 200 m) were first removed. We eliminated the data associated to a bad stacking factor (higher than 2 ohm.m) given by the measurement instrument (SYSCAL PRO), which is the standard deviation of minimum 2 and maximum 4 stacks of a measurement (Slater *et al.*, 2000). The next step was to eliminate the data with a reciprocal error ($\text{error} = R_n - R_r$), difference between the normal (R_n) and the reciprocal measurements (R_r), higher than 2% of the resistance (R) (Slater *et al.*, 2000). Finally the mean between normal and reciprocal measurements was associated to each injection pair.

After data filtering, it remains almost 1100 data by measurement frame. The inversion was performed using the Boundless Electrical Resistivity

Tomography code (BERT, version 2.0) developed by Günther and Rücker. This program allows getting the 3D distribution of the resistivity values within the column. More details about the BERT program can be found in Günther *et al.* (2006). The results of our inversions in terms of error estimations and quality factors can be found in annex 1.

After inversion, we obtained a distribution of the resistivity in the columns. Those data were inverted and transformed into 3D soil electrical conductivity distributions. A pedo-electrical relationship was then used to convert them into volumetric water content distributions.

Pedo-electrical relationship

Following Laloy *et al.* (2011), we used the volume-averaging model (Pride 2004, Linde *et al.* 2006) as pedo-electrical function:

$$\sigma = \Phi^m \left[\left(\frac{\theta}{\Phi} \right)^n \sigma_f + (\Phi^{-m} - 1) \sigma_s \right] \quad \text{Eq. 1}$$

where σ is the electrical conductivity of the bulk soil (S.m^{-1}), Φ is the porosity (0.42, obtained from water retention measurements), σ_f is the conductivity of the soil solution and σ_s the conductivity of the solid phase. In this equation, the parameters m , n and σ_s had to be optimized for our soil conditions.

To calibrate the model, we used the volumetric water contents (θ_v) and electrical conductivity of the soil solution (σ_f) measured from the core samplings and the bulk electrical conductivities (σ) linked with the cores (measured by ERT, inverse of resistivity). Using the core data, we obtained a m value of 0.8975, a n value of 2.5095 and a σ_s of 0.015 S.m^{-1} .

The electrical conductivity of the soil solution was measured on a mix of 5 g dry soil and 25 ml of deionized water. In order to find the real σ_f of the soil solution it was necessary to go back the quantity of water really present in the soil at the moment of the core sampling (not 25 ml solution for 5 g dry soil but at time t, x ml for 5 g dry soil, depending on the measured θ_v). We therefore used the following formula:

$$\sigma_f(z) = \frac{\sigma_{f,sat}(z) * 5 * \rho_b(z)}{K * \theta_v(z)} \quad \text{Eq. 2}$$

where $\sigma_{f,sat}(z)$ is the conductivity of the soil solution measured on the 5 g dry soil taken at depth z, $\rho_b(z)$ is the apparent density of the soil in the core taken at depth z. The factor 5 is used in order to correct $\sigma_{f,sat}$ to a conductivity of 1 ml of solution mixed with 1 g of dry soil. Indeed, divided by $\theta_v(z)$, it gives then the soil solution conductivity at the core volumetric water content. Finally, K ($\text{S.m}^2.\text{mol}^{-1}$) is the molar ionic conductivity coefficient. This coefficient links the concentration in salts in the irrigation solution with the conductivity of this solution. It depends from the ions present in the solution and their concentration. Empirically, we measured that this factor was $0.79 \text{ (S.m}^2.\text{mol}^{-1})$ for our nutrient solution.

Combining Eq. 1 and 2, the volumetric water content in a voxel of soil situated at x,y,z was calculated following Eq. 3:

$$\theta_v(x, y, z) = \sqrt[n-1]{\frac{[\sigma(x, y, z) * \Phi^{-m} - (\Phi^{-m} - 1) * \sigma_s] * \Phi^n * K}{\sigma_{f,sat}(z) * 5 * \rho_b(z)}} \quad \text{Eq. 3}$$

The remaining quantity of water in the columns was calculated thanks to Eq. 4.

$$Volume\ water_{ERT} = \sum_{i=1}^{19830} (\theta v_{ERT}(x, y, z) * Vol_{ERT}(x, y, z))^2 \quad \text{Eq. 4}$$

where $Vol_{ERT}(x, y, z)$ is the volume of a voxel associated to the data of this place. After treatment, the 19830 voxels of the column presented the same volume of 8.12 cm^3 .

Inversion of the 1-D sink term profile

We used the methodology of Vandoorne *et al.* (2012; B) to analyze the 1-D soil water content profiles. Our aim was to retrieve the actual sink term

profile by fitting the final measured water content profiles obtained from horizontally-averaged ERT measurements.

In order to assess the evolution of the sink term profile after the treatment started, the growing period was divided into 8 different periods (Table 1). The averaged sink was inversely retrieved for each of those using the methodology developed in Vandoorne *et al.* (2012; B).

Table 1: Distribution of the chosen periods along the growing season

Period	Distribution	
	<i>From DAS</i>	<i>To DAS</i>
1	23	48
2	49	70
3	71	98
4	99	119
5	120	130
6	131	140
7	141	155
8	156	169

→ Treatment discrimination

Compensation of the water uptake is a phenomenon which appears generally in dry soils. In case compensation occurs, water uptake is no longer proportional to the root profile and the plant takes its water in wetter horizons. The fact that the root-water uptake profile is not proportional to the root profile can be defined thanks to a weighted stress index:

$$\omega(t) = \int_0^L \alpha(h, z, t) * b(z, t) * dz \quad \text{Eq. 5}$$

where α is a dimensionless stress function between 0 and 1 depending on the soil hydraulic status (Feddes *et al.* 1978) and $b(z,t)$ is the normalized root profile (L^{-1}).

This index varies from 0 to 1. When equal to 1, the root water uptake profile (represented by the sink term distribution) is proportional to the root profile. When $\omega < 1$, sink and root profiles differ.

The compensated sink (S_c) is equal to:

$$Sc(t) = \alpha(h, z, t) * b(z, t) * \frac{T_p(t)}{\max[\omega(t), \omega_c]} \quad \text{Eq. 6}$$

where T_p is the potential transpiration ($L^3/(T.L^2)$) of one plant and ω_c is a user-defined compensation factor ω_c . When ω_c is smaller than 1, water can be extracted from wetter soil depths to balance the loss of uptake in layers where $\alpha < 1$. When $\omega_c = 0$, the uptake is fully compensated and the compensated actual transpiration equals the potential one.

This compensation factor for one period (ω_c) can be defined as:

$$\omega_c = \frac{\sum_{i=1}^n T_{a,i}}{\sum_{i=1}^n T_{p,i}} \quad \text{Eq. 7}$$

where, n is the number of days of the period.

Statistical analyses

The statistical analysis on the physiological data was performed using the SAS software (SAS System for Windows, version 9.1). The normal distributions of the data were analyzed using a Shapiro-Wilk test. When needed, the data were transformed in order to have a normal distribution.

Data were then subjected to an analysis of variance (ANOVA I) considering the presence or absence of stress as factor. The statistical significance of the results was analyzed by the Student-Newman-Keuls test at the 5 % level.

The Root Mean Square Error (RMSE) between ERT and core measurements was calculated following:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\theta v_{ERT}(z) - \theta v_{core}(z))^2}{N}} \quad \text{Eq. 8}$$

With $N=23$, the number of cores linked to ERT measurements.

The coefficient of variation (CV) for the volumetric water content was also calculated at different depths following Eq. 9.

$$CV = \frac{\sqrt{\text{var}(\theta v_{ERT}(z))}}{\text{mean}(\theta v_{ERT}(z))} \quad \text{Eq. 9}$$

Results

Validation of ERT inversion

To check the validity of our method (pedoelectrical relationship, ERT accuracy), we compared mean volumetric water content measured by ERT just before the harvest with the volumetric water content from soil cores extracted just after harvest (Fig. 4).

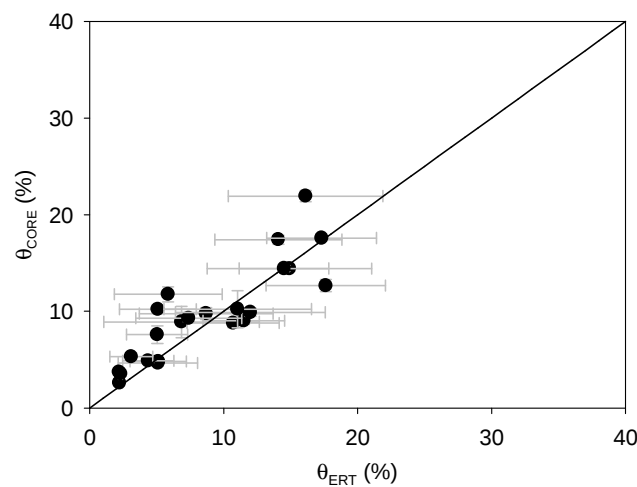


Figure 4: Volumetric water contents predicted by ERT measurements versus soil core volumetric water content obtained by gravimetry. Grey bars are the standard deviations for ERT inversion (x axis) and the range of interval of the 2 soil cores (y axis) for the given depth.

Using Eq. 8, we obtained a RMSE of 2.72%, in the order of magnitude of typical TDR error (see Vandoorne *et al.*, 2012; B). Given our hypotheses regarding horizontal homogeneity and potential sources of uncertainty in ERT inversion, we consider this RMSE as very good. This is thus a first indicator for the quality of our method in terms of data filtering, inversion and pedo-electrical relationship.

Looking at the standard deviations, it seems that given ERT measurements there is a huge horizontal variability in the column and that this variability increases for higher volumetric water contents. This horizontal variability will be studied later. For the two soil cores, it appears that ranges are smaller. This is not surprising due to the fact that we took only two soil cores in the columns. Moreover, for both columns the soil cores were taken

in the middle of the column radius, where the variability is smaller (see Fig. 9). We can hypothesize that if instead of a soil core of some cm^3 taken at a given x,y position, we harvested a full horizontal profile at a given depth, the RMSE would even be really better.

Figure 5 compares for both columns the evolution of the amount of water in the columns based on the integration of the ERT water content and on the column weight.

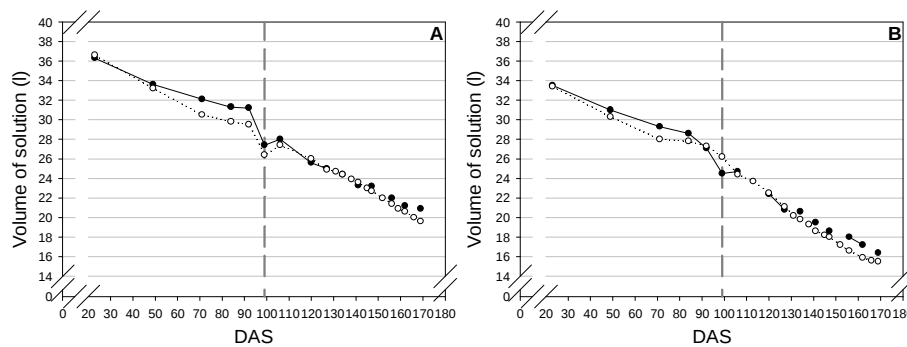


Figure 5: Evolution of the volume of solution in the columns calculated using scale (black points) or volume integration of ERT water content measurements (white points) for column A and B. Vertical dashed line at DAS 99 represents the beginning of the differentiated treatment.

The similarity between ERT and scale based volume evolution indicates the reliability of the ERT inversion and of our pedo-electrical relationship (Eq.3). The maximum relative error is 8% between both methods (Fig. 5B, 156 DAS).

Impact of treatments on transpiration and root development

Figure 6A shows the cumulated transpiration volume for both plants, estimated with the ERT data. It is striking to observe that the cumulative transpiration of the non-irrigated plant is larger than the irrigated one until DAS 150. Looking at the instantaneous transpiration flux (Fig. 6C), we observe that the actual transpiration rate for the irrigated plant is larger already at DAS 120.

The transpiration of the non-irrigated plant (plant B) from DAS 99 to DAS 169 is equal to 11.5 L while the irrigated plant lost 14.6 L during the same period. Given the fact that column B received 7.8 L irrigation water, it

means that it extracted 6.8 L from the initial soil water stock, while plant A depleted 11.5 L out of the soil.

At the beginning of the treatment, plant B had a slightly higher leaf area than plant A (Fig. 6B). It took almost 45 days before this situation was inverted. At the end of the experiment, non-irrigated plant had less total leaf area than at the beginning, which illustrates the strong impact of the treatment (leaf senescence).

In Fig. 6C, we estimated the instantaneous transpiration rate based on measured transpiration (via ERT measurements) per leaf area. Based on ERT measurements, we observe that irrigated plant has a lower transpiration rate at the beginning, but that the trend was reversed after DAS 120. We also performed local measurements of instantaneous transpirations on four young leaves by gas exchange measurements (IRGA). With this system, we observed a significant difference in the transpiration rate between both plants already 6 days after the beginning of the treatment (Fig. 6C). Differences in trend between IRGA and ERT come from the facts that (i) IRGA is a short term measurement while ERT is the result of an integration on several hours or days, (ii) the IRGA measurement are always performed around midday when the transpiration is at its maximum value of the circadian cycle and (iii) IRGA is performed on young leaves. We hypothesize that for the irrigated plant, old leaves may have a significantly lower transpiration than the young ones.

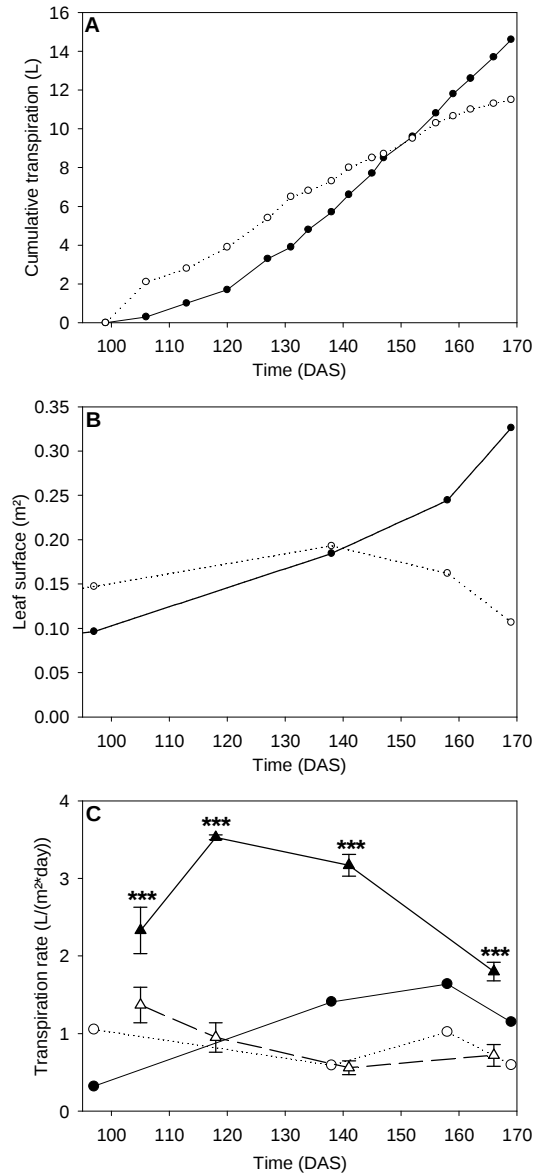


Figure 6: A: Evolution of the cumulative transpiration for plant A (irrigated: black points) and plant B (non-irrigated: white points) estimated by ERT measurements starting at DAS 99. B: Evolution of the leaf surface for plant A (black points) and B (white points). C: Evolution of the transpiration rate evaluated via ERT measurements (circles) and IRGA (triangles) for plant A (black symbols) and B (white symbols). IRGA measurements are given with their standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

We observe that although the impact of the treatment is relatively quickly felt by the plant as demonstrated by the instantaneous transpiration rate of young leaves, the initial conditions between both plants was not the same. It appears that plant A (irrigated) had a lower total transpiration at the beginning of the treatment discrimination, explained by its lower leaf area. We hypothesize that genetic variability or a slight stress due to an excess of water before the start of the experiment could explain this initial difference. With time though, treatment impacts leaf growth and discrimination of the total transpiration in accordance with irrigation levels is observed.

Figure 7 shows that the root profiles between irrigated (Fig. 7A) and non-irrigated (Fig. 7B) plants are already different 97 days after sowing, just before the differentiated treatments started. Indeed, the future irrigated plant presented more impacts (290) than the future non-irrigated one (180). This difference comes mostly from the highest quantity of root impacts in the first horizons of the column for the future irrigated plant. On the other hand, both plants presented almost 90 impacts at 72 cm depth. This peak in roots impacts around 72 cm depth was already observed by Vandoorne *et al.* (2012; B). We hypothesize that this is due to the fact that rear end of the main root reaches 65-70 cm (root diameter smaller than 0.5 cm there). Below this point, plant could send a high quantity of lateral roots, which row laterally and hit the wall around 70 cm depth.

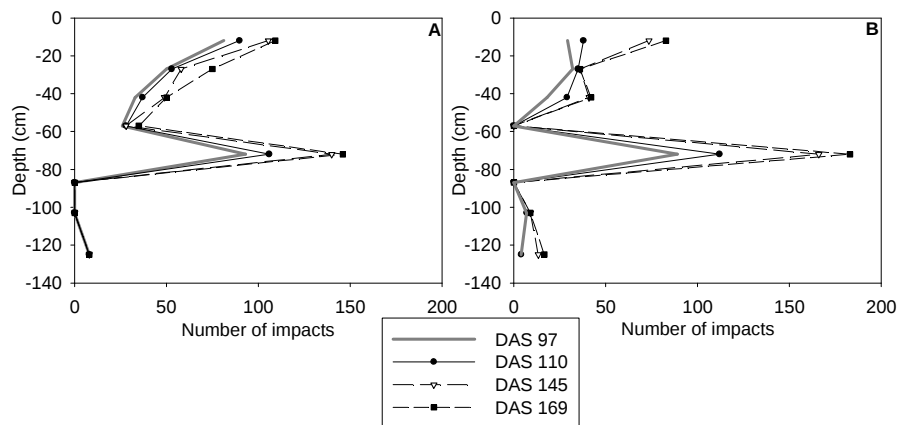


Figure 7: Evolution of the cumulative number of root impacts observed at different times and depths for the irrigated (A) and non-irrigated plants (B).

Slight differences in root growth can be observed between treatments under 87 cm depth. For the non-irrigated column, we observed new

impacts in the two last depths between DAS 110 and the end of the experiment. That means that the non-irrigated plant had to colonize the bottom of the column to find water. Elsewhere, the behavior was quite similar.

Figure 8 represents the evolution of the 1-D normalized root density in the columns. It is observed that with time, both plants invested less into upper lateral roots, where a decrease of the normalized RLD is generally observed with time. On the opposite, there is a raise of normalized root impact density at 72 cm depth. At the end of the experiment, almost 50% of the root impacts were present at this depth for the non-irrigated plant.

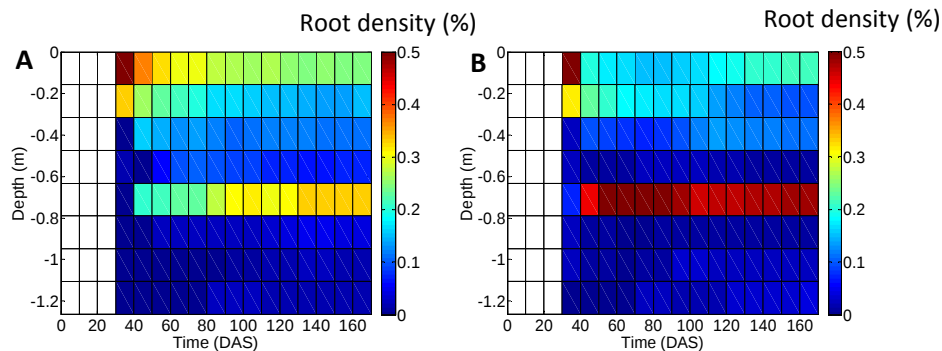


Figure 8: Evolution of the normalized root density profiles in the irrigated (A) and non-irrigated (B) scenarios. Treatment discrimination started 99 Days After Sowing.

At the end of the experiment, the root dry weights were measured for both treatments. For irrigated plant, it gave 139 g while 115 g was obtained for non-irrigated plant. Estimating the water use efficiency (WUE) as the ratio of volume of transpired water per gram root dry weight, we obtain a value for the non-irrigated plant of 178 ml/g and for the non-irrigated one 179 ml/g. As observed by Vandoorne *et al.* (2012; A), expressed on a fresh weight basis, the inulin content was higher in the non-irrigated plant than in the irrigated one, respectively 22.1 and 18.1 g inulin per 100 g root fresh weight. With values of 16.4 for the non-irrigated plant and 13.9 for the irrigated one, it appears that the mean inulin chain length was not affected by the stress and even slightly increased. In terms of inulin production, the Water Use Efficiency was clearly better for the non-irrigated plant. In this case the plant used 220 ml of water to produce 1 g inulin instead of 251 ml in the irrigated case. That means also that the water wasting is smaller in the non-irrigated conditions.

All these observations nicely illustrate the difference between short-term mechanism (stomatal closure) and long-term adaptation mechanisms, related with different carbon allocation in case of stress. As observed by Vandoorne *et al.* (2012; A), under stress conditions, chicory tends to reduce its leaf surface in order to avoid huge water losses and maintain its metabolism (Fig. 6B). The growth decreased but sugar production still occurred. This gives the possibility for the plant to accumulate some sugars which play a role in stress signaling, osmoprotection, quenching of reactive oxygen species and survival until drought stopped. They observed also a decrease in the shoot/root ratio suggesting that, with time, the assimilates are preferably translocated to the roots in case of drought. This was also observed in this experiment where the shoot/root ratio based on fresh weight was 0.19 g/g for the irrigated plant at the end of the growing season and 0.08 g/g for the non-irrigated one. Due to leaf senescence, the transpiration rate of the non-irrigated plant is decreased but never stopped (Fig 6C). Yet, it is observed that instantaneous transpiration is strictly lower for treatment B than for treatment A around DAS 120. At DAS 169, non-irrigated plant transpiration rate represents less than 60% of the irrigated plant.

Impact of irrigation treatments on water dynamics

Figure 9 shows the 3-D water content dynamics obtained from ERT inversion at four different days after the treatment discrimination, for both columns. In order to compare the measurements for a given treatment, it is important to be sure that the sensitivity of the measurements on each voxel was the same at all times. Looking at figure 10, we see that for the irrigated and non-irrigated scenarios independently, the cumulative sensitivity of the measurements stayed constant with time. Those values of sensitivity were only unstable at the bottom of the columns in both situations. That means that it will not be possible to compare the evolution of the water content around this depth for both columns.

Knowing that information about sensitivity, we are now able to compare the behaviors of each column with time.

Looking at figure 9, we observe that the water content profile is generally similar, with an increase of water content with depth. The water content at the surface is low, even for the irrigated plant. Due to different initial leaf area, the impact of watering treatment on the total transpiration of both plants was delayed of a few weeks after the start of the experiment. As total transpiration partially controls the soil water dynamics, discrimination between soil water dynamics is less visible than initially expected.

Circular patterns appear in both columns, at most depths. We also observed in both situations a water content decrease along the column walls at 77 cm and 94 cm depths. At 77 cm, this coincides with the increase of root impacts observed in Fig. 8. The impact at 94 cm depth could be due to vertical water redistribution or to an underestimation of the root impacts at that depth. Regarding the impact of the treatment, we generally observe lower water content in the non-irrigated column, in particular between 32 and 62 cm depth.

Qualitatively, we can observe that ERT give reliable images of the 3-D variability in volumetric water content.

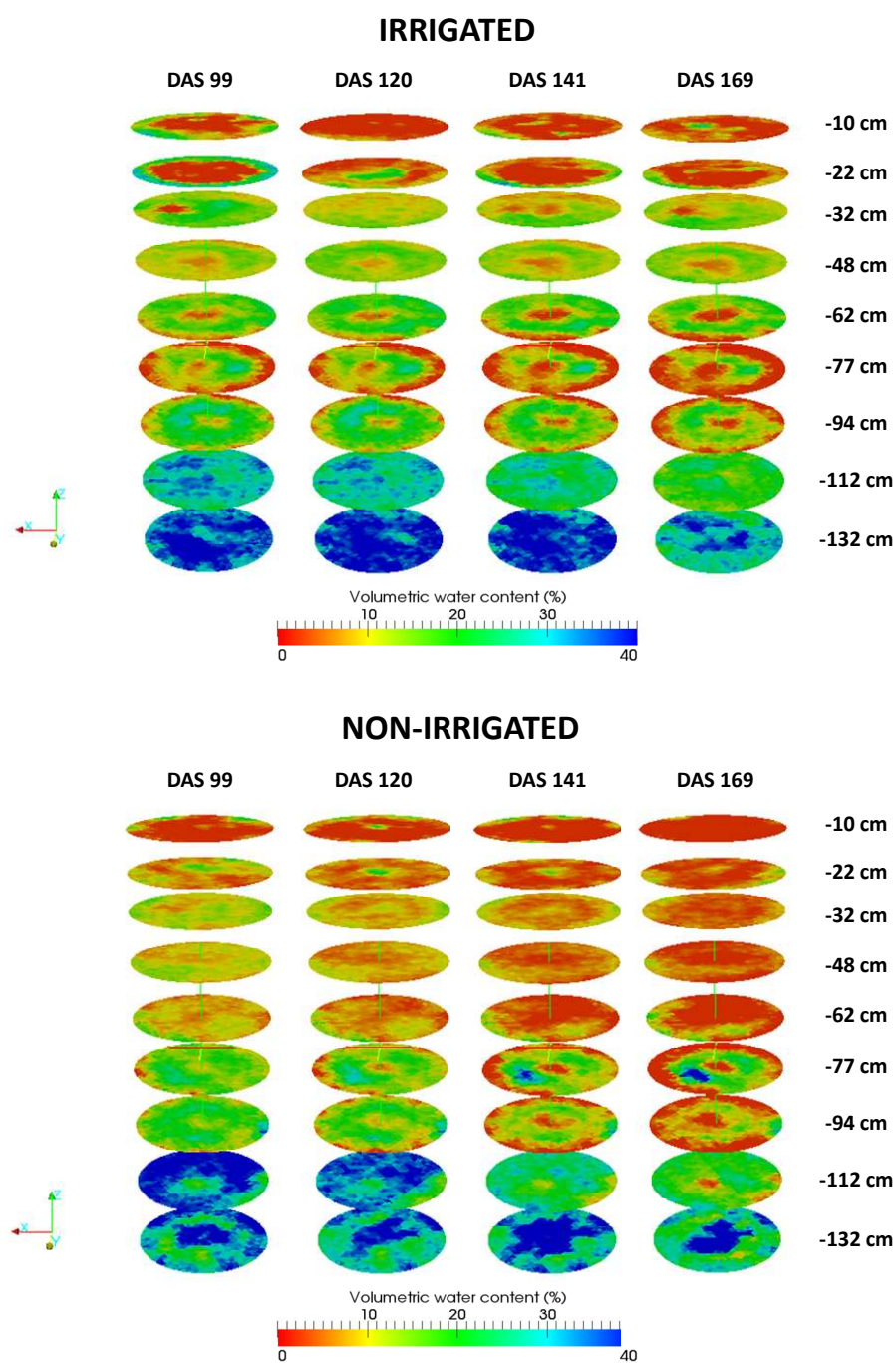


Figure 9: Evolution of the volumetric water content in 3 dimensions at different times and depths for the irrigated and non-irrigated plant.

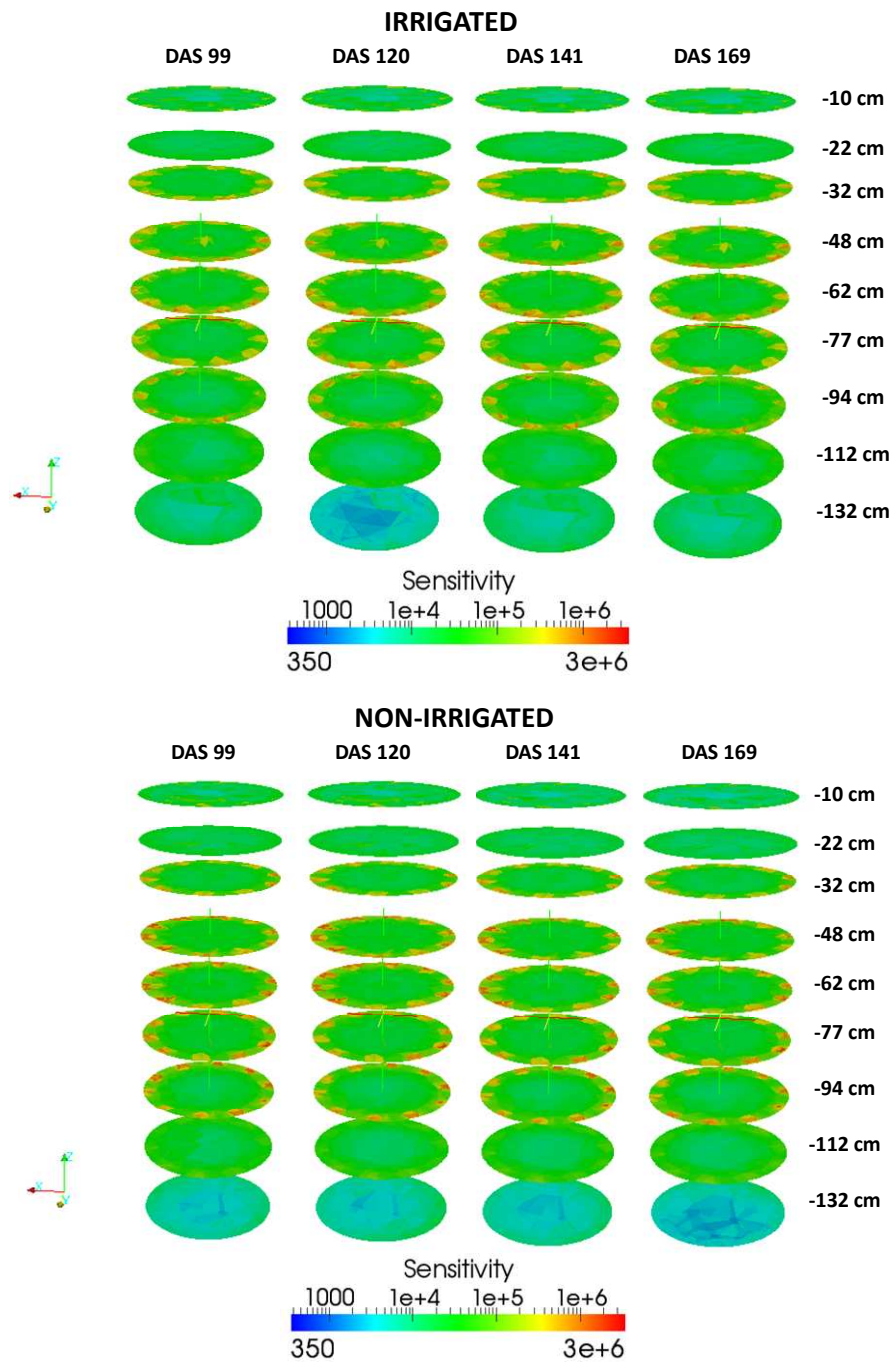


Figure 10: Evolution of the cumulative sensitivity of the measurements in 3 dimensions at different times and depths for the irrigated and non-irrigated plant.

Figure 11 shows the evolution of the horizontally averaged volumetric water content profiles obtained from ERT 3D distributions, for both treatments. It helps to observe the main differences between treatments. While the upper layers above 75 cm depth remain quite stable for the irrigated column, a decrease is observed in the same layer for the non-irrigated one. At DAS 169, water content is around 10% in the 75 first cm depth in the irrigated situation, while decreased to almost 5% in the non-irrigated one.

At the end of the growing period, the difference in water content between treatments under 80 cm depth was really small. At each measured layer, the water content for the non-irrigated plant (Plant B) was 2-3% smaller than for the irrigated one (Plant A).

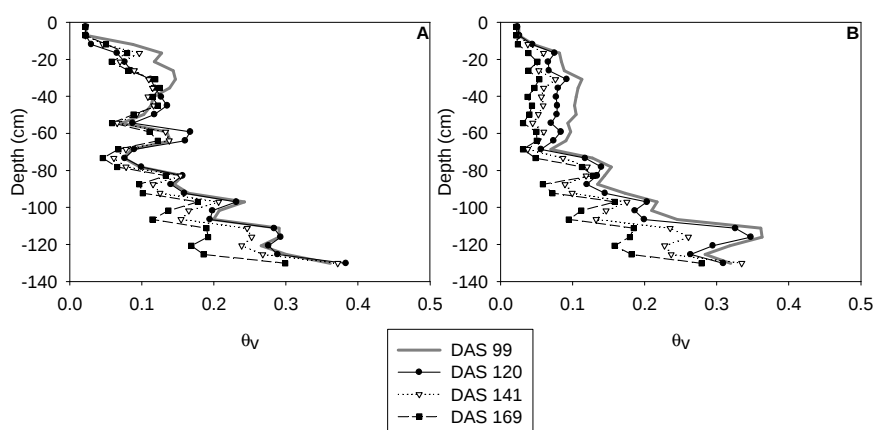


Figure 11: Evolution of the volumetric water content observed at different times and depths for the irrigated (A) and non-irrigated plant (B).

We used the water content profiles at 99 and 169 DAS to calculate the soil water depletion during the growing season (Fig. 12). Higher depletion is observed for non-irrigated treatment between 30 and 80 cm depth and at the bottom of the column. Yet irrigated plant also extracted water from the initial stock, which illustrates that the irrigation was not enough. Interestingly, this mainly occurred at the bottom of the column, with higher amount of water.

Looking at the root impacts observed on the windows at the end of the growing season (Fig. 12), it appears that the biggest part of the water depletion occurred where there are only few lateral roots; at the bottom of the columns. This observation can be explained in two ways. That can mean that water redistribution was an important process in the soil allowing

water uptake from the lateral roots located at 70 cm depth. Another explanation can be that the few lateral roots located at the bottom of the column took a huge quantity of water. This will be clarified just after by the study of the sink term.

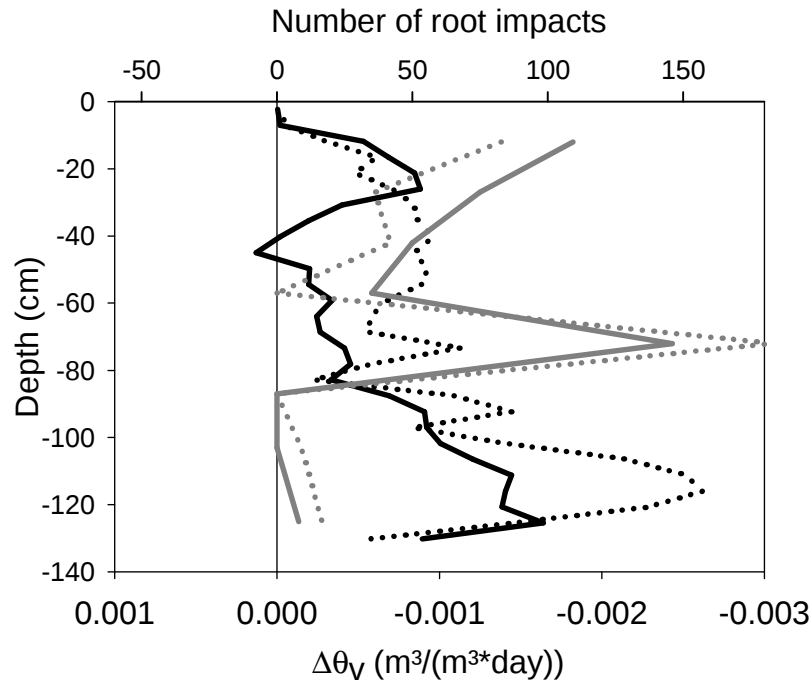


Figure 12: Evolution of the Water Content Depletion (black) observed between 99 and 169 DAS for the irrigated (A; solid line) and the non-irrigated plant (B; dashed line). A negative value corresponds to a decrease in water content. Dark grey graphs represent the number of root impacts observed 169 DAS for the irrigated (A; solid line) and the non-irrigated plant (B; dashed line).

Sink term evolution

Using the water content measurements, the root impacts observations and the Hydrus program, we modeled the 1-D sink profiles for both columns, as done in Vandoorne *et al.* (2012; B). Figure 13 shows an important difference between scenarios. Although two peaks in water uptake can be observed at 12 and 72 cm depth for both cases, the dynamics of the uptake is quite different. While the water uptake rate tends to decrease with time for the non-irrigated scenario, the opposite is observed for the irrigated one. However, for the first period we observe that the irrigated sink profile is much lower, which probably reflects a lower transpiration rate at initial stage of this treatment, as already observed in Fig. 6C.

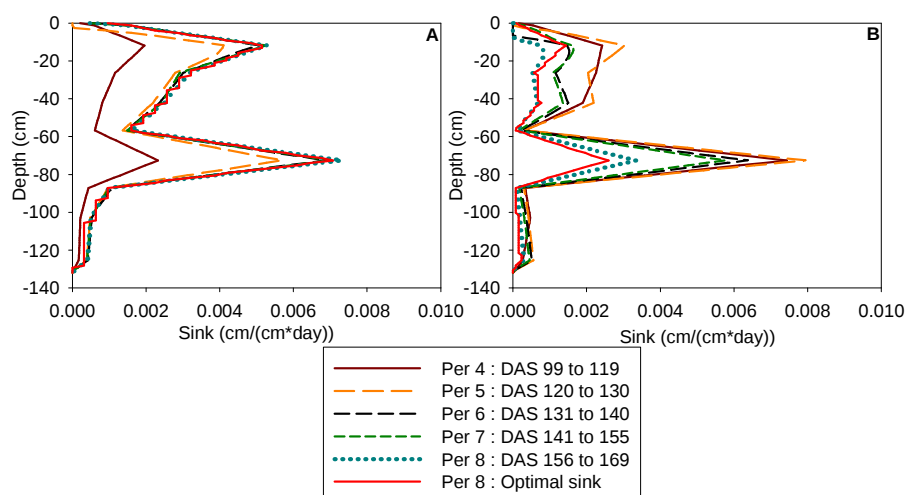


Figure 13: Evolution of the simulated sink for the irrigated (A) and the non-irrigated plant (B).

In term of compensation factor (Eq. 7), we observe a significant decrease in this factor at DAS 131 (compensation factor of 0.61 for the 30 last days of growth). Starting from this time, potential and real sinks started to be different due to the compensation mechanism (see Eq. 5 and 6). The fact that compensation occurred at the end of the growing season for the non-irrigated plant is illustrated in Fig. 13B. In this case, the actual sink is different from the optimal sink corresponding to the root profile distribution (Per 8: optimal sink in Fig 13). Compensation occurs under 60 cm depth where the actual sink is higher than the potential one. This was not the case in the irrigated situation (Fig. 13 A).

This compensation started almost 120 DAS with a weighted stress index of 0.88. This index decreased until period 8 where it took a value of 0.8.

Evolution of the water content and variability with depth and time

Figure 14 shows a detailed evolution of the water content profile for the irrigated (A) and non-irrigated plants (B) together with the evolution of the depth where 25 (green line), 50 (blue line), 75 (magenta line) and 95% (red line) of the water was taken.

It is interesting to observe in this figure that after 35 days of growth, 20% of the water uptake occurred already between 30 and 90 cm depth for the future non-irrigated plant. For the irrigated one, almost all the uptake occurred in the first 50 cm depth at this time. After the treatment started

(DAS 99), we can observe that the first 25% and even 50% of the total uptake occurred closer to the top of the column in the irrigated situation. Nevertheless, looking at the depth where 75% of the uptake occurred, we see that it is almost the same zone for both treatments (respectively 72 and 75 cm depth for the irrigated and non-irrigated plant). That means that in the non-irrigated situation, 25% of the uptake occurred between 68 and 75 cm depth and this almost during the all treatment period. Finally, looking at the percentile 95 (depth where 95% of the total uptake occurred), we see that this appeared around 95 cm depth for the irrigated plant at the end of the growing season while it went to 1.1 m depth in the non-irrigated situation. We can also observe that this percentile overlaps fairly well the zone with 25% of water content. We hypothesize that this corresponds to the inflection point of the retention curve, corresponding to the location where most of the water is extracted for a low change in pressure head. The impact of irrigation is also quite visible in Fig. 14 A. Starting at DAS 110 we see that the depth of percentile 95 goes up with time. In opposite, it goes always down with time in the non-irrigated situation (Fig. 14 B).

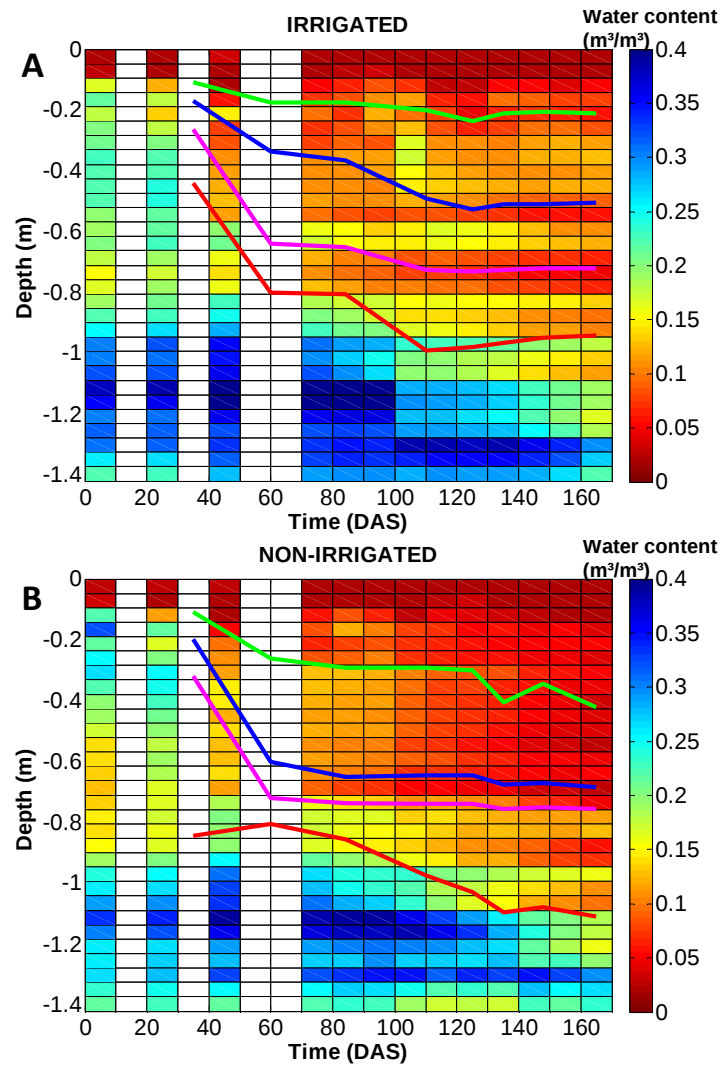


Figure 14: Evolution of the water content profiles in the irrigated (A) and non-irrigated (B) scenarios. Treatment discrimination started 99 Days After Sowing. The green line corresponds to the depth where 25% of the water uptake occurred at different times: percentile 25. The blue line corresponds to percentile 50, the magenta one to percentile 75 and the red one to percentile 95.

Figure 15 shows the evolution of the coefficient of variation for water content at all depths (CV; Fig. 15). In both cases, the CV is high around 20 and 70 cm depth, after treatment started. Rather than being linked to sink term profiles, it seems that this CV is correlated to the absolute water content. This is confirmed by Fig.16, where CV has been plotted in function of the averaged water content per depth.

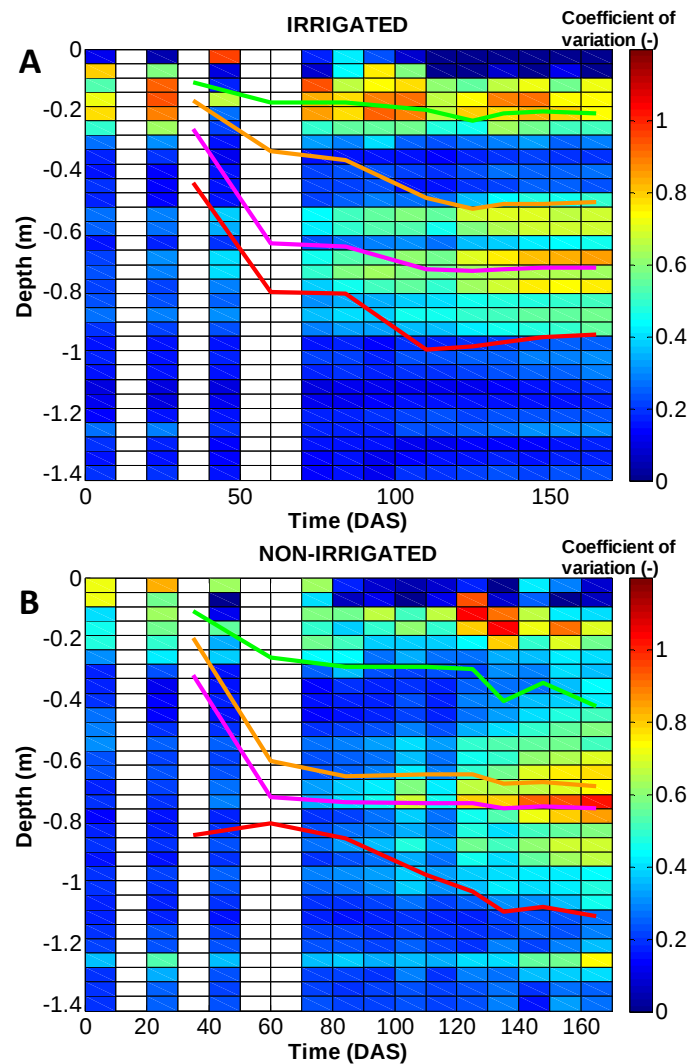


Figure 15: Evolution of the coefficient of variation (CV) of the water content in the irrigated (A) and non-irrigated (B) scenarios. Variability values were obtained using Eq. 7. Treatment discrimination started 99 Days After Sowing. The green line corresponds to the depth where 25% of the water uptake occurred at different times: percentile 25. The orange line corresponds to percentile 50, the magenta one to percentile 75 and the red one to percentile 95.

The horizontal variability in water content is the result of water extraction and soil water redistribution. In drier zones, soil conductivity is so low that soil water redistribution cannot take place anymore. Roots extract water from places where water is still easily available (moderate to high water content). In these regions, soil water conductivity is still high and allows

lateral redistribution (leading to moderate or low CV) and also vertical redistribution. This explains why depletion is observed mainly from the bottom of the soil profile, even for the irrigated plant (see Fig. 12).

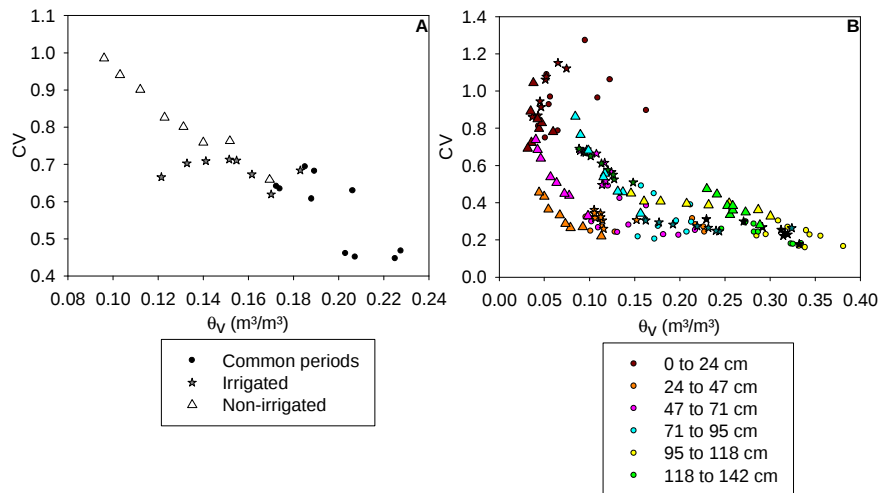


Figure 16: Scatter plots linking the mean volumetric water content and the water content variability (CV) for the irrigated and non-irrigated scenarios. **A:** Mean values for the all column. **B:** Column divided into 6 different layers.

Conclusions

We developed a methodology for assessing soil water dynamics by ERT coupled with mass measurements, and root growth monitoring system. This was applied to monitor 3D water dynamics of two root-chicories subject to different irrigation scenarios.

We demonstrated that ERT was a suitable tool for characterizing water content distribution (RMSE of 2.7%, Fig. 4). It allowed monitor differences between the two treatments. The 3-D water content evolution due to treatments could be used to parametrize 3-D models of root water uptake (e.g. Javaux et al., 2008).

In terms of plant behavior, it is difficult to draw robust conclusions using this experiment. Indeed, we worked only on two plants and the treatments were not drastically different. Nevertheless, at the end of our work, some remarks about physiology can be made.

Due to an initial lower leaf area, the irrigated plant had a lower transpiration rate at the beginning of the experiment, which rendered the

observation of the treatment impact more difficult to observe. Although the irrigation level directly affected the instantaneous transpiration rate, almost 40 days were needed before the treatment affected plant leaf surfaces. Due to the stress, the plant decreased its LAI and modified greatly the sink distribution without affecting the root profile. Despite the drought stress and thanks to this LAI adaptation, the plant was still able to make some gas exchanges and maintain its general physiology (sugar production).

The use of a 1-D Richards modeling approach allowed us to retrieve the 1-D sink profile based on horizontally averaged water content distribution from ERT. It is observed that vertical compensation occurs, mainly at the end of the experiment. At the same time, horizontal compensation (or horizontal soil redistribution) can also be observed thanks to ERT. We showed that uptake is easily laterally compensated by the wet soil at the beginning, but with time, when water content decreases, redistribution stops due to low soil conductivity. This is demonstrated by the correlation of the coefficient of horizontal variation and average of the soil water content. In the meantime, root also has to extract water from other locations where water is more easily available.

Further studies should try to have more replicates to take out the effect of genetic variability on our conclusions.

References

- al Hagrey, S. A. and T. Petersen.** 2011. Numerical and experimental mapping of small root zones using optimized surface and borehole resistivity tomography. *Geophysics* **76**(2): G25-G35.
- Amato, M., G. Bitella, R. Rossi, J.A. Gómez, S. Lovelli and J.J.F. Gomes.** 2009. Multi-electrode 3D resistivity imaging of alfalfa root zone. *European Journal of agronomy* **31**: 213-222.
- Beff, L., T. Günther, B. Vandoorne and M. Javaux.** 2012. Three dimensional monitoring of soil water content in a maize field by Electrical Resistivity Tomography. Submitted.
- Binley, A., G. Cassiani, R. Middleton and P. Winship.** 2002. Vadose zone flow model parameterisation using cross-borehole radar and resistivity imaging. *Journal of Hydrology* **267**(3-4): 147-159.
- Brunet, P., R. Clément and C. Bouvier.** 2010. Monitoring soil water content and deficit using Electrical Resistivity Tomography (ERT) - A case study in the Cevennes area, France. *Journal of Hydrology* **380**(1-2): 146-153.
- Campbell, R.B., Bower, C.A. & L.A. Richards.** 1948. Change of electrical conductivity with temperature and the relation of osmotic pressure to

- electrical conductivity and ion concentration for soil extracts. *Soil Sci. Soc. Proc.* 66–69.
- Garré, S., J. Koestel, T. Günther, M. Javaux, J. Vanderborght and H. Vereecken.** 2010. Comparison of heterogeneous transport processes observed with electrical resistivity tomography in two soils. *Vadose Zone Journal* **9**(2): 336-349.
- Garré, S., M. Javaux, J. Vanderborght, L. Pagès and H. Vereecken.** 2011. Three-dimensional electrical resistivity tomography to monitor root zone water dynamics. *Vadose Zone Journal* **10**(1): 412-424.
- Garrigues, E., C. Doussan and A. Pierret.** 2006. Water uptake by plant roots: I - Formation and propagation of a water extraction front in mature root systems as evidenced by 2D light transmission imaging. *Plant and Soil*, **283**(1-2): 83-98.
- Gunther, T., C. Rucker and K. Spitzer.** 2006. Three-dimensional modelling and inversion of dc resistivity data incorporating topography - II. Inversion. *Geophysical Journal International* **166**(2): 506-517.
- Hupet, F. and M. Vanclooster.** 2002. Intraseasonal dynamics of soil moisture variability within a small agricultural maize cropped field. *Journal of Hydrology* **261**(1-4): 86-101.
- Javaux, M., T. Schroeder, J. Vanderborght and H. Vereecken.** 2008. Use of a three-dimensional detailed modelling approach for predicting root water uptake. *Vadose Zone Journal* **7**:1079–1088.
- Koestel, J., A. Kemna, M. Javaux, A. Binley and H. Vereecken.** 2008. Quantitative imaging of solute transport in an unsaturated and undisturbed soil monolith with 3-D ERT and TDR. *Water Resources Research* **44**(12).
- Koumanov, K. S., J. W. Hopmans and L. W. Schwankl.** 2006. Spatial and temporal distribution of root water uptake of an almond tree under microsprinkler irrigation. *Irrigation Science* **24**(4): 267-278.
- LaBrecque, D. J., M. Miletto, W. Daily, A. Ramirez and E. Owen.** 1996. The effects of noise on Occam's inversion of resistivity tomography data. *Geophysics* **61**(2): 538-548.
- Laloy, E., M. Javaux, M. Vanclooster, C. Roisin and C. L. Biielders.** 2011. Electrical resistivity in a loamy soil: identification of the appropriate pedo-electrical model. *Vadose Zone Journal* **10**(3): 1023 - 1033.
- Linde, N., Binley, A., Tryggvason, A., Pedersen, L.B. and A. Revil.** 2006. Improved hydrogeophysical characterization using joint inversion of crosshole electrical resistance and ground penetrating radar traveltime data. *Water Resources Research* **42**, W 12404.
- Minet, J.** 2011. High-resolution soil moisture mapping by a proximal ground penetrating radar: A numerical, laboratory and field evaluation. Faculté

- d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale. Louvain-la-Neuve (Belgium), Université catholique de Louvain: 195.
- Monti, A., M.T. Amaducci, G. Pritoni and G. Venturi.** 2005. Growth, fructan yield, and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) as related to photosynthetic capacity, harvest time and water regime. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1389-1395.
- Oberdörster, C., J. Vanderborght, A. Kemna and H. Vereecken.** 2010. Investigating preferential flow processes in a forest soil using time domain reflectometry and electrical resistivity tomography. *Vadose Zone Journal* **9**(2): 350-361.
- Pierret, A., Doussan, C. and L. Pagès.** 2006. Spatio-temporal variations in axial conductance of primary and first-order lateral roots of a maize crop as predicted by a model of the hydraulic architecture of root systems. *Plant and Soil* **282**(1-2): 117-126.
- Pride, S.** 1994. Governing equations for the coupled electromagnetics and acoustics of porous media. *Physical Review B* **50**(21): 15678-15696.
- Robinson, D. A., S. B. Jones, J. M. Wraith, D. Or and S. P. Friedman.** 2003. A review of advances in dielectric and electrical conductivity measurement in soils using time domain reflectometry. *Vadose Zone Journal* **2**(4): 444 - 475.
- Schwartz, B. F., M. E. Schreiber and T. Yan.** 2008. Quantifying field-scale soil moisture using electrical resistivity imaging. *Journal of Hydrology* **362**(3-4): 234-246.
- Sharp, R. E. and W. J. Davies.** 1985. Root growth and water uptake by maize plants in drying soil. *Journal of Experimental Botany* **36**(9): 1441-1456.
- Slater, L., A. M. Binley, W. Daily and R. Johnson.** 2000. Cross-hole electrical imaging of a controlled saline tracer injection. *Journal of Applied Geophysics* **44**(2-3): 85-102.
- Slater, L., A. Binley, R. Versteeg, G. Cassiani, R. Birken and S. Sandberg.** 2002. A 3D ERT study of solute transport in a large experimental tank. *Journal of Applied Geophysics* **49**(4): 211-229.
- Vanderborght, J., A. Kemna, H. Hardelauf and H. Vereecken.** 2005. Potential of electrical resistivity tomography to infer aquifer transport characteristics from tracer studies: A synthetic case study. *Water Resources Research* **41**(6).
- Vandoorne, B., A.S. Mathieu, W. Van den Ende, R. Vergauwen, C. Périlleux, M. Javaux & S. Lutts.** 2011. Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. *sativum*) independently of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* (In press). **A**

- Vandoorne B., L. Beff, S. Lutts & M. Javaux.** 2012. Combining modeling and measurements to characterize water uptake dynamics of *Cichorium intybus* var. *sativum* under water-stress conditions. *Vadose Zone Journal*. Submitted. **B**
- Walker, J. P., G. R. Willgoose and J. D. Kalma.** 2004. In situ measurement of soil moisture: a comparison of techniques. *Journal of Hydrology* **293**(1-4): 85-99.
- Werban, U., S. A. Al Hagrey and W. Rabbel.** 2008. Monitoring of root-zone water content in the laboratory by 2D geoelectrical tomography. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **171**(6): 927-935.
- Wilson, R.G., J.A. Smith and C.D. Yonts.** 2004. Chicory root yield and carbohydrate composition is influenced by cultivar selection, planting and harvest date. *Crop Science* **44**: 748-752.
- Zenone, T., G. Morelli, M. Teobaldelli, F. Fischanger, M. Matteucci, M. Sordini, A. Armani, C. Ferre, T. Chiti and G. Seufert.** 2008. Preliminary use of ground-penetrating radar and electrical resistivity tomography to study tree roots in pine forests and poplar plantations. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Collingwood, Australia.

Inter-chapitres 3 - 4

Alors que les trois premiers chapitres de cette thèse se sont intéressés de près à la question des impacts du manque d'eau sur la physiologie et le comportement racinaire de la chicorée à inuline, le quatrième chapitre ci-après s'intéressera quant à lui aux impacts physiologiques de l'excès d'eau sur la plante et son rendement.

L'idée d'étudier ce stress tout à fait antagoniste à ce qui a été fait précédemment nous est venue à la lecture des différents scénarios probables d'évolution du climat de nos régions suite au réchauffement climatique (IPCC, 2007). Il apparaît en effet qu'outre la plus grande récurrence et l'intensification des vagues de sécheresse et de chaleur en été, nous pourrions également subir des phénomènes extrêmes de manière plus fréquente. Par phénomènes extrêmes, les auteurs songeaient notamment aux orages estivaux potentiellement violents et accompagnés de grandes quantités d'eau. L'arrivée soudaine de ces grandes quantités d'eau sur des terrains lourds et mal aérés ou encore dans des dépressions pourrait entraîner un engorgement temporaire du sol et un phénomène d'hypoxie.

Le but du chapitre suivant est donc de comprendre quelles seront les conséquences pour la culture de chicorées de ces orages estivaux violents, accompagnés d'hypoxies temporaires. La question est de savoir comment le rendement et la croissance sont affectés et si la plante est tolérante ou non à ce stress abiotique. Une conclusion très pratique pourrait être, si besoin, de conseiller aux agriculteurs d'éviter de planter des chicorées sur des sols à engorgement régulier.

Chapitre 4

Long term intermittent flooding stress affects plant growth and inulin synthesis of *Cichoryum intybus* (var. *sativum*)

Annals of Botany, submitted.

B. Vandoorne^{1,3}, C. Descamps¹, A.S. Mathieu¹, W. Van den Ende², R. Vergauwen², M. Javaux^{3,4} and S. Lutts¹

1. Groupe de Recherche en Physiologie Végétale (GRPV), Earth and Life Institute – Agronomy (ELI-A), Université catholique de Louvain, 5 (Bte L.7.07.13) Place Croix du Sud, 1348 Louvain-la-Neuve ; Belgium
2. Laboratory of Molecular Plant Physiology, Institute of Botany and Microbiology, Katholieke Universiteit Leuven, 31 Kasteelpark Arenberg, 3001 Leuven-Heverlee ; Belgium
3. Earth and Life Institute, Université catholique de Louvain, 2 (Bte 2) Place Croix du Sud, 1348 Louvain-la-Neuve ; Belgium
4. Agrosphere (IBG-3), Institut für Bio- und Geowissenschaften - Forschungszentrum Juelich GmbH, Juelich ; Germany

- **Background and Aims:** Flooding stress is known to affect root growth and sugar metabolism in plants, but data are crucially missing for *Cichorium intybus* which stores inulin in its tap root. The aim of the present study was to quantify the impact of recurrent episodes of flooding stress on plant growth, water status, photosynthesis and sugar metabolism in relation to inulin synthesis and accumulation in roots of this species.

- **Methods:** Plants were cultured for 25 weeks under controlled environmental conditions on a sand substrate in columns saturated with nutrient solution for periods of 20 days (starting on week 12) alternating with 7 days non-flooding periods. Plant growth, water status, photosynthesis-related parameters and sugar concentration and metabolism were monitored at regular intervals up to the end of the treatment.

- **Key Results:** Flooding increased the number of leaves but reduced net photosynthesis in relation to stomatal closure and decrease in PSII efficiency. The roots of flooded plants are shorter and larger than those of controls but fresh and dry weight were similar in the two situations. Reducing sugars and organic acids accumulated in the leaves while glucose, fructose, sucrose and 1-kestotriose accumulated in the roots. Sucrose synthase (EC 2.4.1.13) and invertase (EC 3.2.1.26) activities increased in both organs while sucrose-phosphate-synthase activity (EC 2.4.1.14)

remained unaffected by flooding. Inulin synthesis was delayed in flooded roots and its mean degree of polymerization (DP) was reduced as a consequence of fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) inhibition.

- **Conclusions:** *Cichorium intybus* is able to cope with intermittent episodes of flooding and modify organ shape without any effect on final weight. Quantity of inulin produced per plant remained unaffected but the quality of inulin (mean DP) decreased as a consequence of flooding.

Key words: *Cichorium intybus*, flooding, fructans, hypoxia, inulin, photosynthesis, chicory, soluble sugars, tap root, waterlogging.

Introduction

Waterlogging is one of the most important environmental constraints compromising yields of numerous agricultural crops. According to Setter and Waters (2003), it affects more than 10% of the global land area and the yield penalty resulting from such a water excess in the root environment may be higher than 40% in poorly adapted plants (Setter *et al.*, 2009; Irfan *et al.*, 2010; Shabala, 2011). Numerous studies are devoted to the specific adaptation displayed by rice in response to flooding stress since *Oryza sativa* is the only cultivated plant having a semi-aquatic origin (Colmer, 2003; Jackson *et al.*, 2009). Data are also available in the literature for maize (Subbaiah and Sachs, 2003), soybean (Van Toai *et al.*, 2012; Yanagawa and Konatsu, 2012) and various species belonging to the genus *Trifolium* (Aschi-Smiti *et al.*, 2003; Huber *et al.*, 2009). Surprisingly, only very few data are available on the impact of flooding stress on plant species storing sugars in a tap root system, such as sugar beet or root chicory. The latter species (*Cichorium intybus* var *sativum*) is a biannual crop mainly cultivated in Western Europe for industrial production of inulin as a food additive and prebiotic compound with disease preventing properties (Roberfroid and Delzenne, 1998; Stoyanova *et al.*, 2011; Van den Ende *et al.*, 2011). Inulin synthesis is initiated by sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99) catalyzing the transfer of a fructose moiety between two sucrose molecules to produce the trisaccharide 1-kestotriose and glucose. Fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100) transfers fructosyl moieties from and to 1-kestotriose or larger fructans, resulting in the formation of oligofructose and inulin with higher degree of polymerization (DP). Conversely, inulin degradation implies a sequential removal of fructose unit catalyzed by fructan 1-exohydrolases (1-FEHs; EC 3.2.1.153) (Van Laere and Van den Ende, 2002). The mean DP of the inulin chain is an important component of chicory production, higher

DP being more suitable for particular industrial applications (Wilson *et al.*, 2004).

Several studies considered the impact of drought on plant physiology and yield (Schittenhelm, 1999; De Roover *et al.*, 2000; Monti *et al.*, 2005; Vandoorne *et al.*, 2012) but, to the best of our knowledge, no studies were performed on the impact of water excess on this species. Nevertheless, in its main culture area (North of France and Belgium), the species is frequently exposed to recurrent episodes of flooding stress in field conditions.

Flooding stress induces oxygen deprivation in the root environment, leading to hypoxia or even anoxia, which is responsible for a physiological shift to an alcoholic fermentation (Boamfa *et al.*, 2003). Flooding may have important impacts on enzyme activities involved in sugar metabolism, as demonstrated for α -amylase (EC 3.2.1.1; Loreti *et al.*, 2003), sucrose synthase (EC 2.4.1.13) (Subbaiah and Sachs, 2003) and fructokinase (EC 2.7.1.4; Singla *et al.*, 2004). As a consequence, the carbohydrate content of plants exposed to flooding stress is frequently drastically modified from both quantitative and qualitative points of view (Peña-Fronteras *et al.*, 2009; Ooume *et al.*, 2009). However, no data are available concerning the putative impact of flooding on the activities of enzymes specifically involved in inulin metabolism.

Flooding was shown to drastically influence root growth and shape in numerous species. According to van Dongen *et al.* (2009), a decreased root extension growth could ultimately save ATP and reduce oxygen consumption. Although some adapted wetland species may differentiate aerenchyma (as well known in rice (Colmer, 2003)) or hyponasty (*Rumex palustris*, as described by Voesenek *et al.* (2003)), classical terrestrial plants frequently suffer from root tip death (Gladish *et al.*, 2006) or reduced cell extension (Kong *et al.*, 2010). Most studies, however, consider a permanent flooding stress while in field conditions, plants are often exposed to intermittent episodes of flooding alternating with periods of stress relief. The specific case of *Cichorium intybus*, where the tap root development involves an enlargement phase occurring after an elongation phase has never been considered so far.

Plants exposed to water excess and oxygen deprivation paradoxically frequently suffer from physiological drought and from oxidative stress occurring within the leaves. A decrease in the root hydraulic conductance may result from a disruption of aquaporin functioning as a result of cytosol acidification (Tournaire-Roux *et al.*, 2003) and may trigger water deficit leading to partial stomatal closure (Else *et al.*, 2009). The resulting decrease in gas exchange may then compromise sugar synthesis, although a direct

impact of flooding on quantum yield efficiency of PSII has also been reported (Ahmed *et al.*, 2006). The ultimate consequence of those physiological perturbations on inulin production and storage by *C. intybus* remains unknown. Moreover, in response to flooding, soil Fe^{3+} is commonly reduced to available Fe^{2+} and generation of reactive oxygen species (ROS) is a consequence of iron-catalysed Fenton reaction, or results from stimulated activities of lipoxygenases, NADPH oxidase or xanthine oxidase (Blokhina *et al.*, 2003). The ability of chicory to cope with this secondary oxidative stress is an important component of plant adaptation to flooding stress and needs to be quantified.

The aim of the present study was to quantify the impact of recurrent episodes of flooding stress on plant growth, water status, photosynthesis and sugar metabolism in relation to inulin synthesis and accumulation in roots of *C. intybus*.

Material and Methods

Plant material and growth culture

Seeds of *Cichorium intybus* var. *sativum* (purified line issued from cultivar Crescendo kindly provided by Chicoline – Warcoing) were sown in columns of 55 cm long and 25 cm of diameter according to the experiment device illustrated in Fig 1A. The 40 columns were filled with dry yellow sand and 0.5 dm³ of loam (loam for professionals; DCM N.V., Grobbendonk, Belgium) were added at the top. In columns used for flooding treatment, 5 cm of gravels were added at the bottom in order to avoid sand leaching. The columns were randomly distributed in a phytotron where the mean temperature during the growing season was set to 23 °C during the 16 hours day and to 20 °C during the 8 hours night. The mean relative humidity in the air was 70 % and the light intensity was 190 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (6 Philipps HPI-T; 400 W) at the top of the canopy for 16 h. Four days after germination, only one plant was maintained in each column. Plants were provided with modified Hoagland nutrient solution at pH 5.4 and electrical conductivity of 963 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ containing the following nutrients concentrations 250 μM NH_4NO_3 , 890 μM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2.4\text{H}_2\text{O}$, 990 μM KNO_3 , 515 μM KH_2PO_4 , 244 μM $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$, 0.415 μM $\text{MnSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, 6.45 μM H_3BO_3 , 0.161 μM $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$, 0.0125 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$, 0.697 μM $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ and 10.12 μM Fe-EDDHA (Vandoorne *et al.*, 2012).

During the experiment, 5 harvests were performed 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing (Fig. 1B). At each harvest, 5 plants per treatment were collected. The flooding stress started 12 weeks after sowing, just after the

second harvest. At this time, the 30 remaining plants were distributed in two groups: control and flooding stressed plants. Solution was afforded to control plants by the top of the columns in order to keep volumetric water content (θ_v) close to field capacity ($\theta_v = 15\%$) throughout the treatment period. For plants suffering from flooding, solution was brought from the bottom of the column so that solution level reached the same level as the supplying tank leading to complete flooding of the substrate in the column (Fig. 1A).

Each flooding period lasted 20 days, as detailed in the schedule presented in Fig. 1B. After those 20 days of stress, the water table was removed for 7 days in order to mimic the most frequent field conditions where the waterlogging disappears for some days before a new flooding episode occurs. In total, stressed plants suffered from 4 flooding periods. All harvests, except at 7 and 12 weeks after sowing, were performed during a flooding period. For physiological parameters, only measurements at week 15 were performed during a released time (Fig. 1B).

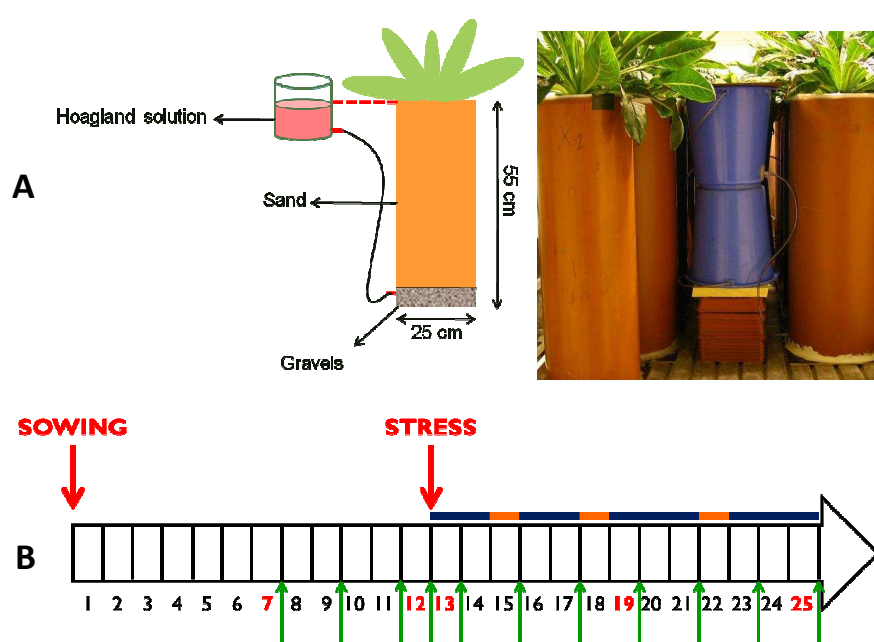


Figure 1: A. Scheme and picture of the flooding experimental system as described in Material and Methods. B. Planning of the 25 weeks of the experiment. Flooding started 12 weeks after sowing. The blue bars represent the duration of flooding and the orange bars the weeks without flooding after stress relief. The week numbers in red are the weeks when plants were harvested. The green arrows are the weeks when the non-destructive physiological measurements were performed.

The total leaf area was measured at each harvest using Leaf Area Meter AM300 (ADC Bioscientific). The mean plastochron index was calculated by dividing the number of days between two measurements by the number of appearing leaves between measurements.

Plant water status

Water contents were measured on leaf and root: samples were weighed and dried in an oven for 72 h at 70 °C. The water content (WC) was determined for both organs as:

$$WC = [(FW - DW)/FW]*100$$

The leaf water potential (Ψ_w) was measured at each harvest on the fifth and sixth unfolded leaves using a Scholander pressure chamber, considering the youngest unfolded leaf of the rosette as n°1. Osmotic potential (Ψ_s) was measured on a portion of the second fully unfolded leaf with a Vapour Pressure Osmometer 5520 (Wescor; Logan, USA) and adjusted to the water content of control plants according to Lefevre *et al.* (2009).

The pressure potential (Ψ_p) was calculated using the formula:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$$

The stomatal conductance (g_s) was measured using an AP4 system (Delta-T Devices; Cambridge, UK) on the first unfolded leaf and four other randomly-chosen leaves halfway the photoperiod.

Photosynthesis-related parameters

Chlorophyll fluorescence-related parameters were measured by the Fluorescence Monitoring System II (Hansatech Instruments; Norfolk, England) on the second and third unfolded leaves after dark-adaption for 30 min. A first saturating pulse ($18,000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) was sent to the leaf. A constant intensity of actinic light ($600 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) was thereafter sent for three minutes on the leaf and a second saturating pulse of $18,000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ was subsequently applied. PS II efficiency (Φ_{PSII}), non-photochemical-quenching (NPQ) and photochemical quenching (q_p) were estimated according to Maxwell and Johnson (2000).

Chlorophyll (Chla and Chlb) and total carotenoid (xanthophylls + β -carotene) concentrations were quantified on fresh matter collected on the second and third unfolded leaves in the rosette. Samples (*c.a.* 150 mg FW) were

ground in the dark in 8 ml acetone 80 % and centrifuged at 1,000 *g* for 10 minutes at 4 °C. The absorbance of the sample was read at three different wavelengths (663.2, 646.8 and 470 nm) using a spectrophotometer (Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu; Kyoto, Japan). Each measurement was repeated three times. The pigments concentrations were calculated according to Lichtenthaler (1987).

Gas exchanges were recorded with an InfraRed Gaz Analyser (IRGA, LCA4 8.7 ADC; Hertshire, UK) using a PLC Parkinson leaf cuvette on intact leaves for 1 min (20 records min⁻¹), with an air flow of 300 ml.min⁻¹. Air taken in the phytotron was sent in a chamber in which a leaf portion of 6.25 cm² was introduced. Net CO₂ assimilation rate (*A*) and instantaneous transpiration rate (*E*) were estimated on the second and third fully unfolded leaves. Five plants were measured in each treatment.

For Rubisco determination (EC 4.1.1.39) fresh matter was collected on third, fourth and fifth unfolded leaves, quickly frozen in liquid nitrogen and homogenized in 4 ml of extraction buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.8 containing 0.4 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0.1% (v/v) Triton X-100, 12.5% (w/v) glycerol, 15 mM mercaptoethanol and 30 mg PVPP). The extract was centrifuged for 30 s at 10,000 *g* and 4 °C. In order to measure the initial activity, 30 µl of this extract was rapidly added to 970 µl of a reaction buffer consisting of 50 mM HEPES-KOH, pH 8.0, 20 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 2.5 mM ATP, 5 mM phosphocreatine, 0.2 mM NADH, 0.6 mM RuBP, 10 mM NaHCO₃, 6 U.ml⁻¹ phosphoglycerate kinase (PGK; Sigma), 6 U.ml⁻¹ glycerate 3-P dehydrogenase (GAPDH; Sigma) and 20 U.ml⁻¹ phosphocreatine kinase (PCK; Sigma Aldrich; St-Louis, USA). The oxidation of NADH was followed during 3 min at 25 °C by measuring the difference between the absorbance at 340 nm and the absorbance at 400 nm. The total activity was quantified according to the same procedure after an activation period of 10 min in MgCl₂ 20 mM and NaHCO₃ 10 mM. The activation ratio was calculated by dividing the initial by the total activities according to Du *et al.* (1996). Two replicates were made for each sample.

Malondialdehyde concentration

The level of lipid peroxidation was measured as 2-thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS), mainly malondialdehyde (MDA), following the modified method of Heath and Packer (1968). Portions of leaves and roots (*c.a.* 250 mg FW) were ground in liquid nitrogen with 5 ml of a solution of TCA 5% and glycerol 1.25%. The homogenate was centrifuged at 4 °C, 6,700 *g* for 10 min and then filtered on Whatman paper N°1 filter paper. Two ml

of the supernatant were then mixed with 2 ml TBA 0.67%. The samples were incubated at 100 °C for 30 min and then immediately transferred on ice for 5 min and centrifuged at 4 °C, 6700 *g* for 1 min. The supernatant absorbance was read at 532 nm and values corresponding to non-specific absorption (600 nm) were subtracted. Malondialdehyde concentration was calculated using its molar extinction coefficient ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Sugar concentration

Portions of the third, fourth and fifth unfolded leaves (*c.a.* 300 mg FW) were ground in liquid nitrogen, mixed with 7 ml ethanol 70 % (w/v) for 5 min on ice and centrifuged for 10 min at 6,700 *g*, 4 °C; 200 μl of the supernatant reacted with 1 ml anthrone solution (0.5 g anthrone + 250 ml H_2SO_4 95% + 12.5 ml distilled water) and the absorbance was read at 625 nm (Spectrophotometer UV-1800, Shimadzu; Kyoto, Japan) for total soluble sugar quantification according to Yemm and Willis (1954). A calibration curve was established using glucose as standard.

The remaining supernatants were dried in a thermomixer using nitrogen (45 min at 50 °C). Sugars and organic acids were derivatized using 200 μl of an oxylation solution (hydroxylamine chlorhydrate dissolved in a pyridine solution): 100 μl of hexamethyldisilazane (HMDS) and 10 μl of trifluoroacetic acid (TFA) were added to the samples. Organic acids, mono-, di- and trisaccharide concentrations were specifically determined by gas chromatography (Perkin Elmer, Autosystem XL, MN Optima – 5 – Accent – 30 m x 0.32 mm i.d. x 0.25 μm ; Waltham, USA) using helium as a carrier gas at a flow rate of 1 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. The injector and FID detector temperatures were 270 °C and 310 °C respectively. Oven temperature was held at 120 °C for 3 minutes and then programmed to 230 °C at 3°C.min⁻¹. It was kept at this temperature for 12 min, then re-programmed to 300 °C at 20 °C.min⁻¹ and held for 15 minutes.

In order to extract sugars and enzymes from the roots, 30 g of root material was ground in 30 ml 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 containing 100 mM KCl, 30 mM MgCl_2 , 10 mM NaHSO_3 , 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride, 1 mM mercaptoethanol and 0.1 % Polyclar® (Serva, Heideberg, Germany). Two ml were incubated at 90 °C for 15 min. After cooling at room temperature, the extract was centrifuged at 3,000 *g* for 5 min and 700 μl of the supernatant were purified on a column with two ion exchange resins (1ml Dowex® - 50 H^+ and 1 ml Dowex® -1-acetate). Finally, 25 μl of the neutralized fraction was analysed by HPAEC-PAD (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) in order to determine the sugar content

after separation on a CarboPac® PA1 anion exchange column and detection by a pulsed amperometric detector equipped with a gold electrode (potentials: E₁: + 0.05 V; E₂: +0.6 V; E₃: -0.8 V). The flow rate was 1 ml.min⁻¹. The elution conditions were 90 mM NaOH over a 60 min period. The column was regenerated with 1 M NaOH for 10 min and equilibrated for 20 min after each run. Quantification was performed on the peak areas with the external standards methods for glucose, fructose, sucrose, 1-kestotriose and 1,1-nystose (Van den Ende *et al.*, 1996). In parallel, 25 µl of the neutralized fraction was mixed with 6 N HCl in order to completely depolymerise all the inulin in its single components (glucose and fructose). The extract was analyzed using the same HPAEC-PAD technique. The mean degree of polymerization (DP) is calculated according to a formula adapted from Baert (1997):

$$DP_{mean} = \frac{F_{hydrol} - F_{free} - S_{free}}{G_{hydrol} - G_{free} - S_{free}} + 1$$

Where F_{hydrol} and G_{hydrol} are the concentrations in fructose (F) and glucose (G) after the hydrolysis with HCl and F_{free} and G_{free} and S_{free} are the concentrations of free fructose (F), glucose (G) and sucrose (S), The percentage of inulin in the root was estimated using a formula adapted from Baert (1997)

$$Percentage_{inul} = \frac{(F_{hydrol} - F_{free} - S_{free} + G_{hydrol} - G_{free} - S_{free}) * (180 - \frac{18 * (DP_{mean} - 1)}{DP_{mean}})}{10000 * (1 - WC)}$$

considering that each addition of one fructose unit to the inulin chain induces the loss of one molecule of water (18 g.mole⁻¹).

Sugar metabolizing enzymes

Root sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST, EC 2.4.1.99), fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT, EC 2.4.1.100), and fructan 1-exohydrolase (1-FEH, EC 3.2.1.153) activities were determined according to Van den Ende *et al.* (1996). Five ml of the extraction buffer containing the extract were centrifuged for 2 min at 10,000 g and two aliquots (2 ml each) were mixed with 4 ml of saturated ammonium sulfate. After 30 min at 0 °C, the pellet was centrifuged at 40,000 g for 15 min and washed with ammonium sulfate 80 % (w/v). It was centrifuged again under the same conditions and resuspended in 500 µl Na-acetate buffer, 50 mM, pH 5.0 and

then centrifuged for 2 minutes at 10,000 *g*. The enzymes 1-SST and 1-FEH were incubated with their substrate at 30 °C (100 mM sucrose for 1-SST and 1 % inulin for 1-FEH) for 0, 20, 40 and 60 min for 1-SST and for 0, 40, 80, 120 min for 1-FEH. The 1-FFT enzyme was incubated with 10 mM 1-kestotriose on ice for 0, 20, 40 and 60 min. The reactions were stopped by incubating the samples at 95 °C for 5 min. The enzyme activities were determined by product quantification (1-kestotriose for 1-SST, 1,1-kestotetraose for 1-FFT and fructose for 1-FEH) with HPAEC-PAD (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Sucrose Phosphate Synthase (SPS; EC 2.4.1.14), Sucrose Synthase (SuSy; EC 2.4.1.13), and invertases (acid and neutral – EC 3.2.1.26) activities were determined in leaves and roots. For this purpose, 700 mg of material were combined with 3.5 ml of extraction buffer (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5 containing 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM NaHSO₃, 2 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulphonylfluoride, 1 mM mercaptoethanol and 0.1 % Polyclar® ;Serva, Heideberg, Germany) for leaves, and 5 g of material were combined with 5 ml of extraction buffer for roots.

The extract was then centrifuged for 5 min at 10,000 *g* and 4 °C. Two aliquots (1.5 ml each) were mixed with 6 ml of saturated ammonium sulfate. After 30 minutes at 0 °C, the pellet was centrifuged at 40,000 *g* for 15 min, washed with 80 % (w/v) ammonium sulfate and centrifuged as before. The obtained pellet was then resuspended in 3 ml 50 mM HEPES-KOH buffer, pH 7.5, also containing 100 mM KCl, 20 mM MgCl₂ and 2 mM EDTA.

For the SPS activity, 150 µl of the extracts were incubated in 7.5 mM UDPGlc, 7.5 mM, Fructose-6-P and 37.5 mM Glucose-6-P (an activator of SPS; Huber *et al.*, 1991) in a buffer containing 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 5 mM MgCl₂ and 1 mM EDTA in a total volume of 300 µl. Samples were incubated for 30 min at 25 °C and the reaction was stopped by adding 300 µl of 30 % (w/v) KOH. After 10 min in a boiling water bath and cooling on ice, sucrose production was measured by the anthrone method (Yemm and Willis, 1954). For the SuSy activity, 150 µl of extracts were combined with 750 µl buffer (100 mM MES, pH 6.0 also containing 200 mM sucrose) and 100 µl of 100 mM UDP. Incubation was performed for 20 min at 25 °C and the reaction was stopped by adding 1 ml of a 3:5-dinitrosalicylic acid (DNSA) solution (45 mM DNSA, 10 % NaOH, 1 M potassium sodium tartrate). Samples were incubated in a boiling water bath for 5 min and the obtained quantity of reducing sugars was quantified spectrophotochémically (UV-1800, Shimadzu; Kyoto, Japan) by measuring the absorbance at 525 nm. Finally, for the invertases activities, 150 µl of the extracts were incubated in 850 µl buffer (200 mM Na-acetate, pH 4.5 and 100 mM sucrose for acid

invertases and 200 mM Na-phosphate, pH 7.5 and 100 mM sucrose for neutral invertases). The reaction mixtures were then incubated for 30 min at 30 °C and the reaction was stopped by adding 1 ml of DNSA solution (45 mM DNSA, 10 % NaOH, 1 M potassium sodium tartrate). Samples were incubated in a boiling water bath for 5 min and the amount of reducing sugars was estimated spectrophotometrically (UV-1800, Shimadzu; Kyoto, Japan) by measuring the absorbance at 525 nm.

Protein concentration in the extract was estimated according to Bradford (1976) using bovin serum albumin as standard.

Statistical treatment of the data

The statistical analysis was performed using the SAS software (SAS System for Windows, version 9.1). The normal distributions of the data were analyzed using a Shapiro-Wilk test. When needed, the data were transformed in order to have a normal distribution.

Data were then subjected to an analysis of variance (ANOVA I) considering the presence or absence of flooding as factor. The statistical significance of the results was analyzed by the Student-Newman-Keuls test at the 5 % level.

Results

Growth parameters

Flooding stress unexpectedly increased the rate of leaf appearance in the rosette. Throughout the stress period, plastochron index was lower in stressed plants than in controls after week 13 (Fig. 2A). Since the leaf mean area was not affected by flooding (details not shown), the total leaf surface was consequently higher in stressed plants than in controls (Fig. 2B). After 19 and 25 weeks, the specific leaf area was significantly higher in flooded plants (285.1 and $192.8 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ DW}$ for week 19 and 25, respectively) than in controls (234.5 and $175.9 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

The mean root fresh weight was slightly higher in stressed plants although the difference appeared to be significant at week 19 only (Fig. 2C). The shoot/root ratio decreased from week 7 to week 25 for both controls and flooded plants. At the end of the experiment, this ratio was 70% higher in stressed plants compared to controls (Fig. 2D), suggesting that shoot growth was clearly increased in comparison to root growth under hypoxic conditions. Flooding strongly modified the root shape: roots of flooded

plants appeared shorter (Fig. 2E) but larger than control roots and numerous small adventitious roots appeared at the top of the taproot (Fig. 2F). As a consequence, the fresh weight per unit length was 10.7 g.cm^{-1} in controls and up to 16.6 g.cm^{-1} in flooded plants at the end of the experiment. Secondary meristem, which did not develop further, also appeared at the basal part of the rosette (data not shown). Root tips of flooded plants exhibited necrosis (Fig. 2G) and cell death led to the appearance of an empty cavity in the central part of the root (Fig. 2H).

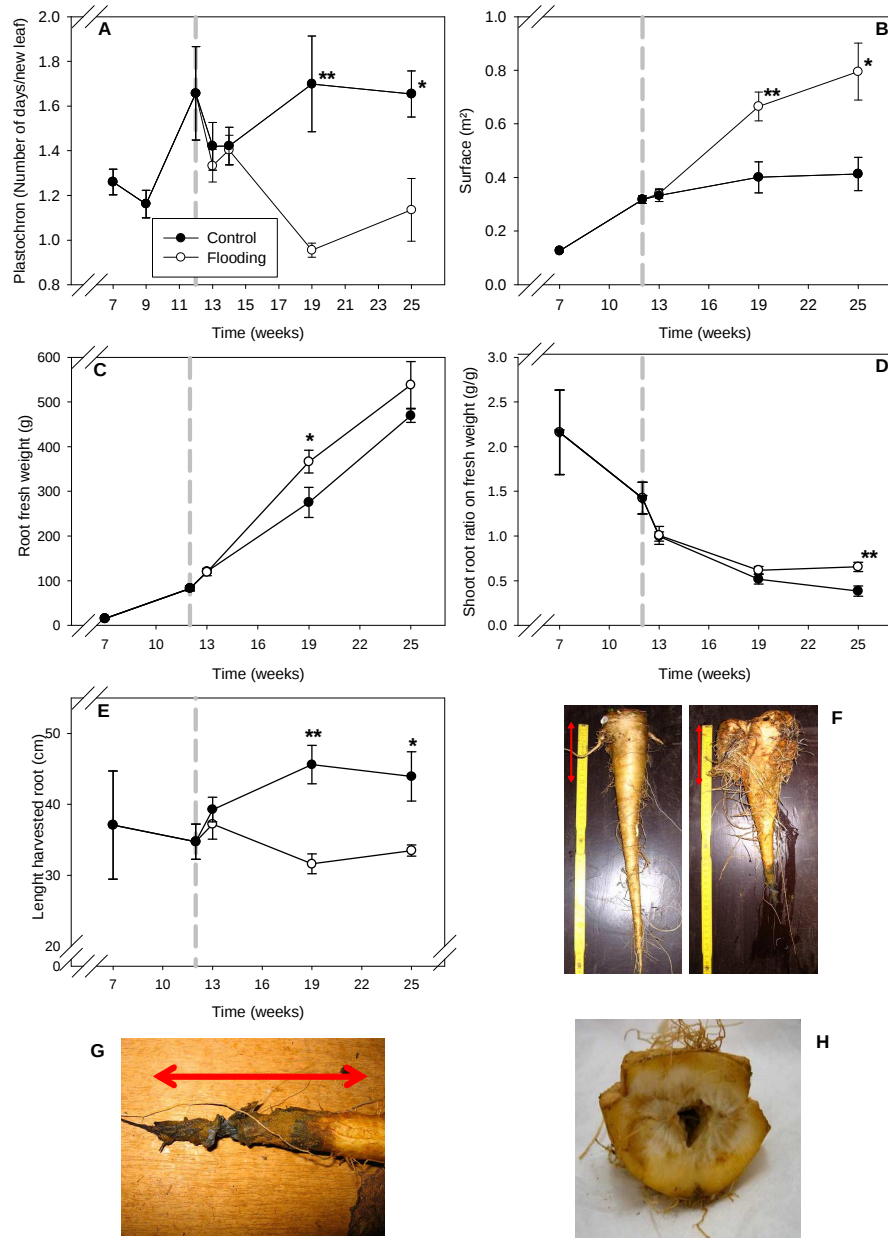


Figure 2 : Evolution of the plastochron index (A), total leaf surface (B), root fresh weight (C), shoot-to-root ratio (D) and length of harvested roots (E) in plants of *Cichorium intybus* exposed to intermittent flooding. Control roots were longer (Fig. 1F – left) than flooded roots (Fig. 1F – right: red bars corresponding in both cases to 10 cm). Flooded roots exhibited root tip necrosis (Fig. 1G; red bar corresponds to 10 cm) and central cavity issued from cell apoptosis (Fig. 1H). Stress was imposed

12 weeks after sowing (gray dashed line) and plants were harvested for analysis 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Non-destructive measurements for plastochron were made 7, 9, 12, 13, 14, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for flooding stressed plants. Each value is the mean of 5 replicates and vertical bars are the standard errors. The stars indicate the presence of a statistical difference between the treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Plant water status

Water content was lower in roots than in leaves and remained higher in flooded than in control plants, as shown in Table 1 for plants exposed to 19 and 25 weeks of treatment. Leaf water potential (ψ_w) drastically decreased from week 19 to week 25 and such a decrease was more important in flooded than in control plants. The leaf osmotic potential (ψ_s) was lower in control plants than in flooded ones 19 and 25 weeks after sowing (Table 1). As a consequence, the calculated leaf turgor potential was almost two times higher in controls ($\psi_p = 0.81$ MPa) than in flooded plants ($\psi_p = 0.40$ MPa). Root ψ_s was higher in flooded plants than in controls.

Table 1: Impact of flooding on leaf and root water content, leaf and root osmotic potential and leaf water potential in *Cichorium intybus*. Stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 5 replicates and is given with its standard error. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	Water content leaves (g water.(g FW) ⁻¹)		Water content roots (g water.(g FW) ⁻¹)	
	Control	Flooding	Control	Flooding
19	$0.88 \pm 3e^{-3}$	$0.89 \pm 3e^{-3*}$	0.77 ± 0.01	$0.79 \pm 2e^{-3*}$
25	$0.87 \pm 6e^{-3}$	$0.88 \pm 3e^{-3***}$	$0.74 \pm 3e^{-3}$	$0.79 \pm 0.01^*$
Week	Osmotic potential leaves (ψ_s ; MPa)		Osmotic potential roots (ψ_s ; MPa)	
	Control	Flooding	Control	Flooding
19	-0.91 ± 0.01	$-0.79 \pm 0.03^*$	-1.59 ± 0.11	-1.58 ± 0.09
25	-1.08 ± 0.04	$-0.90 \pm 0.04^*$	-2.10 ± 0.22	$-1.59 \pm 0.07^*$
Week	Water potential leaves (ψ_w ; MPa)			
	Control	Flooding		
19	-0.14 ± 0.05	-0.07 ± 0.02		
25	-0.27 ± 0.05	$-0.55 \pm 0.05^*$		

Flooding had a significant impact on leaf stomatal conductance (g_s ; Fig. 3A). At week 19, the stomatal conductance was significantly higher for flooded plants compared to control plants. However, an inverse trend was recorded at weeks 21 and 23.

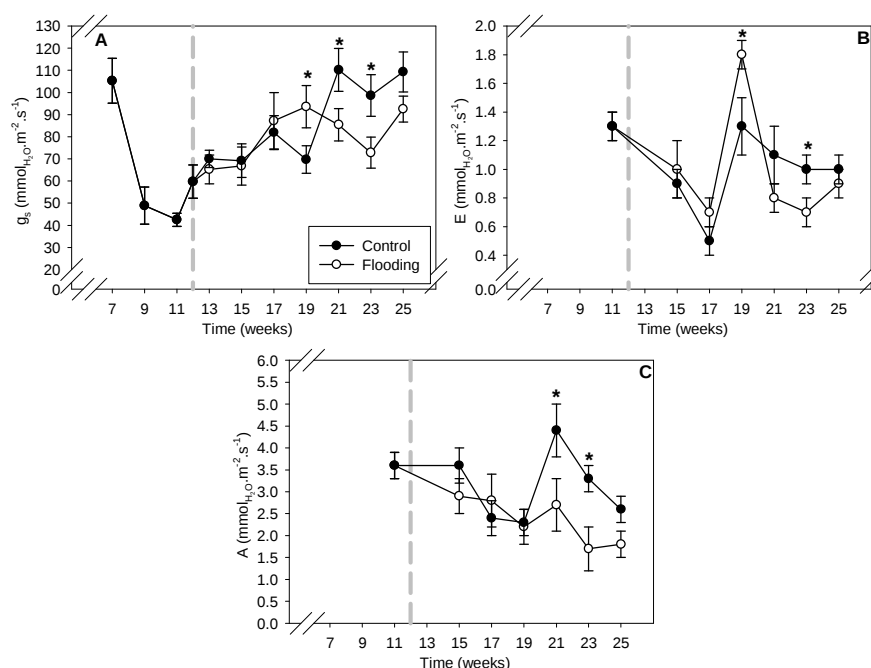


Figure 3: Evolution of stomatal conductance (A), instantaneous transpiration (B) and net photosynthesis (C) and in plants of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing. Plants were analysed 7, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 21, 23 and 25 weeks after sowing (weeks 9, 11, 12 and 13 only for stomatal conductance). Filled symbols are for control plants and open symbols for flooded plants. Each value is the mean of 5 replicates and vertical bars are the standard errors. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Gas exchange and photosynthesis-related parameters

Instantaneous transpiration (E ; Fig. 3B) followed the same trend as observed for the stomatal conductance: it was significantly higher for stressed plants at week 19 and lower at week 23. Net photosynthesis (A , Fig. 3C) was lower in flooded plants than in controls, although the difference was significant at week 21 and 23 only. The instantaneous water use efficiency (defined as the A/E ratio) was not significantly affected by flooding, whatever the duration of treatment (details not shown).

Chlorophyll concentration (Table 2) decreased significantly in flooded plants at week 13, only. After this initial decrease, chlorophyll concentration increased for flooded plants and no significant difference was recorded between treatments at week 19 and 25. The ratio chl a/chl b remained unaltered during the whole period (mean value of 2.64). A similar transient flooded-induced decrease was also observed for carotenoids.

Table 2: Impact of flooding on chlorophyll a (Chl a), chlorophyll b (Chl b) and carotenoid concentration in leaves of *Cichorium intybus*. Stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 5 replicates and is given with its standard error. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ and ***: $P<0.001$).

Week	Chlorophyll a (mg g ⁻¹ DW)		Chlorophyll b (mg g ⁻¹ DW)	
	Control	Flooding	Control	Flooding
13	11.3 ± 0.6	8.1 ± 0.5***	4.2 ± 0.3	2.9 ± 0.2**
19	9.9 ± 0.6	10.6 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.0 ± 0.2
25	10.4 ± 0.3	10.2 ± 0.4	4.3 ± 0.2	4.0 ± 0.2
Week	Carotenoids (mg g ⁻¹ DW)			
	Control	Flooding		
13	3.1 ± 0.2	2.3 ± 0.1***		
19	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.1		
25	2.4 ± 0.1	2.6 ± 0.1		

PSII efficiency was significantly lower for flooded plants than for controls just at the beginning of the treatment and at the end of the growing period at week 19, 23 and 25 (Fig. 4A). In contrast, non photochemical (Fig 4B) quenching was higher in flooded plants than in controls at week 19, 23 and 25. Photochemical quenching was statistically similar in control and flooded plants, except at week 13 where q_p was higher in the former than in the latter. It is noteworthy that flooding stress had no impact on initial and total Rubisco activities but significantly reduced the activation state of the enzyme after 19 and 25 weeks (Table 3).

Table 3: Evolution of initial and total activities and activation state of Rubisco in leaves of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 5 replicates and is given with its standard error. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ and ***: $P<0.001$).

Week	Initial activity (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)		Total activity (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	
	Control	Flooding	Control	Flooding
7	114.3 ± 16.3		168.2 ± 14.4	
12	97.7 ± 9.1		137.8 ± 15.9	
13	106.8 ± 36.6	86.7 ± 14.5	137.3 ± 41.0	129.0 ± 17.1
19	140.2 ± 28.9	112.3 ± 12.2	184.4 ± 32.6	195.4 ± 18.9
25	125.7 ± 27.7	116.9 ± 20.8	181.2 ± 61.9	195.0 ± 33.7
Week	Activation state (%)			
	Control	Flooding		
7	66.6 ± 6.6			
12	73.7 ± 5.9			
13	73.4 ± 4.7	75.8 ± 12.0		
19	72.6 ± 4.7	59.4 ± 3.9*		
25	84.4 ± 11.2	58.8 ± 4.3*		

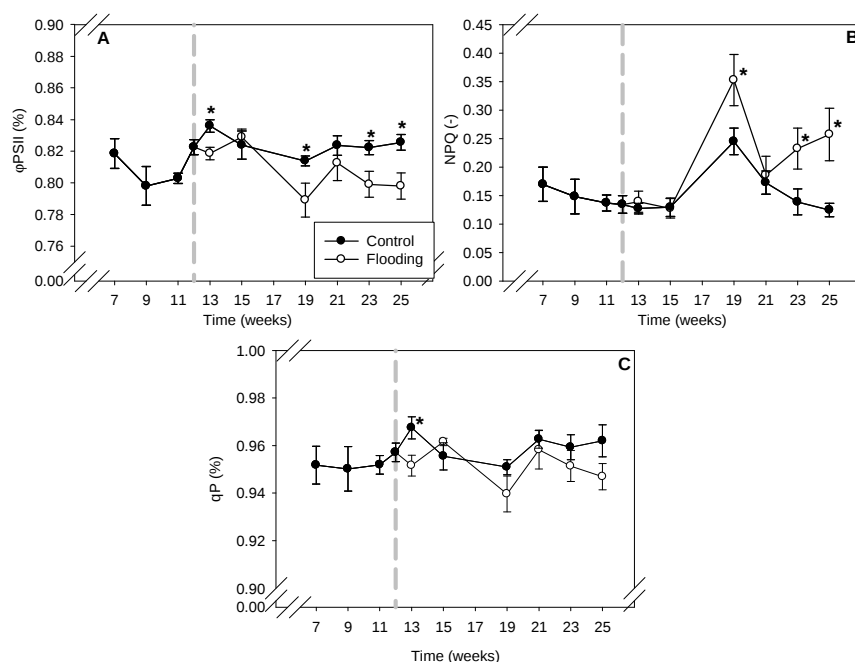


Figure 4: Evolution of photosystem II efficiency (A), non-photochemical quenching (B) and photochemical quenching (C) in plants of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and measurements were made 7, 9, 11, 12, 13, 15, 19, 21, 23 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for flooded plants. Each value is the mean of 10 replicates and vertical bars are the standard errors. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Malondialdehyde, soluble sugars, organic acids and inulin concentrations

Malondialdehyde concentration was higher in leaves than in roots (Table 4). The leaf MDA concentration was surprisingly decreased in response to flooding after 19 and 25 weeks of culture while the root MDA concentration increased in response to flooding at 13 and 25 weeks after sowing. The leaf total soluble sugar concentration (Table 4) progressively decreased after week 13. Although the decrease started later in flooded plants than in controls, it was more marked in the latter than in the former, leading to lower leaf soluble concentration in treated plants than in controls at week 25.

Table 4: Impact of flooding on leaf and root malondialdehyde (MDA) concentration and on leaf total soluble sugars in *Cichorium intybus*. Stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 5 replicates and is given with its standard error. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ and ***: $P<0.001$).

Week	MDA in leaves (nmol.g DW ⁻¹)		MDA in roots (nmol.g DW ⁻¹)	
	Control	Flooding	Control	Flooding
7	165.9 ± 5.10		102.7 ± 4.7	
12	146.3 ± 12.1		116.4 ± 6.9	
13	223.2 ± 19.2	208.6 ± 24.9	96.6 ± 4.0	112.8 ± 3.1**
19	235.7 ± 32.0	155.7 ± 5.8*	109.2 ± 5.40	104.0 ± 2.3
25	275.3 ± 30.3	153.3 ± 17.4**	97.3 ± 2.3	115.8 ± 5.2**
Week	Leaf total soluble sugar (mg.g DW ⁻¹)			
	Control	Flooding		
7	49.8 ± 1.8			
12	44.3 ± 2.2			
13	51.7 ± 2.3	51.2 ± 3.2		
19	46.1 ± 2.2	52.5 ± 4.4		
25	38.6 ± 2.7	31.9 ± 1.4*		

As indicated in Fig. 5, flooding induced a conspicuous increase in the leaf endogenous concentration of glucose, fructose, galactose and mannose at week 13, 19 and 25 (except for galactose at week 25). In contrast, a significant flooding-induced decrease was observed for sucrose concentration at the end of the treatment. Raffinose and myo-inositol were also detected in our leaf samples but remained unaffected in response to flooding (data not shown). Figure 6 shows that flooding increased leaf concentrations in malic, citric and quinic acids 19 and 25 weeks after sowing. On the contrary, the concentration in caffeic acid decreased significantly just after the stress period starts but remained unaffected thereafter.

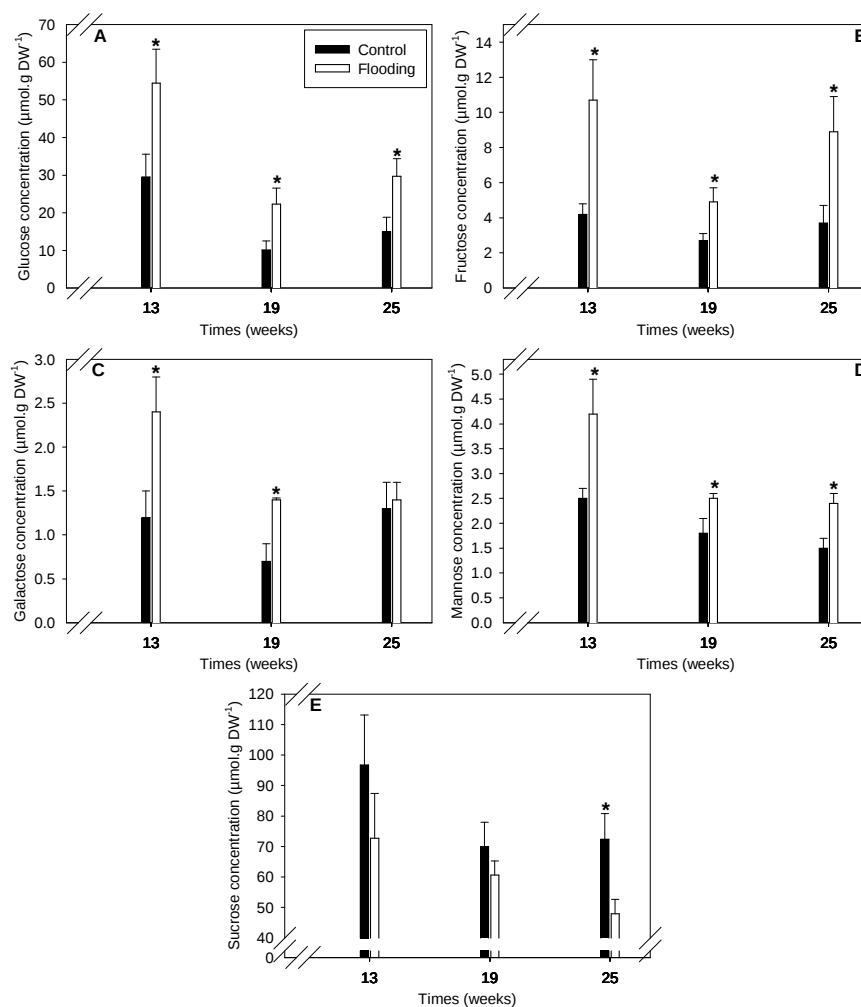


Figure 5: Evolution of glucose (A), fructose (B), galactose (C), mannose (D) and sucrose (E) concentrations in leaves of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing and measurements were made 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for flooded plants. Note that vertical scales are not the same for the different sugars. Each value is the mean of 10 replicates and vertical bars are the standard errors. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

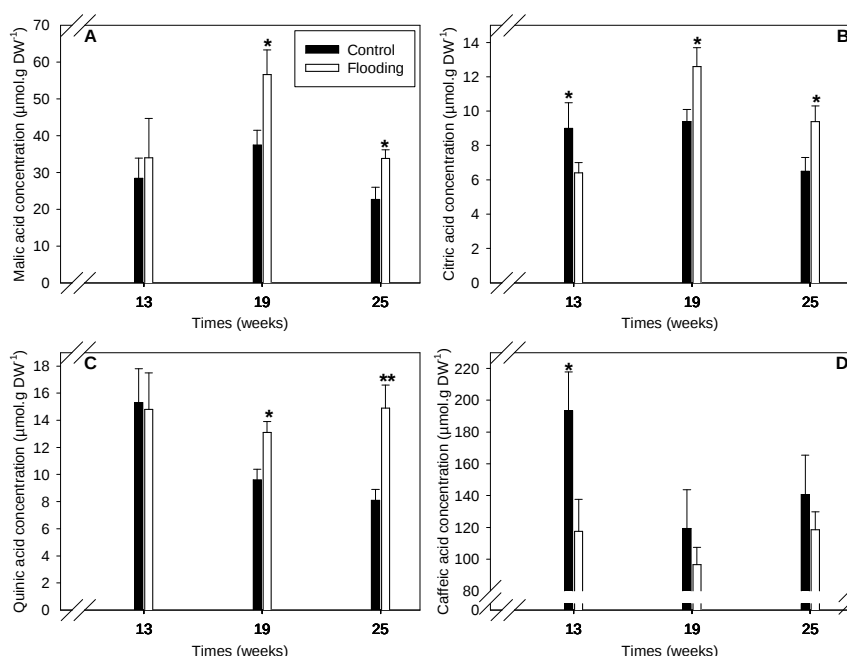


Figure 6: Evolution of malic acid (A), citric acid (B), quinic acid (C) and caffeic acid concentrations in leaves of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing and measurements were made 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for flooded plants. Note that vertical scales are not the same for the different compounds. Each value is the mean of 10 replicates and vertical bars are the standard errors. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

When expressed on a dry weight basis, the root inulin concentration (Table 5) significantly decreased as a consequence of flooding 13 and 19 weeks after sowing but not at week 25. From a qualitative point of view, it has to be mentioned that flooding induced an obvious decrease in the mean DP of inulin chain: such a decrease was already observed at week 13 and persisted until the end of the treatment. Flooding stress also induced an increase in the root soluble sugar concentration (Fig. 7.) and a high concentration of 1-kestotriose was recorded in treated roots comparatively to controls. However, the quantity of inulin produced per root remained hardly affected by flooding, a transient decrease being observed at the early beginning of inulin accumulation at week 13 only (Table 5).

Table 5: Evolution of the inulin content, mean degree of polymerization of the inulin chains (DP) and quantity of inulin in roots of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 5 replicates and is given with its standard error. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	Inulin content (g inulin/100g DW)		Mean degree of polymerization (DP)	
	Control	Flooding	Control	Flooding
7	67.1 ± 6.2		10.6 ± 0.4	
12	85.7 ± 4.9		13.6 ± 0.6	
13	83.8 ± 1.9	76.4 ± 2.5*	14.2 ± 0.4	10.7 ± 0.4***
19	84.3 ± 4.6	73.1 ± 0.6*	15.1 ± 0.3	12.3 ± 0.6**
25	82.0 ± 1.4	85.0 ± 4.4	14.5 ± 0.2	10.1 ± 0.1***
Week	Quantity of inulin in roots (g)			
	Control	Flooding		
7	1.7 ± 0.4			
12	15.6 ± 2.8			
13	23.6 ± 1.2	18.6 ± 1.7*		
19	51.9 ± 4.5	57.2 ± 4.2		
25	93.3 ± 3.9	96.9 ± 8.4		

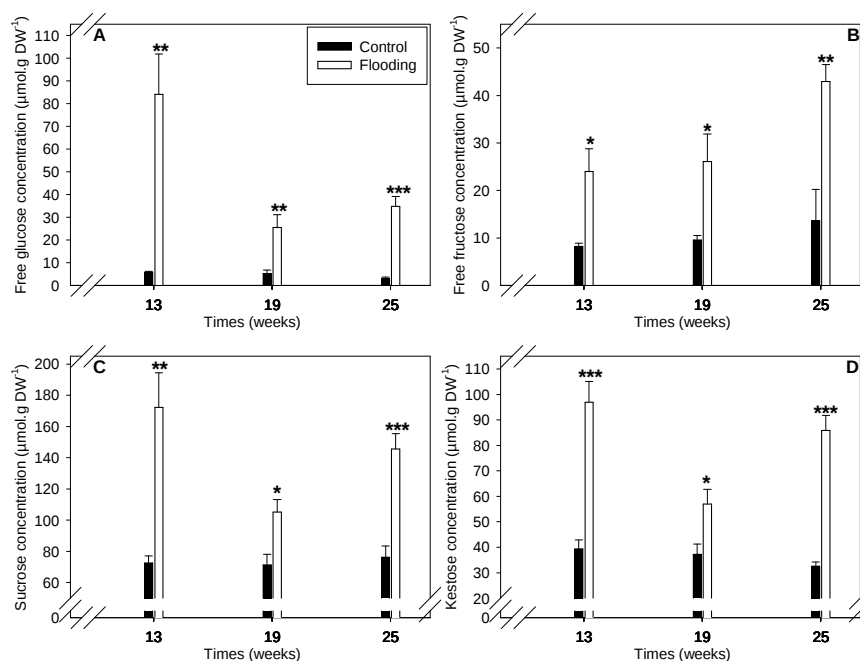


Figure 7: Evolution of free glucose (A), free fructose (B), sucrose (C) and 1-kestotriose (D) concentrations in roots of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing and measurements were made 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for flooded plants. Note that vertical scales are not the same for the different sugars. Each value is the mean of 10 replicates and vertical bars are the standard errors. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Sugar metabolizing enzymes

Flooding had no impact on the protein content, whatever the considered duration of stress ($1.8 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DW}$). No significant effect of flooding was observed on the leaf SPS activity (Fig. 8A). In contrast, flooding increased leaf SuSy (Fig. 8B) and acid invertase activities (Fig. 8C) at weeks 13 and 25. Flooding also increased the neutral invertase activities which were almost twice in the leaves of flooded plants than in those of controls at weeks 19 and 25 (Fig. 8D).

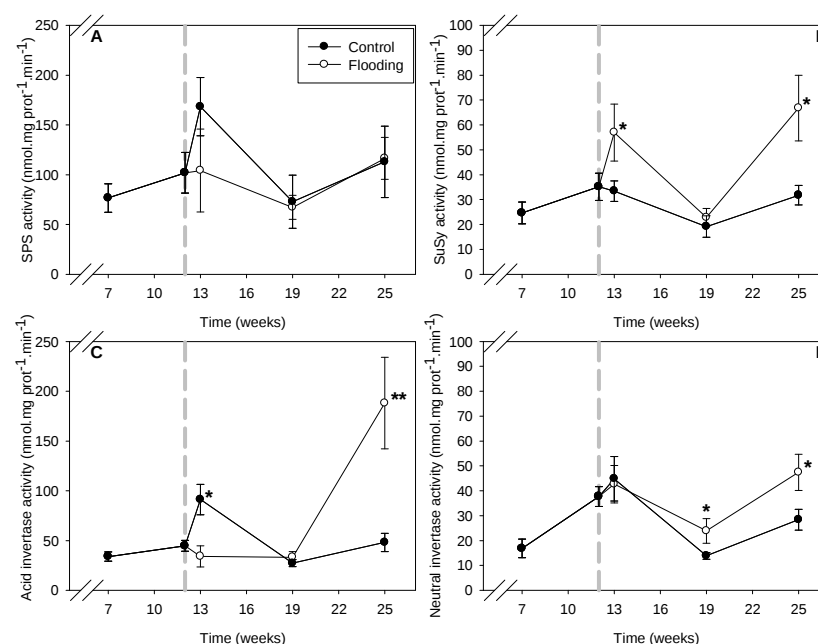


Figure 8.: Evolution of leaf sucrose-phosphate-synthase (A), sucrose synthase (B) acid invertase (C) and neutral invertase (D) activities in plants of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and plants were harvested for analysis 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for flooded plants. Each value is the mean of 5 replicates and vertical bars are the standard errors. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Similar trends were observed in flooded roots: although SPS activity was slightly lower in treated roots than in controls, the difference was statistically insignificant (Fig. 9A). Flooding induced a strong increase in root SuSy activities (Fig. 9B), already after one week of flooding. Acid invertase activities were increased by flooding at week 19 and 25 (Fig. 9C) while neutral invertase was stimulated at the end of the treatment only (Fig. 9D).

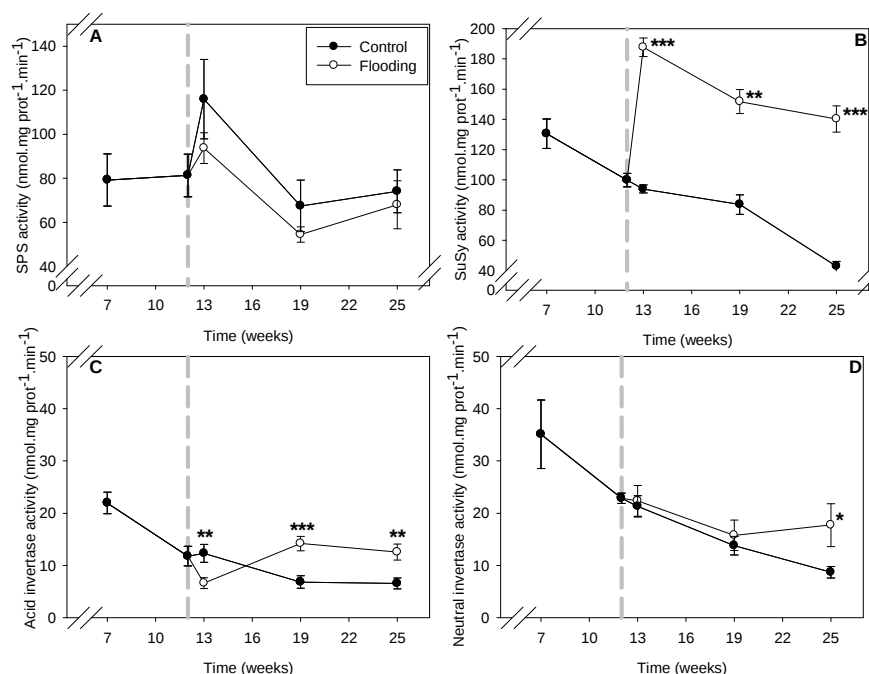


Figure 9: Evolution of root sucrose-phosphate-synthase (A), sucrose synthase (B) acid invertase (C) and neutral invertase (D) activities in plants of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing (gray dashed line) and plants were harvested for analysis 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Filled symbols are for control plants and open symbols for flooded plants. Each value is the mean of 5 replicates and vertical bars are the standard errors. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Activities of inulin metabolizing enzymes were quantified in roots (Table 6). A high 1-SST activity was recorded already at week 7: it progressively decreased with plant age and to a higher extent in flooded plants than in controls 13 and 19 weeks after sowing. Such a developmental-induced decrease was not recorded for 1-FFT activity which however remained lower in flooded plants than in controls at weeks 13 and 19. An opposite trend was observed for 1-FEH activity which was higher at week 13 and 19 in flooded plants than in controls.

Table 6: Evolution of the sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase (1-SST), fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) and fructan 1-exohydrolases (1-FEH) activities in roots of *Cichorium intybus* exposed to flooding. Stress was imposed 12 weeks after sowing and plants were harvested for analysis 7, 12, 13, 19 and 25 weeks after sowing. Each value is the mean of 5 replicates and is given with its standard error. Stars indicate the presence of a statistical difference between treatments (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

Week	1-SST (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)		1-FFT (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)	
	Control	Flooding	Control	Flooding
7	248.9 ± 11.0		57.3 ± 2.7	
12	233.4 ± 17.6		141.3 ± 12.1	
13	198.1 ± 7.3	108.7 ± 9.3***	135.6 ± 5.6*	106.0 ± 10.2*
19	68.5 ± 7.6	46.2 ± 6.7*	154.2 ± 15.4	117.1 ± 8.1*
25	24.5 ± 5.4	23.6 ± 6.5	132.9 ± 10.0	135.3 ± 6.1
Week	1-FEH (nmol.mg prot ⁻¹ .min ⁻¹)			
	Control	Flooding		
7	15.4 ± 1.8			
12	10.0 ± 0.8			
13	11.2 ± 1.0	14.5 ± 1.1*		
19	10.5 ± 1.0	13.3 ± 0.8*		
25	10.4 ± 0.9	10.1 ± 1.46		

Discussion

Numerous data are available in the literature on flooding impact on several plant species. In the presence of water excess in the soil, a low diffusion rate of oxygen causes hypoxia and most crop plants are unable to withstand prolonged periods of oxygen depletion (Drew, 1997). Under permanent flooding, plants undergo a wide range of physiological perturbations leading to metabolic disorders and, ultimately, to plant death (Parent *et al.*, 2011; Komatsu *et al.*, 2011). In field conditions, however, flooding is rarely permanent and plants may be exposed to erratic episodes of waterlogging alternating with unflooded periods. The ultimate consequence of this fluctuating environment in terms of growth and yield is a direct function of the plant's ability to cope with changing situations.

The present work suggests that chicory is, to some extent, able to cope with recurrent flooding periods. Plant growth, estimated in terms of dry weight, was indeed hardly affected by flooding. However, the shape of the analyzed

organs was profoundly modified by these stress conditions and the growing habits of plants coping with the rise in water table clearly differed from those of controls. The recorded decrease in root length was compensated by an increase in its mean diameter. While water shortage was recently demonstrated to strongly reduce all root growth parameters (Vandoorne *et al.*, 2012), water excess had no impact on root weight, but can cause root tip necrosis. From a practical point of view, a decrease in root length may even be considered as a suitable property in chicory since numerous cultivars exhibit long roots which are often broken as consequence of mechanical harvest.

As far as shoots are concerned, the situation appeared somewhat unexpected, mainly in relation to the flooding-induced increase in the number of leaves. Moreover, the maintenance of the mean leaf area despite a turgor decrease suggests that cell wall mechanical properties were modified in order to allow the maintenance of cell elongation. Komatsu *et al.* (2010) recently listed a number of biochemical changes that could be involved in a flooding-induced increase in cell wall extensibility. Similarly, Kong *et al.* (2010) reported flooding induction of apoplastic enzymes such as β -1,3-glucanases and β -glucosidase which could be involved in cell wall relaxation processes. Moreover, while a decrease in SLA is often considered as a common symptom of flooding stress in plants (Dat *et al.*, 2004), chicory exhibited a contrasting behavior and clearly increased SLA at weeks 19 and 25. A decrease in SLA may be considered as an avoidance strategy, reducing transpiration area and thus maintaining the water balance. In chicory, an increase in transpiration area did not induce obvious symptoms of water stress since the leaf water content was even higher in flooded plants than in controls. A decrease in the stomatal conductance helped the plant to restrict transpiration, especially at later growth stages. Such a decrease in stomatal conductance was not paralleled by a decrease in the leaf ψ_w since the latter parameter was affected at the end of the culture during week 25, at a time when g_s remained similar in control and flooded plants. According to Else *et al.* (2009), stomata of flooded tomato plants do not close in response to a decrease in ψ_w or to an increase in C_i resulting from impaired PSII chemistry; stomatal closure is the initial process which depressed C_i and which could then explain subsequent changes in chlorophyll fluorescence parameters. Our kinetics approach, however, revealed that PSII efficiency was indeed affected by flooding but also that such symptoms may occur in the absence of stomatal closure. By using a periodic flooding approach similar to our experimental strategy, Glaz *et al.* (2004) demonstrated that the efficiency of stomatal closure was drastically affected by the kinetics of water table movement and concluded

that the picture may be quite different from the situation occurring as a result of permanent flooding. According to Blake and Cooke (2004), stomatal closure in flooded plants may also be due to a release in ethylene. This hormone has extensively been involved in plant cell death and aerenchyma formation in plants adapted to flooding (Shimamura *et al.*, 2007; Majerus *et al.*, 2007; Irfan *et al.*, 2010).

Maintenance of net photosynthesis is an important component of flooding stress tolerance (Yordanova and Popova, 2007; Rood *et al.*, 2010; Parent *et al.*, 2011). Net photosynthesis was inhibited in chicory under flooded conditions after week 19. In controls, net photosynthesis increased from week 19 to week 21, as a possible consequence of an increased demand for carbohydrate storage in the root. Such an increase was not recorded in flooded plants. Stomatal closure induced by flooding may be partly responsible for net photosynthesis decrease. Flooding induced decrease in PSII efficiency may also be involved in photosynthesis inhibition. According to Else *et al.* (2009), a limited availability of CO₂ resulting from stomatal closure would depress the amount of electron acceptor NADP⁺ as the carbon cycle slows down. The recorded increase in NPQ could then be considered as an adaptative diversion of light energy in order to maintain the reductive power away from PSII. Once again, the situation is quite different from the situation observed for drought conditions, where an obvious increase in PSII efficiency was observed in chicory (Vandoorne *et al.*, 2012). This suggests that protecting mechanisms acting on PSII under water shortage are not induced, or not efficient, under water stress.

Although some authors reported a decrease in Rubisco activity and in chlorophyll concentration in response to flooding (Yordanova and Popova, 2001, 2007), these symptoms were not observed in the present study. A decrease in Chl content was transiently observed one week after stress imposition, but plants then appeared able to re-increase photosynthetic pigment concentration close to control plants. It was also expected that, with less CO₂ available for photosynthesis, reducing power could be diverted to O₂, leading to oxidative stress induced by ROS such as superoxide anions (O₂⁻) and H₂O₂ (Yordanova and Popova, 2007; Else *et al.*, 2009). Although oxidative stress has since a long time be recognized as an important component of flooding (Yan *et al.*, 1996), the lower MDA concentration recorded in stressed leaves comparatively to controls suggest that chicory exposed to flooding was able to trigger efficient responses in terms of antioxidative mechanisms (Blokhina *et al.*, 2003). This, however, is not the case in the roots where MDA concentration was higher in stressed plants than in controls.

The accumulation of malic and citric acid in leaves of flooded plants suggests that the Krebs cycle may not only be affected in roots, as expected under flooded conditions, but also in leaves. The increases in quinic acid suggest that the plant secondary metabolism may be activated under flooding stress, although the physiological signification of such an increase remains elusive. Quinic acid is a cyclic polyol ubiquitous in higher plants. It is the major biochemical intermediate in the biosynthetic pathway of most plant aromatic compounds. It is also considered as an antioxidant involved in plant defenses against oxidative stress (Jehnes *et al.*, 2007) and, because of its high solubility, as a contributor to osmotic adjustment (Larher *et al.*, 2009). A higher shoot concentration of quinic acid in flooding-treated plants could be linked to the efficient management of oxidative stress as revealed by lower leaf MDA in treated plants than in controls. However, its putative involvement in osmotic adjustment in *C. intybus* is not supported by our data since the leaf Ψ_s was higher in plants accumulating quinic acid. Surprisingly, caffeic acid, another major antioxidant in plants, decreased after one week of flooding. However, caffeic acid is also involved in lignin synthesis (Jehnes *et al.*, 2007; Kováčik and Klejdus, 2008). Hence, a stress-induced decrease in caffeic acid might be related to flooding induced increase in cell wall extensibility and may cause a shift towards quinic acid synthesis to counteract secondary oxidative stress. Further investigations on cell wall properties and composition are required to test these hypotheses.

The leaf sugar concentration was expected to decrease as a result of net photosynthesis inhibition. Unexpectedly, reducing sugars such as glucose and fructose increased while sucrose concentration tended to decrease, especially at the end of the treatment. Such a decrease could be, at least partly, related to higher SuSy and invertases activities. In the roots, flooding induced an obvious increase in all soluble sugars. This accumulation could not be explained by any growth inhibition since control and flooded roots exhibited more or less the same weight. Although both SuSy and acid invertase were increased in flooded roots, sucrose also accumulated to a high extent, while SPS remained unaffected. It is therefore tempting to speculate that sucrose increased as a consequence of a higher translocation from the shoots to the roots, or as a consequence of a stress-induced inhibition of inulin synthesis. The present work shows that inulin content was indeed reduced at week 13 and week 19, but this was not anymore the case at the end of the treatment. This suggests that inulin synthesis could be delayed under flooded conditions, but that it was not permanently reduced. Both the concentration of inulin and the amount of inulin produced per plant were similar in controls and treated roots at week 25

although free soluble sugars, especially sucrose and 1-kestotriose, were still markedly higher in latter than in the former. Although 1-SST activities recorded *in vitro* was lower in treated roots (especially at week 13 and 19) than in controls, the accumulation of 1-kestotriose suggests that it does not constitute the major limiting step of inulin synthesis *in planta*. Accumulation of 1-kestotriose could be related to inhibition of 1-FFT which, indeed, was reduced at week 13 and 19 in treated roots comparatively to controls. This hypothesis is supported by the fact that the mean DP of inulin chain was lower in flooded roots than in controls. Although flooding-induced increase in 1-FEH may also contribute to inulin depolymerisation and 1-kestotriose accumulation, the registered value of 1-FEH activities remain rather low, even at the end of the growth cycle, and could not fully explain the lower DP observed for flooded roots. Although flooding had not impact on quantitative production of inulin, it strongly reduced the quality of inulin since longer chains are more suitable for specific commercial purposes.

The present study was performed on a sand substrate under controlled environmental conditions. It may still be argued that hypoxia remains limited on this type of substrate comparatively to classical field soil containing a given proportion of clay. Quantification of O₂ deprivation in the root environment, and biochemical study of lactic and alcoholic fermentations in treated roots should help us to gain more information about the impact of flooding on chicory metabolism. Quantification of ethylene synthesis and an analysis of the expression of genes coding for enzymes involved in inulin metabolism are under progress in our laboratory.

Acknowledgements

This work was supported by Région Wallonne (DGTRE) of Belgium through the subventions D31-1062, D31 – 1123 and D31-1175 and Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS ; conventions n° 1.5.111.10F). The authors are also very grateful to FNRS for the PhD research grant of BV (Aspirant FNRS) and to B. Van Pee, B. Capelle and H. Dailly (CARI – UCL) for the valuable technical assistance.

References

- Ahmed S, Nawata E, Sakuratania T. 2006.** Changes of endogenous ABA and ACC and their correlations to photosynthesis and water relations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczak cv. KPS1) during waterlogging. *Environmental and Experimental Botany* **57**: 278-284.
- Aschi-Smiti S, Chaïbi W, Brouquisse R, Ricard B, Saglio P. 2003.** Assessment of enzyme induction and aerenchyma formation as mechanisms for flooding tolerance in *Trifolium subterraneum* Park. *Annals of Botany* **91**: 195-204.
- Baert JRA. 1997.** The effect of sowing and harvest date and cultivar on inulin yield and composition of chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. *Industrial Crops and Products* **6**: 195-199.
- Blake MM, Cooke DT. 2004.** Effects of flooding and drought on stomatal activity, transpiration, photosynthesis, water potential and water channel activity in strawberry stolons and leaves. *Plant Growth Regulation* **42**: 153-160.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003.** Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress : a review. *Annals of Botany* **91**: 179-194.
- Boamfa EI, Ram PC, Jackson MB, Reuss J, Harren FJM. 2003.** Dynamic aspects of alcoholic fermentation of rice seedlings in response to anaerobiosis and to complete submergence : relationship to submergence tolerance. *Annals of Botany* **91**: 279-290.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for determining microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Colmer TD. 2003.** Aerenchyma and an inducible barrier to radial oxygen loss facilitate root aeration in upland, paddy and deep-water rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany* **91**: 301-309.
- Dat J, Capelli N, Folzer H, Bourgeade P, Badot PM. 2004.** Sensing and signalling during the plant flooding. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 273-282.
- De Roover J, Vandenbranden K, Van Laere A, Van den Ende W. 2000.** Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose:sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* **210**: 808-814.
- Drew MC. 1997.** Oxygen deficiency and root metabolism: injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 223-250.
- Du YC, Nose A, Kawamitsu Y, Murayama S, Wasano K, Uchida Y. 1996.** An improved spectrophotometric determination of the activity of

- Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Japanese Journal of Crop Science* **65**: 714-721.
- Else MA, Janowiak F, Atkinson CJ, Jackson MB. 2009.** Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants. *Annals of Botany* **103**: 313-323.
- Gladish DK, Xu J, Niki T. 2006.** Apoptosis-like programmed cell death occurs in procambium and ground meristem of pea (*Pisum sativum*) root tips exposed to sudden flooding. *Annals of Botany* **97**: 895-902.
- Glaz B, Morris DR, Daroub SH. 2004.** Sugarcane photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance due to flooding and water table. *Crop Science* **44**: 1633-1641.
- Heath RL, Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 185-188.
- Huber H, Jacobs E, Visser EJW. 2009.** Variation in flooding-induced morphological traits in natural populations of white clover (*Trifolium repens*) and their effects on plant performance during soil flooding. *Annals of Botany* **103**: 377-386.
- Huber JL, Hite DRC, Outlaw WH, Huber SC. 1991.** Inactivation of highly activated spinach leaf Sucrose Phosphate Synthase by dephosphorylation. *Plant Physiology* **95**: 291-297.
- Irfan M, Hayat S, Hayat Q, Afroz S, Ahmad A. 2010.** Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. *Protoplasma* **241**: 13-17.
- Jackson MB, Ishizawa K, Ito O. 2009.** Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress. *Annals of Botany* **103**: 137-142.
- Jehnes S, Betz G, Bahnweg G, Haberer K, Sandermann H, Rennenberg H. 2007.** Tree internal signaling and defence reactions under ozone exposure in sun and shade leaves of European beech (*Fagus sylvatica* L.) trees. *Plant Biology* **9**: 253-264.
- Komatsu S, Kobayashi Y, Nishizawa K, Nanjo Y, Furukawa K. 2010.** Comparative proteomics analysis of differentially expressed proteins in soybean cell wall during flooding stress. *Amino Acids* **39**: 1435-1449.
- Komatsu S, Yazmamamoto A, Nakamura T, Nouri MZ, Nanjo Y, Nishizawa K, Furukawa K. 2011.** Comprehensive analysis of mitochondria in roots and hypocotyls of soybean under flooding stress using proteomics and metabolomics techniques. *Journal of Proteome Research* **10**: 3993-4004.
- Kong FJ, Oyanagi A, Komatsu S. 2010.** Cell wall proteome of wheat roots under flooding stress using gel-based and LC MS/MS-based

- proteomics approaches. *Biochimica et Biophysica Acta* **1804**: 124-136.
- Kováčik J, Klejdus B. 2008.** Dynamics of phenolic acids and lignin accumulation in metal-treated *Matricaria chamomilla* roots. *Plant Cell Reports* **27**: 605-615.
- Larher FR, Lugan R, Gagneul D, Guyot S, Monnier C, Lespinasse Y, Bouchereau A. 2009.** A reassessment of the prevalent organic solutes constitutively accumulated and potentially involved in osmotic adjustment in pear leaves. *Environmental and Experimental Botany* **66**: 230-241.
- Lefèvre I, Marchal G, Meerts P, Corréal E, Lutts S. 2009.** Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany* **65**: 145-152.
- Lichtenthaler HK. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382.
- Loreti E, Yamaguchi J, Alpi A, Perata P. 2003.** Sugar modulation of α -amylase genes under anoxia. *Annals of Botany* **91**: 143-148.
- Majerus V, Bertin P, Lutts S. 2007.** Effects of iron toxicity on osmotic potential, osmolytes and polyamines concentrations in the African rice (*Oryza glaberrima* Steud.). *Plant Science* **173**: 96-105.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000.** Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.
- Monti A, Amaducci MT, Pritoni G, Venturi G. 2005.** Growth, fructan yield, and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) as related to photosynthetic capacity, harvest time and water regime. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1389-1395.
- Ooume K, Inoue Y, Soga K, Wakabayashi K, Fujii S, Yamamoto R, Hoson T. 2009.** Cellular basis of growth suppression by submergence in azuki bean epicotyls. *Annals of Botany* **103**: 325-332.
- Parent C, Crèvecoeur M, Capelli N, Dat JF. 2011.** Contrasting growth and adaptative responses of two oak species to flooding stress: role of non-symbiotic haemoglobin. *Plant, Cell and Environment* **34**: 1113-1126.
- Peña-Fronteras JT, Villalobos MC, Baltazar AM, Merca FE, Ismail AM, Johnson DE. 2009.** Adaptation to flooding in upland and lowland ecotypes of *Cyperus rotundus*, a troublesome sedge weed of rice: tuber morphology and carbohydrate metabolism. *Annals of Botany* **103**: 295-302.
- Roberfroid MB, Delzenne NM. 1998.** Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition* **18**: 117-143.

- Rood SB, Nielsen JL, Shenton L, Gill KM, Letts MG. 2010.** Effects of flooding on leaf development, transpiration, and photosynthesis in narrowleaf cottonwood, a willow-like poplar. *Photosynthesis Research* **104**: 31-39.
- Schittenhelm S. 1999.** Agronomic performance of root chicory, Jerusalem artichoke and sugarbeet in stress and non-stress environment. *Crop Science* **39**: 1815-1823.
- Setter TL and I Waters. 2003.** Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats. *Plant and Soil* **253**: 1-34.
- Setter TL, Waters I, Sharma SK, Singh KN, et al., 2009.** Review of wheat improvement for waterlogging tolerance in Australia and India : the importance of anaerobiosis and element toxicities associated with different soils. *Annals of Botany* **103**: 221-235.
- Shabala S. 2011.** Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants : the role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance. *New Phytologist* **190**: 289-298.
- Shimamura S, Yoshida S, Mochizuki T. 2007.** Cortical aerenchyma formation in hypocotyls and adventitious roots of *Luffa cylindrica* subjected to soil flooding. *Annals of Botany* **100**: 1431-1439.
- Singla NK, Jain V, Jain S, Sawhney SK. 2004.** Activities of glycolytic enzymes in leaves and roots of contrasting cultivars of sorghum during flooding. *Biologia Plantarum* **47**: 555-560.
- Stoyanova S, Geuns J, Hideg E, Van den Ende W. 2011.** The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **62**: 207-214.
- Subbaiah CC, Sachs MM. 2003.** Molecular and cellular adaptations of maize to flooding stress. *Annals of Botany* **90**: 119-127.
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C. 2003.** Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* **425**: 393-397.
- Van den Ende W, Mintiens A, Speleers H, Amabilis AO, Van Laere A. 1996.** The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytologist* **132**: 555-563.
- Van den Ende W, Peshev D, De Gara L. 2011.** Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology* **22**: 689-697.
- van Dongen JT, Frölich A, Ramírez-Aguilar SJ, Schauer N, Fernie AR, Erban A, Kopka J, Clark J, Langer A, Geigenberger P. 2009.** Transcript and metabolite profiling of the adaptive response to mild decreases in

- oxygen concentration in the roots of arabidopsis plants. *Annals of Botany* **103**: 269-280.
- Vandoorne B, Mathieu AS, Van den Ende W, Vergauwen R, Périlleux C, Javaux M, Lutts S. 2012.** Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in *Cichorium intybus* (var. *sativum*) independently of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* (in press).
- Van Laere A, Van den Ende W. 2002.** Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment* **25**: 803-813.
- Van Toai TT, EE JD, Goulart PFP, Griver SJ, Donizeti A, Nguyen HT, Yu O, Rahman M, Islam R. 2012.** Soybean (*Glycine max* L. Merr.) seed composition response to soil flooding stress. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **10**: 795-801.
- Voesenek LACJ, Benschop JJ, Bou J, Cox MCH, Groeneveld HW, Millenaar FF, Vreeburg RAM, Peeters AJM. 2003.** Interactions between plant hormones regulate submergence-induced shoot elongation in the flooding-tolerant dicot *Rumex palustris*. *Annals of Botany* **91**: 205-211.
- Wilson RG, Smith JA, Yonts CD. 2004.** Chicory root yield and carbohydrate composition is influenced by cultivar selection, planting and harvest date. *Crop Science* **44**: 748-752.
- Yan B, Dai Q, Liu X, Huang S, Wang Z. 1996.** Flooding-induced membrane damage, lipid oxidation and activated oxygen generation in corn leaves. *Plant and Soil* **179**: 261-268.
- Yanagawa Y, Komatsu S. 2012.** Ubiquitin/proteasome-mediated proteolysis is involved in the response to flooding stress in soybean roots, independent of oxygen limitation. *Plant Science* **185/186**: 250-258.
- Yemm EW, Willis J. 1954.** The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal* **57**: 508-514.
- Yordanova RY, Popova LP. 2001.** Photosynthetic responses of barley plants to soil flooding. *Photosynthetica* **39**: 515-520.
- Yordanova RY, Popova LP. 2007.** Flooding-induced changes in photosynthesis and oxidative status in maize plants. *Acta Physiologica Plantarum* **29**: 535-541.

Discussion

Arrivés au terme des quatre chapitres expérimentaux, nous avons décidé d'articuler la discussion autour de 7 grandes questions transversales. Celles-ci nous permettront de mettre en parallèle l'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse.

1. Des différences dans les conditions d'environnement peuvent-elles expliquer certaines des différences observées ?

Au cours des différentes expériences, il ne nous a pas toujours été possible de reproduire exactement les mêmes conditions d'environnement au sein des chambres conditionnées. Le tableau ci-dessous résume les conditions moyennes rencontrées pour chacune des 4 expériences.

Tableau 1 : Résumé des conditions environnementales moyennes mesurées pour les différentes expériences.

Conditions envi	Température (°C)		Humidité rel (%)	Luminosité ($\mu\text{mol}/(\text{m}^2.\text{s})$)	Photop (h)
	Jour	Nuit			
Chapitre 1	23	20	75	135	16
Chapitre 2	25	18	45	210	16
Chapitre 3	24	18	55	370	16
Chapitre 4	23	20	70	190	16

Nous allons analyser ci-dessous si la variation des conditions climatiques a entraîné des différences dans les valeurs mesurées entre les plantes témoins des différentes expériences. Les seules données pouvant être comparées entre les quatre expériences concernent les mesures d'échanges gazeux. Le tableau 2 ci-dessous reprend la moyenne des mesures de conductance stomatique (g_s), de transpiration instantanée (E) et de photosynthèse nette (A) mesurées sur les plantes témoins après l'application des traitements. Nous avons choisi de ne prendre les valeurs qu'après l'application des traitements car avant ce moment, le nombre de mesures réalisées varie fortement d'une expérience à l'autre.

Tableau 2 : Echanges gazeux moyens mesurés pour les plantes témoins des différentes expériences après l'application des traitements (c'est-à-dire après 3 mois de croissance).

<i>Echanges gazeux</i>	g_s (mmol _{H2O} /(m ² .s))	E (mmol _{H2O} /(m ² .s))	A (μmol _{CO2} /(m ² .s))
Chapitre 1	58	0.86	1.8
Chapitre 2	73	1.20	5.4
Chapitre 3	144	1.74	7.8
Chapitre 4	87	0.97	3.1

L'analyse croisée des deux tableaux ci-dessus nous indique clairement, à l'exception de la mesure de conductance stomatique moyenne mesurée au chapitre 2, que lorsque la luminosité augmente, les échanges gazeux augmentent également. Il s'agit là d'une très bonne explication de la différence observée entre les valeurs absolues d'échanges gazeux mesurés au cours de nos expériences et les valeurs mesurées par Monti *et al.* (2005) sur des chicorées en champ. En effet, ces derniers mesuraient des valeurs de conductance stomatique et de photosynthèse nette beaucoup plus élevées que les nôtres : les plantes cultivées au champ dans l'expérience de Monti sont soumises à des intensités lumineuses bien plus élevées que nos plantes maintenues en phytotron. Outre la luminosité, l'humidité relative plus faible mesurée dans les conditions expérimentales des expériences des chapitres 2 et 3 peut également justifier les échanges gazeux plus importants mesurés au sein de ces études.

Une comparaison des mesures physiologiques réalisées sur les plantes témoins des expériences des chapitres 1 et 4 montre que d'autres paramètres physiologiques peuvent être influencés par les conditions lumineuses ambiantes. En effet, alors que les plantes témoins se sont développées dans les mêmes conditions d'humidité, de température, d'apport en eau, de volume de sol,... la seule chose qui variait réellement entre les deux études devait être le niveau d'intensité lumineuse. Cela se confirme au travers des valeurs reprises dans le tableau 1 ci-dessus.

L'intensité lumineuse plus importante du chapitre 4 semble avoir permis aux plantes témoins de développer davantage leur croissance racinaire. La masse racinaire est en effet significativement plus importante chez les témoins de l'expérience 4 en fin de période de croissance (+/- 450 g) en comparaison des témoins de l'expérience 1 (+/- 280 g). Il semble en outre que les feuilles des témoins de l'expérience 1 présentent une concentration en chlorophylles a et b plus importante que les feuilles des plantes témoins de l'expérience 4. La concentration en MDA semble quant à elle être plus importante chez les plantes de l'expérience 4. Nous pouvons ici supposer

que l'intensité lumineuse plus importante dans l'expérience 4 entraîne un flux d'électrons plus important également. Une plus grande quantité d'électrons libres peut alors participer à la production de composés d'oxygène actif ce qui conduit à une augmentation de la quantité de MDA et une réduction de la teneur en chlorophylles des feuilles par dégradation des pigments.

Au niveau des activités enzymatiques, il semble que l'intensité lumineuse ait un impact sur l'activité de la SPS au niveau des feuilles. Le niveau d'activité de cette enzyme est en effet plus important chez les feuilles des plantes témoins de l'expérience 4. Cette activité accrue conduit à une concentration en saccharose plus importante dans les feuilles des plantes témoins de l'expérience 4 en comparaison des feuilles des plantes témoins de l'expérience 1. La SPS est en effet une enzyme dont l'activité est régulée par la lumière, un processus de déphosphorylation intervenant au niveau d'un résidu sérine afin de rendre cette enzyme active en début de photopériode (Huber *et al.*, 1991).

Une dernière différence majeure entre les expériences 1 et 4 provient des mesures de rendement. A l'analyse des données, il semble en effet que les racines des plantes témoins de l'expérience 4 présentent une concentration plus importante en inuline et des chaînes un peu plus longues que ce qui est observé pour les racines témoins de l'expérience 1. Ceci semble être corrélé avec des activités enzymatiques plus importantes pour la 1-SST et la 1-FFT chez les racines des plantes témoins de l'expérience 4. De nouveau, l'intensité lumineuse plus importante au cours de l'expérience 4 pourrait expliquer ces différences.

2. Que se passe-t-il en semaine 19 ?

Nos résultats obtenus dans le cadre de la caractérisation physiologique du matériel végétal (Chapitre 1 et Chapitre 4) ont permis de mettre en évidence un comportement particulier des plantes exposées au stress en semaine 19. Les plantes soumises au stress hydrique montrent effectivement une augmentation importante du plastochrone (Chapitre 1, Fig 2A) et de la transpiration (Table 1). Les activités SPS et SuSy sont plus importantes au niveau des plantes stressées. Même les plantes témoins présentent un statut particulier à ce moment, particulièrement pour ce qui concerne les paramètres liés à la fluorescence de la chlorophylle, qui permettent de distinguer ces plantes à la fois de ce qui précède, et de ce qui suit. Un comportement particulier est aussi mis en évidence dans le cadre de nos expériences sur le flooding et ces observations se sont répétées lors d'expériences indépendantes. Les données micro-climatiques enregistrées ne montrent pas d'anomalie particulière dans les phytotrons. Nous ne pouvons donc pas relier ce comportement à des observations particulières réalisées dans le cadre des Chapitres 2 et 3.

La croissance végétative de la chicorée est souvent séparée en phases distinctes, prenant en considération l'évolution de la morphologie des racines. Une première phase s'étend sur 1,5 à 2 mois qui consiste en une croissance structurelle et en la formation d'une longue racine primaire. Durant la seconde phase, allant jusqu'au 5^{ème} mois, la racine principale présente une croissance en largeur qui conduit à la formation d'une racine tubéreuse accumulant l'inuline (Limani *et al.*, 1993 ; Améziane *et al.*, 1997). Dorchies et Rambourt (1985) ont montré que le passage de la première phase à la seconde s'accompagnait de diverses modifications biochimiques touchant, notamment, au métabolisme de l'azote. Les données présentées par Druart *et al.* (2001) confirment qu'un statut physiologique particulier peut être observé, près de 50 jours après le semis. Nos observations portent en semaine 19, soit bien plus tardivement, et concernent principalement des paramètres mesurés au niveau du système foliaire. Cette période correspond à celle où la synthèse d'inuline se ralentit et où cette plante bisannuelle enclenche une phase de son développement lui permettant de passer les saisons froides sans consommer ses réserves. Nous pouvons envisager l'hypothèse selon laquelle cette phase critique du développement s'accompagne d'un statut physiologique particulier qui pourrait peut-être expliquer le comportement spécifique observé en semaine 19. Cette hypothèse pourrait être testée en comparant le comportement de ces plantes à celui de plantes vernalisées qui enclenchent une floraison et connaissent donc une évolution phénologique distincte.

3. Peut-on parler de tolérance de la chicorée vis-à-vis des stress étudiés ?

Ces dernières années, l'actualité a mis l'accent sur les conséquences agronomiques des changements climatiques futurs. Pour ce qui concerne l'approvisionnement en eau des plantes cultivées, ce problème n'est en fait pas nouveau : selon Araus *et al.* (2007), les premières domestications d'espèces végétales il y a plus de 10000 ans se sont déroulées dans un contexte où l'eau constituait déjà un facteur limitant. La résistance au stress est un terme générique reprenant d'une part des processus d'évitement qui permettent à la plante de contourner la contrainte et de l'autre des processus de tolérance qui lui permettent d'assurer le maintien de son métabolisme en dépit de cette contrainte. D'un point de vue botanique, la résistance peut se concevoir comme l'ensemble des stratégies mises en œuvre par la plante pour assurer la totalité de son cycle, en ce compris sa phase reproductrice (Fang *et al.*, 2010). Dans cette optique, la tolérance au sens strict implique donc des mécanismes de résistance à la dessiccation, tels qu'ils existent chez de nombreuses espèces non cultivées (Toldi *et al.*, 2009 ; Farrant et Moore, 2011).

Dans la revue bibliographique, travaillant sur une plante de grandes cultures, nous avons défini la tolérance au stress comme étant la capacité de la plante à maintenir son rendement malgré les contraintes de son environnement (Neumann, 2008). En effet, le point de vue de l'agronome est sensiblement distinct de celui du botaniste : il s'agit d'assurer le maintien des rendements, voire même dans une perspective économique, de maximiser le profit de l'agriculteur (Passioura, 2007). Ainsi des stratégies physiologiques qui permettent à la plante d'améliorer ses chances de survie en conditions de stress peuvent présenter un coût métabolique peu compatible avec le maintien des rendements. Les spécificités morphologiques et phénologiques de chaque espèce doivent ainsi être prises en considération (Verslues et Juenger, 2011 ; Tardieu *et al.*, 2011). Comme la betterave sucrière, la chicorée à inuline présente à cet égard deux spécificités importantes : il s'agit d'une espèce bisannuelle (et notre perception de la « tolérance » ne porte donc que sur une partie de son cycle) et l'organe récolté est le même que celui qui est impliqué dans l'absorption de l'eau et dont les cinétiques de développement sont directement affectées par une réduction de la disponibilité en eau du substrat (Ober et Luterbacher, 2002 ; Pinheiro *et al.*, 2005).

Au regard des résultats obtenus tout au long de nos 4 chapitres expérimentaux, nous pouvons clairement affirmer que, dans les conditions environnementales imposées au cours de nos études, la chicorée apparaît tolérante à l'engorgement du substrat mais se montre par contre sensible au manque d'eau. Ce résultat peut sembler paradoxal. En effet, nous avons constaté au cours des 3 premiers chapitres que la plante parvenait à bien gérer le manque d'eau. Nous avons appris au travers de nos recherches que sa racine pivotante profonde lui était très utile en situation de manque d'eau. C'est en effet parce qu'elle investit le sol en profondeur que le mécanisme de compensation est possible. Il s'agit d'un mécanisme important lui permettant de survivre au stress. Au-delà de la compensation, en cas de sécheresse, même importante, la plante réduit sa croissance, sa surface foliaire et ses échanges gazeux mais conserve une machinerie photosynthétique efficace. Il apparaît ici que la plante met en place des stratégies « d'économie », au détriment de la croissance et donc du rendement. Cette survie n'implique pas de consommation des réserves en sucres. Les feuilles ont même tendance à être plus riches en saccharose et autres sucres libres. Concernant le saccharose, ceci peut s'expliquer à la fois par une augmentation de la synthèse de ce sucre (en relation avec une activité accrue de la SPS) et, dans une moindre mesure, par une réduction probable de la translocation du saccharose des feuilles vers les racines. Ce dernier mécanisme pourrait principalement intervenir entre les semaines 19 et 25 où nous avons constaté dans le chapitre 1 que la quantité d'inuline dans les racines n'augmentait plus. La SPS joue un rôle important dans les stratégies d'adaptation au stress hydrique (Fresneau *et al.*, 2007 ; Whittaker *et al.*, 2007). Une telle stimulation n'est pas incompatible avec le maintien des rendements en sucres si les cinétiques de transport vers les racines sont maintenues. Il conviendrait donc à l'avenir de mener des études approfondies sur l'impact des conditions de stress sur les taux de translocation des sucres.

Malgré de nombreux signes de résistance de la plante vis-à-vis du manque d'eau dans son substrat, le fait que la quantité finale d'inuline récoltée soit réduite en cas de stress nous indique que la plante n'est pas « agronomiquement » tolérante à la sécheresse dans les conditions de stress imposées au cours de nos trois premiers chapitres. Une expérience réalisée en champ en 2006 dans des conditions de stress moins sévères ne nous avait pas permis de tirer ces mêmes conclusions (Vandoorne, 2007). Dans cette étude, la plante était plutôt tolérante vis-à-vis du manque d'eau. Il est donc primordial à l'avenir de parvenir à cerner exactement à partir de quel moment le manque d'eau affecte le rendement de la plante en conditions de terrain. Jusqu'à certains niveaux de teneur en eau du substrat, il est en effet tout à fait envisageable que la plante tolère le stress

grâce à son enracinement profond et à la compensation. Une telle étude permettrait de déterminer les fréquences éventuelles d'irrigation compatibles avec le maintien du potentiel de rendement de la culture (Ferreret *et al.*, 2007).

A l'inverse des plantes souffrant d'un manque d'eau, des chicorées placées dans des conditions d'excès d'eau intermittent tolèrent quant à elles très bien cette contrainte. En effet, au terme des expériences menées dans le cadre du chapitre 4, nous constatons que la quantité d'inuline produite par les plantes témoins et les plantes stressées en fin d'expérience est identique. Il est à noter, cependant, que la comparaison entre les deux types de contrainte n'est que partiellement valide puisque le stress « sécheresse » est maintenu de façon permanente alors que la composante « flooding » est temporaire. Pourtant, alors que la croissance et le rendement final en inuline ne sont pas affectés par l'engorgement intermittent du substrat, nous avons constaté que la machinerie photosynthétique, les activités enzymatiques et même la qualité de l'inuline produite (longueur des chaînes) étaient quant à elles bel et bien perturbées par l'excès d'eau. Des études récentes ont permis de mieux cibler les composantes physiologiques et biochimiques de la réponse à l'engorgement du substrat (Gharbi *et al.*, 2007 ; Simova-Stoilova *et al.*, 2012 ; Gimeno *et al.*, 2012). Il serait particulièrement opportun de poursuivre notre étude en prenant en considération l'impact d'un engorgement du substrat sur l'induction du processus de fermentation et, le cas échéant, la production d'éthylène souvent évoquée en réponse à l'hypoxie et dont les effets sur le métabolisme des sucres apparaissent de mieux en mieux documentés.

Pour conclure cette question, nous pouvons donc clairement affirmer que dans les conditions de stress imposées, la chicorée est tolérante à l'engorgement de son substrat mais est sensible au manque d'eau. Cette conclusion n'est toutefois valide que dans les limites imposées par notre étude : un seul paramètre est responsable du stress, alors que les autres paramètres de l'environnement demeurent constants. Il est clair que cette situation est bien distincte de celle du champ : en conditions de stress hydriques, de hautes températures et des intensités lumineuses élevées sont également souvent présentes et ont une action sur le comportement de la plante qui réagit à son environnement dans sa globalité.

4. Sécheresse et engorgement, mêmes conséquences ?

Comme cela a été évoqué précédemment, il apparaît clairement que les 2 contraintes environnementales, telles qu'appliquées au cours de nos expériences, ont des conséquences physiologiques distinctes.

Pour résumer la situation, nous pouvons dire que le manque d'eau entraîne une réduction de la croissance de la plante et de la production d'inuline sans pour autant affecter l'efficacité des mécanismes photosynthétiques. Nous avons en effet pu constater qu'en cas de manque d'eau, l'efficacité de la phase claire de la photosynthèse était maintenue, voire parfois améliorée. En outre, malgré une réduction de l'activité de la RUBISCO en semaines 13 et 19, nous avons estimé que la fixation du CO₂ demeurerait suffisante. La synthèse foliaire des sucres n'est en effet pas réduite en cas de stress. Il est souvent admis qu'en condition de stress, une inhibition de la photosynthèse pouvait être due à des causes stomatiques et/ou non-stomatiques (Medrano et al., 2002 ; Bernacchi et al., 2007 ; Chaves et al., 2009). De toutes évidences, une inhibition non-stomatique de la photosynthèse ne paraît pas être le facteur limitant de la croissance chez *C. intybus*. Les composés responsables de la protection des photosystèmes seraient particulièrement intéressants à identifier : une adaptation efficace à ce niveau constitue en effet souvent l'apanage de plantes capables de s'acclimater à des environnements secs (Galmés et al., 2007). Chez de nombreuses espèces, des composés d'ammonium quaternaire peuvent ainsi présenter une accumulation spécifiquement chloroplastique et contribuer efficacement au maintien de l'intégrité des photosystèmes (Gagneul et al. 2007 ; Mahouachi et al. 2012). A notre connaissance, il n'y a pas de données relatives à une possible synthèse de ces composés chez les Astéracées et une analyse à cet égard pourrait s'avérer utile à la suite de notre étude. Notons que l'implication d'autres composés dans cette fonction de protection a également parfois été évoquée (Raymond et Smirnoff, 2002 ; Martinelli et al., 2007 ; Peters et al., 2007).

Une réduction de la conductance stomatique est quant à elle soulignée, même pour des intensités de stress modérées (cfr Chapitre 1). Il serait particulièrement intéressant d'étudier chez *C. intybus* les agents responsables de la fermeture des stomates : si l'implication de l'ABA est traditionnellement évoquée, plusieurs évidences expérimentales ont récemment montrées qu'il n'était pas, loin s'en faut, le seul agent responsable de ce processus. D'autres régulateurs de croissance interviennent, et en particulier l'éthylène (Voisin et al., 2006 ; Jia and Davies 2007 ; Wilkinson et Davies ; Peleg et Blumwald 2011). En outre, le statut

nutritif de la plante peut également avoir une incidence majeure sur le comportement des stomates (Benlloch-Gonzalez et al. 2008). Pour cette raison, nous proposons dans le cadre d'études ultérieures, d'accorder une attention prépondérante au statut hormonal et à l'alimentation minérale des plantes exposées au stress hydrique.

Les dosages du saccharose dans les feuilles et les mesures des activités enzymatiques nous indiquent même que la synthèse de ce sucre non réducteur est plus importante dans les feuilles des plantes stressées par rapport aux feuilles des plantes témoins. Il est bien établi que ce sucre peut assumer des fonctions de protection au niveau de structures cellulaires, en se substituant aux molécules d'eau et en stabilisant les membranes biologiques (Farrar et al., 2000). Mais le rôle du saccharose est incontestablement plus complexe puisqu'il intervient, à titre principal, dans les signaux de transduction mis en place par la plante en réponse aux contraintes de l'environnement (Boulouri-Moghaddam et al., 2010). Une accumulation de sucres n'est pas nécessairement bénéfique pour la plante et l'induction du processus de sénescence foliaire en réponse à cette accumulation reçoit un intérêt croissant de la part des physiologistes (Wingler et al., 2006). D'autres sucres libres tels que le glucose, le fructose, le galactose et le myo-inositol sont présents en quantités plus importantes dans les feuilles des plantes stressées. Ces composés peuvent également aider la plante à lutter contre les effets néfastes du stress en réduisant le potentiel osmotique cellulaire permettant ainsi de maintenir la turgescence des tissus, en activant des voies de réaction de la plante et en détoxifiant les espèces d'oxygène actif produites en conséquence du stress (notamment pour piéger les électrons libres excédentaires venant de l'énergie lumineuse incidente). Abreu et Aragao (2007) attribuent ainsi au myo-inositol des fonctions particulières dans les voies de transduction, le stockage d'auxine, et la synthèse de nombreuses autres molécules de stress chez *Passiflora edulis*. De même, Loewus et Murthy (2000) soulignent les nombreuses interactions entre la synthèse de myo-inositol et le métabolisme d'autres sucres en conditions de stress.

Enfin, il a également été observé que les chicorées souffrant d'un manque d'eau présentaient une meilleure efficacité dans l'utilisation de l'eau fournie. Ceci ne signifie pourtant pas nécessairement que la plante est tolérante au stress. En conditions optimales, les plantes ont tendance à gaspiller de l'eau par transpiration. Le fait que les plantes stressées soient capables de produire plus de matière sèche avec une certaine quantité d'eau en comparaison des plantes témoins ne signifie donc pas qu'elles se « portent mieux » que les plantes témoins. Ceci signifie simplement que, par nécessité, elles régulent mieux l'ouverture et la fermeture des stomates

afin de chercher à utiliser ce qu'elles reçoivent de façon plus rationnelle, et qu'une éventuelle fermeture des stomates a plus d'incidence sur la transpiration que sur la photosynthèse (Pou et al. 2008 ; Cabrera-Bosquet et al., 2007). Des adaptations de cette nature ne sont pas exclusivement dues à une modification de la régulation stomatique mais peuvent également impliquer des modifications histologiques conduisant à une modification de la conductance du mésophylle (Barbour et al., 2010). Toutefois, si les quantités de matière produites sont insuffisantes, cette meilleure efficacité de l'utilisation de l'eau n'empêchera pas la mort de la plante.

Dans le cas de l'excès d'eau, la situation est fort différente. Chez *C. intybus*, aucune réduction de croissance n'a pu être observée en cas de stress. Les plantes stressées ont au contraire tendance à produire plus de feuilles que les plantes témoins. Elles présentent d'ailleurs une surface foliaire plus importante. Au niveau du rendement, les quantités d'inuline produites par les plantes témoins et les plantes stressées sont identiques. Ceci nous a d'ailleurs conduits précédemment à parler de tolérance au stress pour les plantes soumises à un engorgement intermittent de leur substrat. Ceci est de nouveau totalement différent de ce que nous avons observé dans les situations de manque d'eau.

Au-delà de ces différences au niveau de la croissance et du rendement, nous avons également pu constater que la forme des racines est fort différente entre les plantes souffrant d'un manque et d'un excès d'eau. Dans le cas de la sécheresse, la masse racinaire est en effet beaucoup mieux répartie en profondeur que dans le cas de l'excès d'eau. En situation de flooding, les chicorées ont en effet tendance à rassembler la grande majorité de leur masse racinaire dans les 10 premiers centimètres du sol. Ceci est d'ailleurs fort intéressant pour les agronomes travaillant à l'amélioration de la culture. En effet, si les plantes cultivées étaient capables de se comporter de la sorte, cela entraînerait beaucoup moins de pertes à l'arrachage des racines. Il est à souligner que nos connaissances demeurent très fragmentaires sur l'histologie des racines de chicorée : le flooding induit l'apparition d'une cavité interne au centre de la racine. Les conséquences de cette perturbation sur le métabolisme racinaire restent, à ce stade, difficiles à préciser.

Pour ce qui est des paramètres physiologiques étudiés, là encore de nombreuses différences entre les 2 stress étudiés ont été observées. Une première différence importante concerne le potentiel hydrique foliaire. Alors qu'aucune différence significative n'avait pu être observée en situation de manque d'eau, les plantes souffrant d'un excès d'eau présentent un potentiel hydrique foliaire inférieur à celui des témoins. Ceci

permet de souligner qu'en situation de flooding, l'ensemble du métabolisme de la plante est perturbé et que cette perturbation se concrétise par une modification du statut hydrique de la plante (Glaz et al., 2004).

Ceci pourrait être mis en relation avec une acidification du cytosol conduisant à la dégradation des aquaporines (Blanke et Cooke, 2004). Même si cela n'a pas été suivi, il est tout à fait possible qu'avec le temps, l'engorgement du substrat entraîne une dégradation de ces protéines et donc une fermeture de ces canaux. Le potentiel hydrique se réduit alors en vue de maintenir le flux transpiratoire et les entrées d'eau dans les cellules. Dans le cas du manque d'eau, la fermeture des stomates plus marquée pourrait expliquer que cette réduction de potentiel n'ait pas été observée en fin de période de croissance. Il n'était plus nécessaire à ce moment de maintenir le flux transpiratoire (Bailey-Serres et Voesenek, 2010).

Nous avons constaté que contrairement à ce qui se passe en cas de manque d'eau, l'efficacité de la phase claire de la photosynthèse est cette fois réduite en cas d'excès d'eau : il y a donc lieu de considérer que les mécanismes de protection préalablement évoqués ne sont plus opérationnels en situation d'hypoxie. L'activité de la RUBISCO ne semble par contre pas affectée. Une autre différence assez étonnante entre les 2 types de stress concerne la concentration en MDA dans les feuilles. Alors qu'en cas de manque d'eau sa concentration augmente fortement suite au stress oxydatif, en cas d'excès d'eau la concentration en MDA dans les feuilles diminue. Ceci conduit à penser que chez la chicorée les processus de détoxification des espèces oxydantes sont beaucoup plus efficaces en cas d'excès d'eau qu'en cas de manque d'eau. Alors que les stratégies de protection par rapport aux radicaux libres sont aujourd'hui bien connues en réponse à la sécheresse (Csizsar et al., 2012 ; Wang et al., 2012 ; Uzilday et al., 2012), l'impact du flooding est à cet égard beaucoup plus mystérieux et ceci est valable tant pour ce qui concerne la formation des radicaux libres eux-mêmes que pour leur détoxification (Gill et Tuteja, 2010).

En cas de manque d'eau, nous avons pu mesurer que la concentration en sucres dans les feuilles augmentait. Ceci a notamment été mis en relation avec l'augmentation d'activité de l'enzyme permettant la synthèse de saccharose : la SPS. Dans le cas du flooding, les concentrations en glucose, fructose, galactose et mannose augmentent également mais les concentrations en saccharose diminuent. L'augmentation de la concentration en glucose et fructose peut être directement liée à l'augmentation de l'activité des enzymes participant à la dégradation du saccharose : les invertases et surtout la saccharose synthase (SuSy). Dans

les racines des plantes soumises à un excès d'eau, les concentrations en glucose et fructose augmentent également en réponse à une dégradation plus importante. Les concentrations en saccharose et kestose augmentent quant à elles suite à la dégradation des chaînes d'inuline. Il apparaît donc clairement que le métabolisme des sucres, y compris les modalités de synthèse et/ou de dégradation de l'inuline, sont distinctes pour les deux types de contraintes. Il serait par conséquent intéressant de comparer les effets d'un stress hydrique et d'un engorgement du substrat sur l'expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'inuline.

Au terme de cette analyse, nous constatons que pour les intensités de stress appliquées, les conséquences des 2 contraintes ont été fort différentes. Il est cependant important de préciser que les paramètres physiologiques ont toujours été mesurés au même moment de la journée, soit aux alentours de midi. À l'exception bien sûr du rendement, du nombre de feuilles, de la surface foliaire et de la masse racinaire, il serait intéressant de réaliser un suivi détaillé de l'évolution des paramètres physiologiques pour ces 2 types de contraintes au cours de plusieurs journées complètes : beaucoup de ces paramètres sont effectivement soumis à un ensemble de fluctuations diurnes et l'on peut concevoir que pour un paramètre donné, les différences entre les traitements peuvent varier en fonction du temps au cours de la photopériode. Il est tout à fait possible que nos conclusions auraient été différentes si nos paramètres physiologiques avaient été mesurés au petit matin ou en fin de journée par exemple.

5. Que nous a apporté l'étude combinée sol/plante ? Quel lien peut-on établir entre les observations racinaires et les observations foliaires ? Quelles sont les perspectives à ce niveau ?

Avant toute chose, il est important de mentionner que la visualisation des mouvements d'eau dans le sol et de la prise d'eau par les racines ne pouvait se faire que dans la situation de manque d'eau. En situation d'excès d'eau, nous n'aurions rien pu observer au moyen de notre dispositif. Les teneurs en eau dans un sol gorgé ne varient pas.

Notre étude combinée sol/plante, de par les volumes de sol mis en jeu, présente le gros avantage de nous rapprocher des conditions de terrain. Cela nous a permis de réaliser un suivi beaucoup plus fin et réaliste des conséquences du manque d'eau tant au niveau de la plante qu'au niveau du sol. Alors que dans des colonnes plus petites, le stress est particulièrement brutal et vraisemblablement surévalué suite à l'assèchement très rapide du substrat, dans les grandes colonnes le stress apparaît de manière beaucoup plus progressive. Ceci nous a permis de mettre en évidence certains mécanismes se déroulant dans le sol ou mis en œuvre par la plante : respectivement la compensation passive du manque d'eau dans certains horizons ainsi que la croissance racinaire localisée principalement là où la compensation a lieu. Cette zone bien précise mériterait un examen plus approfondi des mécanismes physiologiques mis en œuvre par la plante. La localisation de cette zone évolue donc dans le temps. Il s'agit là d'un endroit fort intéressant où de nombreux mécanismes pourraient être étudiés en termes d'activités enzymatiques, de croissance racinaire, de prise d'eau,... Ceci implique donc de prendre en compte non pas la racine dans sa globalité, mais des secteurs bien précis au niveau desquels la plante est susceptible d'agir pour maintenir son approvisionnement (Aroca et al., 2012).

Nos travaux liant sol et racines ne nous ont malheureusement pas emmenés aussi loin que nous l'espérions initialement. L'objectif initial de l'étude combinée sol/plante était de coupler complètement les mesures physiologiques réalisées dans le chapitre 1 avec les mesures 'sol' et suivi de la prise d'eau des chapitres 2 et 3. Si notre étude n'a pas permis d'assurer à ce stade un couplage direct entre le déplacement de l'eau dans le sol et le statut physiologique de la plante, elle a par contre permis de définir le cadre expérimental requis pour des démarches ultérieures en assurant la calibration des sondes, la validation des relations petro-physiques, la mise au point de l'inversion ERT,... Ces étapes indispensables ont été menées

alors que nos plantes étaient déjà en phase de croissance. Ce n'est donc qu'une fois les expériences terminées et les plantes récoltées que nous avons pu modéliser la prise d'eau racinaire et mettre l'accent sur le phénomène de compensation. Les traitements de données et la modélisation étant au point, il devient désormais possible de connaître presque en temps réel le profil de prise d'eau racinaire.

Si la mise au point du traitement des données devrait nous permettre d'affiner certaines mesures, il reste toutefois un souci majeur pour combiner réellement étude physiologique et mesure du profil de prise d'eau racinaire. Cette limite concerne le nombre d'échantillons mis en jeu dans nos expériences. Alors qu'une étude de sol vise souvent à comprendre des phénomènes et ne nécessite pas de réplicats, l'existence d'une variabilité génétique au sein des plantes entraîne le besoin de disposer de plusieurs réplicats pour un même traitement. Dans notre cas, pour des questions pratiques de temps et d'espace nous n'avions en tout et pour tout que 10 colonnes de sol de grand format, 8 équipées de sondes TDR et 2 de sondes ERT. Afin de suivre de près la cinétique des paramètres physiologiques comme cela a pu être fait dans les chapitres 1 et 4, il faudrait répéter l'expérience sur les 10 colonnes simultanément en veillant à disposer de 5 vrais réplicats par traitement. Ceci permettra de réaliser un suivi physiologique robuste.

Maintenant que les techniques et les méthodes de traitement des données sont au point (TDR surtout et dans une moindre mesure ERT), il pourrait également être intéressant de retourner vers le champ. Il est en effet tout à fait possible d'y installer les sondes utilisées dans nos expériences. Cela permettrait de multiplier fortement le nombre de plantes et de réaliser alors une étude physiologique sur quelques paramètres ciblés.

Bien entendu, il serait dans ce cas beaucoup plus difficile de maîtriser les conditions de l'environnement. L'étude de profil racinaire serait incontestablement plus lourde. Cependant, s'il est possible d'avoir une idée du profil racinaire, le suivi de la teneur en eau du sol et la modélisation de la prise d'eau permettraient de savoir si le phénomène de compensation a lieu ou non et donc si les plantes commencent à souffrir d'un manque d'eau ou pas. Il serait alors possible de lier un état de la plante (stressée ou non) à des mesures physiologiques ciblées comme les échanges gazeux, les contenus en sucres des feuilles et des racines, les potentiels osmotiques foliaire et racinaire, les mesures de rendement ou encore l'efficacité de la phase claire de la photosynthèse. L'estimation des flux d'eau dans le substrat complèterait utilement les estimations de l'ajustement osmotique des plantes. Alors qu'il est admis que cet ajustement osmotique a pour finalité de maintenir l'approvisionnement en eau et la turgescence en

conditions de stress (Morgan, 1983), les relations entre l'importance et la précocité de cet ajustement osmotique d'une part, et le rendement d'autre part, demeurent particulièrement ambiguës (Turner et al., 2007). Des données contradictoires sont souvent rapportées dans la littérature (Palta et al., 2004 ;Serraj et Sinclair, 2002).

L'utilisation de cette étude couplée, sol et physiologie, constitue la meilleure manière de parvenir à déterminer ce que nous évoquions précédemment, à savoir de connaître le niveau de teneur en eau du substrat (et sa répartition) faisant basculer la plante d'une situation de tolérance au stress à une situation de résistance.

Les résultats obtenus ouvrent donc clairement la voie à de nouvelles études intégrées prenant en considération, de façon beaucoup plus aboutie, les relations sol-plantes. La répétition de cette démarche en colonnes ainsi que son application au champ permettra incontestablement d'apporter aux physiologistes et aux améliorateurs des outils performants en vue de l'identification d'un matériel végétal performant.

6. Quelles différences majeures peut-on observer entre chicorées et betteraves sucrières quant à leur comportement vis-à-vis du stress hydrique et de l'engorgement du substrat ?

En raison de leur apparence semblable et d'un calendrier de culture comparable, un parallélisme est facilement établi entre la betterave sucrière (*Beta vulgaris*) et la chicorée à inuline (*Cichorium intybus*). Bien que betterave et chicorée soient toutes deux des plantes bisannuelles cultivées en vue d'extraire du sucre de leur racine pivotante, les similitudes s'arrêtent presque là. Chicorées et betteraves n'appartiennent en effet pas à la même famille de plantes. La chicorée est une Astéracée alors que la betterave est une Chénopodiace. En outre la chicorée accumule de l'inuline dans ses racines comme composé de réserve alors que la betterave accumule du saccharose. Comme pour la chicorée, des recherches traitant des réactions de la betterave en situation de sécheresse existent. Les recherches relatives à l'excès d'eau sont quant à elles tout à fait fragmentaires.

Dans le cas de la sécheresse les recherches de Hoffmann (2010), de Monti *et al.* (2006) et de Bloch *et al.* (2006) nous apprennent que le manque d'eau entraîne une réduction de croissance foliaire et racinaire ainsi qu'une diminution du shoot/root ratio. C'est ce que nous avons pu observer chez la chicorée à inuline. Comme pour la chicorée, Ober et Rajabi (2010) suggèrent que la résistance relative de la betterave au manque d'eau peut être liée à ses origines méditerranéennes. Comme la chicorée, elle a en outre développé une racine pivotante capable d'aller chercher l'eau en profondeur. En comparaison des cultures céréalières par exemple, les auteurs indiquent qu'il est tout à fait possible d'avoir des rendements corrects en situation de manque d'eau. Il existerait cependant de grandes différences entre cultivars et l'amélioration de la résistance au stress hydrique demeure l'un des objectifs des sélectionneurs.

Si tous les auteurs semblent s'accorder sur le fait que la sécheresse entraîne une diminution de croissance de la plante et donc de rendement final en saccharose, les effets du manque d'eau sur la concentration en saccharose dans les racines apparaissent contradictoires selon les études. Nous avons pris en considération des études relatives à l'application d'un stress à un stade comparable à celui utilisé dans notre démarche expérimentale, soit 2 mois après la germination. La teneur en eau dans le substrat des plantes stressées était de 30 % de la capacité au champ presque dans tous les cas.

Selon Hoffmann (2010), le manque d'eau entraînerait une diminution de la concentration en saccharose dans les racines des plantes stressées. Les concentrations en sels, en glycine bétaine, en glucose et en fructose seraient quant à elles augmentées. Comme toutes les Chénopodiacées, la betterave sucrière accumule des composés d'ammonium quaternaires dont nous avons déjà évoqué le rôle positif au sein des tissus stressés. Ces résultats semblent confirmer ceux obtenus par Bloch *et al.* (2006). Par contre, selon Choluj *et al.* (2008) et Kenan *et al.* (2004), la sécheresse aurait plutôt tendance à augmenter la concentration en saccharose dans la racine de betterave. Pour la chicorée, nos recherches et celles de Monti *et al.* (2005) indiquent toutes les deux que le manque d'eau dans le substrat ne modifie pas la concentration en inuline dans la racine.

Concernant les effets de l'engorgement du substrat sur la culture de betteraves, il nous a été possible de trouver deux études relatives à ce sujet. L'étude de Costa *et al.* (2008) indique que 4 jours de flooding important (nappe d'eau à 5 cm de la surface) entraînent une diminution de la productivité de la plante. Ceci semble donc être différent de ce qui se passe pour la chicorée. Il faut toutefois prendre ces conclusions avec prudence car les protocoles sont fort différents. L'étude de Klotz et Haagensohn (2008) indique quant à elle qu'il n'y a pas de différence dans l'activité racinaire de la SuSy en conditions d'anaérobiose. Ceci est également fort différent de ce que nous avons pu observer chez la chicorée lors de notre expérience de flooding stress au cours de laquelle l'activité de la SuSy était fortement augmentée, à la fois dans les feuilles et les racines.

A l'analyse des articles trouvés, il semble donc que les réactions des deux plantes en cas de stress hydrique soient différentes. Le problème est qu'il est toujours très compliqué de comparer des expériences entre elles car les conditions d'environnement et les protocoles utilisés ne sont jamais exactement identiques. La meilleure façon de comparer les plantes serait de réaliser des expériences de sécheresse et d'engorgement du substrat dans lesquelles betteraves et chicorées seraient cultivées en même temps et dans des conditions exactement identiques. Il s'agit là d'une perspective particulièrement intéressante en vue de comparer le comportement des plantes et leur degré de tolérance au stress. Il se peut très bien également qu'en fonction du timing d'application du stress, les conclusions soient totalement différentes quant à savoir quelle plante tolère le mieux la contrainte. Ce sont d'ailleurs ces petites différences dans les protocoles qui expliquent sans doute les conclusions différentes en termes de concentration en saccharose dans les racines de betteraves.

A l'avenir, dans l'hypothèse où le marché de l'inuline venait à se développer et vu de l'existence de quotas sucriers sur le saccharose, il pourrait s'avérer intéressant de remplacer certains emblavements de betteraves par des chicorées. Ceci est d'autant plus vrai que ces deux têtes de rotation présentent un rendement économique comparable (en 2011, rendement brut de 2400€/ha en chicorées, 2200€/ha en betteraves : <http://statbel.fgov.be> et <http://www.sillonbelge.be/> le 30 mai 2012).

7. Amélioration de la culture de chicorée : quelques pistes envisageables.

L'objectif ultime de notre étude était de contribuer à déterminer dans quelle mesure il est possible d'améliorer la culture de chicorées. L'une des premières interrogations concerne l'opportunité d'irriguer cette culture. En fait, les études sur cette question demeurent fragmentaires dans la littérature. Sur base des chapitres 2 et 3, nous avons pu montrer que la plante est capable d'aller chercher ses ressources en profondeur dans le sol. Cela lui permet de résister longtemps au manque d'eau. Toutefois, ainsi que nous l'avons souligné antérieurement, résistance ne veut pas dire tolérance. Une fois que l'eau se fait rare dans tous les horizons pouvant être investigués par les racines de cette plante, nous avons pu constater que celle-ci réduit fortement sa croissance et sa production d'inuline. Elle se met alors, en quelque sorte, en « stand by » en attendant de nouveaux apports en eau. D'un point de vue agronomique, cette réduction de croissance et de production d'inuline est très ennuyante ! En vue d'améliorer son itinéraire technique, il pourrait donc réellement être intéressant de réaliser une étude de stress hydrique en conditions de champ. Jusqu'où la plante peut-elle aller sans que son rendement ne soit affecté par le manque d'eau ? Une étude coûts/bénéfices de l'irrigation serait un complément idéal afin de juger de l'opportunité ou non d'irriguer cette culture et de savoir quand intervenir. Les chapitres 2 et 3 nous ont montré que le fait d'irriguer la plante modifie son profil de prise d'eau. Une fois le sol irrigué, de nouvelles racines latérales sont créées dans les premiers horizons et la prise d'eau se concentre alors de nouveau à ce niveau.

Les espèces végétales cultivées pour la production d'inuline sont peu nombreuses : selon Monti *et al.* (2005), l'artichaut de Jérusalem est plus résistant au stress hydrique que la chicorée et pourrait être cultivé sans irrigation. Notre étude semble toutefois suggérer qu'il devrait être possible de cultiver la chicorée dans conditions plus arides que celles de nos régions. Par exemple, si les sols disposent d'une bonne réserve en eau après l'hiver, une extension de la culture à des régions plus méridionales est envisageable. Si cela pourrait nécessiter une irrigation en début de culture afin que les plantes puissent germer, s'établir et aller chercher les réserves en eau du sol, cela rendrait possible l'allongement de la période végétative en première année de croissance et donc peut-être l'augmentation du rendement final. Chez nous, ce sont en effet les risques de gelées en mars et donc de vernalisation de la plante qui empêchent de semer les plantes

plus tôt. Les régions plus méridionales ne connaissant en général plus de gel en mars, il serait possible de semer les chicorées plus tôt. Cette stratégie est utilisée par des sociétés commerciales comme Orafti, qui cultive des plantes au Chili dans des régions beaucoup plus arides qu'en Belgique, tout en obtenant des rendements records et des degrés de polymérisation élevés : le problème essentiel constituerait en une difficulté d'extraction de l'inuline du fait d'une lignification partielle de la racine en situation de stress hydrique (Peter Guhl ; communication personnelle).

En conditions d'irrigation, une étude complémentaire serait cependant requise afin de préciser quelles sont les fréquences d'irrigation optimales. Outre les aspects liés au coût de l'irrigation en tant que telle, une approche de la physiologie de la plante pourrait également s'avérer nécessaire à cet égard : plusieurs études suggèrent en effet que des perturbations physiologiques peuvent se manifester lors des phases de réhydratation, alors qu'une plante qui a mis en place des stratégies d'adaptation à un manque d'eau se voit à nouveau confrontée à une modification de son environnement (Georgieva *et al.*, 2007 ; Gallé *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2010).

Une attention particulière devrait également être apportée aux conséquences possibles du stress thermique pour ces plantes. L'occurrence simultanée de hautes températures et d'une réduction de la disponibilité en eau place la plante dans une situation spécifique : il n'y a aucune preuve exhaustive que ce stress multiple implique, au sein de la plante, une simple addition des contraintes individuelles (Vile *et al.*, 2012). Enfin, il serait opportun d'analyser l'impact du statut hydrique sur l'alimentation minérale : il a été montré que l'alimentation en azote, en calcium et en phosphore pouvaient avoir une influence tout à fait déterminante sur les activités enzymatiques impliquées dans la synthèse d'inuline (Van den Ende *et al.*, 1999 ; Kusch *et al.*, 2009).

Une étude antérieure que nous avons réalisée en champ nous a permis de souligner l'importance des déplacements latéraux de l'eau à l'échelle de la parcelle (Vandoorne, 2007). Dans ces conditions, les plantes stressées ont montré une plus grande richesse en inuline compensant approximativement la perte de masse racinaire mesurée en conditions de sécheresse. Ceci confirme malgré tout que la plante est capable d'aller chercher de l'eau bien en profondeur car les 60 premiers centimètres de sol étaient fortement asséchés. Les mois d'août et septembre 2006 ayant été très humides, des flux latéraux sont sans doute venus réalimenter le substrat en profondeur. En conditions de champ, il semble donc qu'il faudrait une année extrême pour que le rendement soit sérieusement

affecté, comme ce fut le cas en 2003. Ceci peut paraître contradictoire avec nos conclusions des 3 premiers chapitres. Cependant, il est important de mentionner que la chicorée n'est en général pas cultivée sur du sable comme ce fut le cas au fil de nos expériences pour des raisons pratiques (facilite les mesures géophysiques et les manipulations, favorise l'apparition d'un stress,...), mais plutôt sur un substrat sablo-limoneux. Ce type de sol présente une réserve en eau utile plus importante qu'un substrat sableux si bien que la plante entre en général en stress bien après celles cultivées sur substrat sableux.

Une amélioration du dispositif expérimental en champ, en limitant encore plus les flux latéraux en profondeur et en utilisant les sondes calibrées dans le cadre des chapitres 2 et 3 permettrait d'affiner les résultats et de tester le bien fondé de l'irrigation. Au-delà de notre démarche expérimentale, une approche statistique permettant d'analyser, à grande échelle, les rendements obtenus chez les producteurs en fonction des stratégies de culture, pourrait s'avérer intéressante, même si la complexité de cette approche résulte du fait que de nombreux paramètres techniques peuvent varier selon les exploitants.

D'un point de vue morpho-physiologique, la plante dispose donc d'un certain nombre d'atouts. Des gènes codant pour des déshydrines ont par ailleurs été identifiés chez *C. intybus* et sont susceptibles d'être induits en situation de stress, peut être en relation avec une production d'ABA (Mingeot *et al.*, 2009). De même, la présence de polyphénols ayant une action anti-oxydante importante a récemment été mise en évidence chez cette espèce (Heimler *et al.*, 2009). Nous avons souligné d'autres atouts de cette espèce. Une démarche spécifique visant à la sélection de variétés appropriées, bien adaptées à des conditions d'approvisionnement en eau moins bien garanties, pourrait s'avérer utile. Du fait du mode de reproduction de la plante, les variétés disponibles commercialement sont des populations plus ou moins homogènes, et l'utilisation dans notre démarche expérimentale de lignées épurées n'est peut être pas à cet égard totalement représentative. Quoi qu'il en soit, des outils moléculaires deviennent disponibles (Dauchot *et al.*, 2009) et pourraient à l'avenir montrer une utilité dans une stratégie d'amélioration, pour peu que cette stratégie soit adaptée à un scénario réaliste d'épisodes de stress en champs (Tardieu, 2012). L'identification de paramètres physiologiques simples, directement corrélées à l'efficacité d'utilisation de l'eau, comme la discrimination isotopique du C, faciliterait par ailleurs l'efficacité des stratégies d'amélioration (Araus *et al.*, 2002).

Une autre information intéressante à tirer de nos expériences concerne la valorisation de terrains « marginaux » grâce à la culture de chicorée. Le chapitre 4 semble indiquer que la chicorée pourrait être implantée dans des sols pouvant s'engorger de temps à autres sans risquer de perturber le rendement final en inuline. Ceci est vrai en tous cas pour des sols légers et à conditions que les situations d'engorgement ne surviennent qu'à un stade relativement avancé dans le cycle de la plante. En effet, une condition d'hypoxie, voire d'anoxie, peu après le semis, au stade germination ou jeune plantule pourrait probablement avoir des effets bien plus dommageables que ceux que nous avons envisagés ici (Irfan *et al.*, 2010).

Un autre paramètre de la plante qui pourrait être amélioré et pour lequel nos recherches nous ont fourni quelques informations concerne la forme de la racine. L'expérience de flooding stress a en effet montré que la forme de la racine pouvait être fortement modifiée par les conditions d'environnement. En cas d'engorgement du substrat, la masse racinaire se concentre en effet dans les premiers centimètres du sol. Il pourrait être particulièrement intéressant d'étudier ce phénomène car avoir de telles racines en champ permettrait de limiter fortement les pertes à la récolte. La forme de la racine est incontestablement une propriété susceptible de conditionner le développement de la plante, en ce compris sa réponse au stress (Galvan-Ampudia et Testerink, 2011) mais également, pour la chicorée, l'efficacité des techniques de conditionnement du produit récolté.

Conclusions

Arrivés au terme de ce travail, nous pouvons conclure que, dans les conditions de stress appliquées au cours de nos expériences, la chicorée s'est montrée agronomiquement tolérante à l'engorgement de son substrat et au contraire sensible au manque d'eau. La chicorée pourrait souffrir de changements climatiques futurs, et son extension dans des régions arides nécessiterait vraisemblablement l'adoption de techniques d'irrigation dont il conviendrait d'apprécier la pertinence économique.

Il semble en effet que nos conclusions doivent être nuancées en ce qui concerne le manque d'eau. Nos expériences en grandes colonnes nous ont appris qu'un mécanisme de « compensation » de la prise d'eau peut intervenir chez la chicorée. Grâce à son système racinaire profond, le manque d'eau des horizons superficiels est compensé par des apports d'eau venant des horizons plus profonds. Nos expériences ont montré en outre que ce phénomène intervient avant la réduction de transpiration typiquement induite par la sécheresse. Dans des sols disposant d'une réserve en eau utile importante, même profonde, il est donc tout à fait possible que la chicorée tolère la sécheresse.

En couplant les techniques hydrogéophysiques mises au point au cours de ce travail à des mesures physiologiques de base telles que la transpiration, la conductance stomatique ou encore l'estimation de la masse racinaire, il sera possible à l'avenir de déterminer un profil de teneur en eau critique pour lequel la chicorée voit son rendement compromis. A partir de ce profil critique, il pourra être intéressant de construire différents scénarii de teneur en eau initiale du sol et de pluviométrie annuelle pouvant mener à une réduction de croissance et juger de la probabilité de ces scénarii à l'avenir. Afin de nous aider dans cette tâche, il serait intéressant de retourner vers des données historiques de rendement, couplées à des données météorologiques et de composition du sol.

En parallèle aux autres résultats obtenus au cours de cette thèse en termes de rendement en sucre, de longueur des chaînes d'inuline et d'activités enzymatiques, parvenir à déterminer le seuil de sensibilité de la plante à la sécheresse permettrait sans nul doute d'aider les agronomes et sélectionneurs à améliorer l'itinéraire technique de la plante.

Références

NB: The references for 'Chapitres' 1 to 4 have to be found at the end of these sections. References here under are for the 'Revue bibliographique' and 'Discussion'.

Abreu E.F.M. and F.J.L. Aragao. 2007. *Isolation and Characterization of a myo-inositol-1-phosphate Synthase Gene from Yellow Passion Fruit (Passiflora edulis f. flavicarpa) Expressed During Seed Development and Environmental Stress*. Annals of Botany, 99, p. 285-292.

Addicott, F.T. 1982. *Abscission*. University of California Press, Ltd. Berkeley and Los Angeles, California pp. 369.

Ahsan, N., Lee, D.-G., Lee, S.-H., Kang, K. Y., Bahk, J. D. & M.S. Choi. 2007. *A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress*. Physiologia Plantarum, 131, p. 555-570.

Ai, L., Li, Z.H., Xie, Z.X., Tian, X.L., Eneji, A.E. & L.S. Duan. 2008. *Coronatine alleviates polyethylene glycol-induced water stress in two rice (Oryza sativa L.) cultivars*. Journal of Agronomy and Crop Science, 194, p. 360-368.

Aimars, D., Calafat, M., Andrade, A.M., Carassay, L., Abdala, G.I. & M.L. Molas. 2011. *Drought Tolerance and Stress Hormones: From Model Organisms to Forage Crops*. In *Plants and Environment* (Chapter 6), Vasanthaian, H.K.N., Kambiranda, D. (eds), Intech., pp. 284.

Albrecht, G., Biemelt, S. & S. Baumgartner. 1997. *Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances*. New Phytologist, 136, pp. 137-144.

Albrecht, G., Mustroph, A. & T.C. Fox. 2004. *Sugar and fructan accumulation during metabolic adjustment between respiration and fermentation under low oxygen conditions in wheat roots*. Physiologia Plantarum, 120, pp. 93-105.

Améziane, R., Richard Molard, C., Deleens, E. 1997. *Nitrate (NO₃ - N - 15) limitation affects nitrogen partitioning between metabolic and storage sinks and nitrogen reserve accumulation in chicory (Cichorium intybus L.)*. Planta, 202, pp. 303-312.

- Angeles Nunez J. G.** 2008. Thèse de l'obtention de grade de docteur de l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement, *Etude de la saccharose synthase dans la graine d'Arabidopsis thaliana : localisation, régulations et fonctions*, Agro Paris Tech, p. 25-32.
- Blancard D., Lot H., Maisonneuve B.**, 2003, Maladies des salades : identifier, connaître et maîtriser, INRA, p. 8-10.
- Araus J.L., Slater G.A., Reynolds M.P. and C. Royo.** 2002. *Plant breeding and drought in C3 cereals: What should we breed for?* Annals of Botany, 89, p. 925-940.
- Araus J.L., Ferrio J.P., Buxó R. and J. Voltas.** 2007. *The historical perspective of dryland agriculture: Lessons learned from 10,000 years of wheat cultivation.* Journal of Experimental Botany, 58, p. 131-145.
- Aroca, R., Porcel, R. & J.M. Ruiz-Lozano.** 2012. *Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions.* Journal of Experimental Botany, 63(1), p. 43-57.
- Arya, L.M., Blake, G.R. & D.A. Farrell.** 1975a. *A field study of soil water depletion patterns in presence of growing soybean roots: II. Effect of plant growth on soil water pressure and water loss patterns.* Soil Science Society of America Journal, 39, pp. 430-436.
- Arya, L.M., Blake, G.R. & D.A. Farrell.** 1975b. *A field study of soil water depletion patterns in presence of growing soybean roots: III. Rooting characteristics and root extraction of soil water.* Soil Science Society of America Journal, 39, pp. 437-444.
- Bacelar E.A., Santos D.L., Moutinho-Pereira J.M., Lopes J.I., Gonçalves B.C., Ferreira T.C. & C.M. Correia.** 2007. *Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes.* Plant and Soil, 292, p. 1-12.
- Bailey-Serres J. and L.A.C.J. Voesenek.** 2010. *Life in balance: a signaling network controlling survival of flooding.* Current Opinion in Plant Biology, 13(5), p. 489-494.
- Bajguz A.** 2007. *Metabolism of brassinosteroids in plants.* Plant Physiology and Biochemistry, 45(2), 95–107.

- Bandurska, H. & A. Stroiński.** 2005. *The effect of salicylic acid on barley response to water deficit.* Acta Physiologiae Plantarum, 27, p. 379-386.
- Barbour M.M., Warren C.R., Farquhar G.D., Forrester G. and H. Brown.** 2010. *Variability in mesophyll conductance between barley genotypes, and effects on transpiration efficiency and carbon isotope discrimination.* Plant, Cell and Environment, 33, p. 1176-1185.
- Beckett RP, Mayaba N, Minibayeva FV and AJ Alyabyev.** 2005. *Hardening by partial dehydration and ABA increase desiccation tolerance in the cyanobacterial lichen Peltigera polydactylon.* Annals of Botany, 96, p. 109–115.
- Benlloch-González M, Arquero O, Fournier JM, Barranco D and M Benlloch.** 2008. *K⁺ starvation inhibits water-stress-induced stomatal closure.* Journal of Plant Physiology, 165, p. 623-630.
- Bernacchi C.J., Kimball B.A., Quarles D.R., Long S.P. and D.R. Ort.** 2007. *Decreases in Stomatal Conductance of Soybean under Open-Air Elevation of [CO₂] Are Closely Coupled with Decreases in Ecosystem Evapotranspiration.* Plant Physiology, 143(1), p. 134-144.
- Bertin, P.** 2006. BRAI 2203 Diversité génétique et amélioration végétale, UCL, transparents et cours.
- Bielders, C., Javaux, M.** 2006. BRES 2201 Irrigation, drainage et conservation des sols, partim B : conservation des sols, UCL, transparents.
- Binley, A., Cassiani, G., Middleton, R. & P. Winship.** 2002. *Vadose zone flow model parameterisation using cross-borehole radar and resistivity imaging.* Journal Of Hydrology, 267(3-4), p. 147-159.
- Blanke M.M. and D.T. Cooke.** 2004. *Effects of flooding and drought on stomatal activity, transpiration, photosynthesis, water potentia and water channel activity in strawberry stolons and leaves.* Plant Growth Regulation, 42, 153-160.
- Bloch D.A., Hoffmann C.M. and B. Märlander.** 2006. *Solute accumulation as a cause for quality losses in sugar beet submitted to continuous*

- and temporary drought stress*. Journal of Agronomy and Crop Science, 192(1), p. 17-24.
- Boulineau, F., Kelechian, V., Doré, C. & B. Desprez.** 1994. *Les chicorées*. Sauve qui peut, 6-7, p. 26-28.
- Bolouri-Moghaddam MR, Le Roy K, Rolland F, Van den Ende W.** 2010. *Sugar signalling and antioxidant network connectons in plant cells*. FEBS Journal, 277, 202-207
- Bouten, W. & P.E. Jansson.** 1995. *Water banlance of the Solling spurce stand as simulated with various forest-soil-atmosphere models*. Ecological Modelling, 83(1-2), p. 245-253.
- Boyer, J.S.** 1983. *Environmental stress and crop yields*. In Crop Reactions to Water and Temperature Stresses in Humid, Temperate Climates. (C.D. Raper, Jr. and P.J. Kramer, eds.). Boulder, Colorado, Westview Press, p. 3-7.
- Bray, E.A.** 2002. *Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of Arabidopsis genome*. Plant Cell and Environment, 25, p. 153-161.
- Cabrera-Bosquet L, Molero G, Bort J, Nogués S and JL Araus.** 2007. *The combined effect of constant water deficit and nitrogen supply on WUE, NUE and $\Delta^{13}C$ in durum wheat potted plants*. Annals of Applied Biology, 151, p. 277-289.
- Campbell, R.B., Bower, C.A. & L.A. Richards,** 1948. *Change of electrical conductivity with temperature and the relation of osmotic pressure to electrical conductivity and ion concentration for soil extracts*. Soil Sci. Soc. Proc. 66–69.
- Castañó, C.I., Demeulemeester, M.A.C., De Proft, M.P.** 1997. *Incompatibility reactions and genotypic identity status of five commercial chicory (Cichorium intybus L.) hybrids*. Scientia Horticulturae, 72, p. 1-9.
- Chavez M.M., Flexas J. and C. Pinheiro.** 2009. *Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell*. Annals of Botany, 103(4), p. 551-560.

- Chen J.H., Jiang H.W., Hsieh E.J., Chen H.Y., Chien C.T., Hsieh H.L. and T.P. Lin.** 2012. *Drought and Salt Stress Tolerance of an Arabidopsis Glutathione S-Transferase U17 Knockout Mutant Are Attributed to the Combined Effect of Glutathione and Abscissic Acid.* Plant Physiology, 158, p. 340-351.
- Chernyad'ev, I.I.** 2009. *The protective action of cytokinins on the photosynthetic machinery and productivity of plants under stress (review).* Applied Biochemistry and Microbiology, 45(4), p. 351-362.
- Chołuj D. , Karwowska R., Ciszewska A. and M. Jasińska.** 2008. *Influence of long-term drought stress on osmolyte accumulation in sugar beet (Beta vulgaris L.) plants.* Acta Physiologiae Plantarum, 30 (5), p. 679-687.
- Coleman, W.K.** 2008. *Evaluation of wild Solanum species for drought resistance. 1. Solanum gandarillasii Cardenas.* Environmental and Experimental Botany, 62(3), p. 221-230.
- Collin, S.** 2006. BRAL 2103 Chimie des denrées alimentaires, partim C : Constituants alimentaires majeurs, UCL, transparents.
- Colmer, T.D. & T.J. Flowers.** 2008. *Flooding tolerance in halophytes.* New Phytologist, 179, p. 964-974.
- Cooper, J.P.** 1963. *Species and population differences in climatic responses.* In Environmental Control of Plant Growth, (L.T. Evans, ed.), New-York, Academic Press, pp. 381-403.
- Cornelis, P.** 2003. *Guide de Bonnes Pratiques en Culture de Chicorée Industrielle,* pp. 52.
- Corwin, D.L.** 2005. *Characterizing soil spatial variability with apparent soil electrical conductivity: I Survey protocols.* Comp. Electron. Agric., 46, p. 103–133.
- Costa R.N.T., Vasconcelos J.P., de Silva L.A.D and R.L.L. Luiz.** 2008. *Effect of excess of water on sugarbeet yield components.* Horticultura Brasileira, 26, p. 74-77.
- Csiszár J., Gallé Á., Horváth E., Dancsó P., Gombos M., Váry Z., Erdei L., Györgyey J. and I. Tari.** 2012. *Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root*

segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. Plant Physiology and Biochemistry, 52, p. 119-129.

Dauchot N., Mingeot D., Purnelle B., Muys C., Watillon B., Boutry M. and P. Van Cutsem. 2009. *Construction of 12 EST libraries and characterization of a 12,226 EST dataset for chicory (Cichorium intybus) root, leaves and nodules in the context of carbohydrate metabolism investigation*. BMC Plant Biology, 9:14, p. 1-19.

De Roover, J., Vandenbranden, K., Van Laere, A., Van Den Ende, W. 2000. *Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose : sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (Cichorium intybus L.)*. Planta, 210, p. 808-814.

Debaeke, P. & M. Bertrand. 2008. *Evaluation des impacts de la sécheresse sur le rendement des grandes cultures en France*. Cahiers Agricultures, 17 (5), p. 437-443.

Dekoninck N. 2009. *Etude de l'influence d'un stress hydrique sur le développement physiologique et la prise d'eau chez la chicorée à inuline (Cichorium intybus var. sativum)*, Mémoire du diplôme de Bio-ingénieur en Sciences et Technologies de l'environnement, Louvain-La-Neuve : Université catholique de Louvain, p. 116.

Dello Ioio R, Linhares FS and S Sabatini. 2008. *Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation*. Current Opinion in Plant Biology, 11, p. 23-27.

Delpérée, C., Kinet, J.M. and S. Lutts. 2003. *Low irradiance modifies the effect of water stress on survival and growth-related parameters during the early developmental stages of buckwheat (Fagopyrum esculentum)*. Physiologia Plantarum, 119, p. 211-220.

Descy, F. 1^{er} décembre 2005. *Articles sur la chicorée, l'inuline et Warcoing Industrie*. In Le Courrier de l'Escaut – Hainaut Occidental, p. 21.

Desprez, B.F., Delesalle, L., Dhellemmes, C., Desprez, M.F., Rambaud, C. and Vasseur, J. 1999. *Genetics and breeding of industrial chicory, a historical review*. In Proceeding of the Eight Seminar on Inulin, 1-2 July 1999, Fuchs, A., ed (Lille, France), p. 1-10.

- Dorchies V and S. Rambour.** 1985. *Activité nitrate reductase chez Cichorium intybus (var. Witloof) à différents stades de développement et dans les tissus cultivés in vitro.* Physiologie Végétale, 23, p. 25 - 35.
- Doré, C. & F. Varoquaux.** 2006. *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées.* Paris: Institut National de la Recherche Agronomique.
- Doussan, C., Pierret, A., Garrigues, E. & L. Pagès.** 2006. *Water uptake by plant roots: II – Modelling of water transfer in the soil root-system with explicit account of flow within the root system – Comparison with experiments.* Plant and Soil, 283(1-2), p. 99-117.
- Draye, X., Kim, Y., Lobet, G. & M. Javaux.** 2010. *Model-assisted integration of physiological and environmental constraints affecting the dynamic and spatial patterns of root water uptake from soils.* Journal of Experimental Botany, 61, p. 2145-2155.
- Druart N., De Roover J., Van Den Ende W., Goupil P., Van Laere A. & S. Rambour.** 2001. *Sucrose assimilation during early developmental stages of chicory (Cichorium intybus L.) plants.* Planta 212: p. 436-443.
- Druege U.** 2006. Ethylene and plant response to abiotic stress. In: Ethylene Action in Plants, N.A. Khan (Ed). Springer Verlag, Heideklberg, pp. 206.
- Duan B., Yang Y., Lu Y., Korpelainen H., Berninger F. and C. Li.** 2007. *Interactions between water deficit, ABA, and provenances in Picea asperata.* Journal of Experimental Botany, 58(11), p. 3025-3036.
- Else M.A., Janowiak F., Atkinson C.J. & M.B. Jackson.** 2008. *Root signals and stomatal closure in relation to photosynthesis, chlorophyll a fluorescence and adventitious rooting of flooded tomato plants.* Annals of Botany, 103: 313-323.
- Fang X, Turner NC, Yan G, Li F and K.H.M. Siddique.** 2010. *Flower numbers, pod production, pollen viability, and pistil function are reduced and flower and pod abortion increased in chickpea (Cicer arietinum L.) under terminal drought.* Journal of Experimental Botany, 61, p. 335–345.

- Farrant JM and JP Moore.** 2011. *Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants*. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, p. 340–345.
- Farrar J., Pollock C. and Gallagher J.** 2000. *Sucrose and the integration of metabolism in vascular plants*. *Plant Science*, 154, p. 1-11.
- Fereres E. and M.A. Soriano.** 2007. *Integrated Approaches to Sustain and Improve Plant Production under Drought Stress*. *Journal of Experimental Botany*, 58(2), p. 147–159.
- Flexas, J., Escalona, J.M. & Medrano, H.** 1999. *Water stress induces different levels of photosynthesis and electron transport rate regulation in grapevines*. *Plant, Cell and Environment*, 22, p. 39-48.
- Flexas, J., Bota, J., Galmès, J., Medrano, H. & M. Ribas-Carbo.** 2006. *Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: Responses of photosynthesis and respiration to water stress*. *Physiologia Plantarum*, 127(3), p. 343-352.
- François, I.M., Marien, E. & K. Brijs.** 2009. *The use of Vis/NIR spectroscopy to predict the optimal root harvesting date of chicory (Cichorium intybus L.)*. *Postharvest Biology and Technology*, 53, p. 77-83.
- Fresneau C., Ghashghaie J. & G. Cornic.** 2007. *Drought effect on nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase in wheat (Triticum durum L.): role of leaf internal CO₂*. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), p. 2983-2992.
- Gagneul D., Aïnouche A., Duhaze C., Lugan R., Larher F.R. and A. Bouchereau.** 2007. *A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic Plumbaginaceae Limonium latifolium*. *Plant Physiology* 144(3), p. 1598-1611.
- Galle A, Haldimann P and U Feller.** 2007. *Photosynthetic performance and water relations in young pubescent oak (Quercus pubescens) trees during drought stress and recovery*. *New Phytologist*, 174, p. 799-810.
- Galmes J, Abadia A, Cifre J, Medrano H and J. Flexas.** 2007. *Photoprotection processes under water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits*. *Physiologia Plantarum*, 130, p. 495–510.

- Galmes J., Flexas J., Save R. and H. Medrano.** 2009. *Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery.* Plant and Soil, 290, p. 139-155.
- Galvan-Ampudia C.S. and C. Testerink.** 2011. *Salt stress signals shape the plant root.* Current Opinion in Plant Biology, 14(3), p. 296-302.
- Gao, X.P., Wang, X.F., Lu, Y.F., Zhang, L.Y., Shen, Y.Y., Liang, Z. & D.P. Zhang.** 2004. *Jasmonic acid is involved in the water-stress-induced betaine accumulation in pear leaves plant.* Plant Cell and Environment, 27, p. 497-507.
- Gharbi I, Ricard B, Rolin D, Maucourt M, Andrieu MH, Bizid E, Smiti S and R Brouquisse.** 2007. *Effect of hexokinase activity on tomato root metabolism during prolonged hypoxia.* Plant, Cell and Environment, 30, p. 508-517.
- Georgieva K., Szigeti Z., Sarvari E., Gaspar L., Maslenkova L., Peeva V., Peli E. & Z. Tuba.** 2007. *Photosynthetic activity of homoiochlorophyllous desiccation tolerant plant Haberlea rhodopensis during dehydration and rehydration.* Planta, 225, p. 955-964.
- Gibson, G. & M. Roberfroid.** 1995. *Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.* The journal of nutrition, p. 1401-1412.
- Gill S.S. and N. Tuteja.** 2010. *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants.* Plant Physiology and Biochemistry, 48(12), p. 909–930.
- Gimeno V., Syvertsen J.P., Simón I., Nieves M., Díaz-López L., Martínez V. and F. Garcia-Sanchez.** 2012. *Physiological and morphological responses to flooding with fresh or saline water in Jatropha Curcas.* Environmental and Experimental Botany, 78, p. 47-55.
- Gladish D.K., Xu J., Niki T.** 2006. *Apoptosis-like programmed cell death occurs in procambium and ground meristem of pea (Pisum sativum) root tips exposed to sudden flooding.* Annals of Botany, 97: 895-902.

- Glaz B., Morris D. R. and S.H. Daroub.** 2004. *Sugarcane photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance due to flooding and water table.* Crop Science, 44, p. 1633-1641.
- Gong, D., Kang, S., Zhang, L., Du, T. & L. Yao.** 2006. *Two-dimensional model of root water uptake for single apple trees and its verification with sap flow and soil water content measurements.* Agricultural Water Management, 83: 119-129.
- Gonzalez MC and FJ Cejudo.** 2007. *Gibberellin-regulated expression of neutral and vacuolar invertase genes in petioles of sugar beet plants.* Plant Science, 172, p. 839-846.
- Grossmann K. & H. Hansen.** 2001. *Ethylene-triggered abscisic acid: a principle in plant growth regulation?* Physiologia Plantarum, 113, p. 9-14.
- Guidi L. & G.F. Soldatini.** 1997. *Chlorophyll fluorescence and gas exchanges in flooded soybean and sunflower plants.* Plant Physiology and Biochemistry, 35: 713-717.
- Günther T., Rücker C. & K. Spitzer.** 2006. *Three-dimensional modelling and inversion of dc resistivity data incorporating topography : II. Inversion.* Geophys. J. Int., 166, p. 506-517.
- Guo W., Li B., Zhang X. & R. Wang.** 2007. *Architectural plasticity and growth responses of Hippophae rhamnoides and Caragana intermedia seedlings to stimulated water stress.* Journal of Arid Environment 69: 385-399.
- Hansen H and K Dörffling.** 1999. *Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants.* Journal of Experimental Botany, 50, p. 1599–1605.
- Hanson R.L.** 1991. *Evapotranspiration and Droughts*, in **Paulson R.W., Chase E.B., Roberts R.S. and D.W. Moody.** Compilers, National Water Summary 1988-89--Hydrologic Events and Floods and Droughts: U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2375, p. 99-104.
- Hassani A., Dellal A., Belkhogja M. and M. Kaid-Harache.** 2008. *Effet de la salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (Hordeum Vulgare).* European Journal of Scientific Research, 23(1), p. 61-69.

- Haupt-Herting S. & H.P. Fock.** 2002. *Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis*. Annals of Botany, 89, p. 851-859.
- Heil A. and T. Schmülling.** 2003. *Cytokinin signal perception and transduction*. Current Opinion in Plant Biology, 6, p. 480-488.
- Heimler D., Isolani L., Vignolini P. and A. Romani.** 2009. *Polyphenol content and antiradical activity of Cichorium intybus L. from biodynamic and conventional farming*. Food Chemistry, 114, p. 765-770.
- Hendry G.** 1993. *Evolutionary origins and natural functions of fructans. A climatological, biogeographic and mechanistic appraisal*. New Phytologist, 123, p. 3-14.
- Henry, M.** 1995. La chicorée à inuline, à café, witloof, pp. 21.
- Hidaka H., Hirayama M. & K. Yamada.** 1991. *Fructooligosaccharides: enzymatic preparation and biofunctions*. Journal of Carbohydrate Chemistry, 10, p. 509-522.
- Hitchcock C. L. & A. Cronquist.** 1973. *Flora of the Pacific Northwest*, University of Washington press, Seattle.
- Hoffmann C.M.** 2010. *Sucrose accumulation in sugar beet under drought stress*. Journal of Agronomy and Crop Science, 196(4), p. 243-252.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A. & J. Buitink.** 2001. *Mechanisms of plant desiccation tolerance*. Trends in Plant Science, 6, p. 431-438.
- Horchani F., Gallusci P., Baldet P., Cabasson C., Maucourt M., Rolin D., Aschi-smiti S. & P. Raymond.** 2008. *Prolonged root hypoxia induces ammonium accumulation and decreases the nutritional quality of tomato fruits*. Journal of Plant Physiology, 165: p. 1352-1359.
- Hossain Z., Lopez-Climent M.F., Arbona V., Perez-Clemente R.M. & A. Gomez-Cadenas.** 2009. *Modulation of the antioxidant system in citrus under waterlogging and subsequent drainage*. Journal of Plant Physiology, 166, p. 1391-1404.

- Huber JL, Hite DRC, Outlaw WH and SC Huber.** 1991. *Inactivation of highly activated spinach leaf Sucrose Phosphate Synthase by dephosphorylation.* Plant Physiology, 95, p. 291-297.
- Huisman J.A., Lin C.P., Weihermüller L. & H. Vereecken.** 2008. *Accuracy of bulk electrical conductivity measurements with Time Domain Reflectometry.* Vadose Zone Journal, 7(2), p. 426-433.
- Hupet, F. & M. Vanclooster.** 2002. *Intraseasonal dynamics of soil moisture variability within a small agricultural maize cropped field.* Journal Of Hydrology 261(1-4), p. 86-101.
- Hurd, E.A.** 1974. *Phenotype and drought tolerance in wheat.* Agricultural Meteorology, 14, p. 39-55.
- Irfan M, Hayat S, Hayat Q, Afroz S, Ahmad A.** 2010. *Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging.* Protoplasma 241: 13-17.
- IPCC, Fourth Assessment Report, Synthesis Report.** 2007. *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Core Writing Team, Pachauri, R.K. and Reisinger, A. (Eds.) IPCC, Geneva, Switzerland, pp 104.
- Jackson M.B. & R. Ricard.** 2003. *Physiology, biochemistry and molecular biology of plant root systems subjected to flooding of the soil.* In Root ecology, H. de Kroon and E. J. W. Visser [eds.], Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Jackson M.B. & T.D. Colmer.** 2005. *Response and adaptation by plants to flooding stress.* Annals of Botany, 96: 501-505.
- Jackson M.B.** 2008. *Ethylene-promoted elongation: an adaptation to submergence stress.* Annals of Botany, 101: 229-248.
- Jackson M.B., Ishizawa K. & O. Ito.** 2009. *Evolution and mechanisms of plant tolerance to flooding stress.* Annals of Botany, 103: 137-142.
- Janz, T.C. & R.J. Stonier.** 1995. *Modeling water flow in cropped soils: water uptake by plant roots.* Environement International, 21(5): 705-709.

- Jarvis, N.J.**, 1989. *A simple empirical-model of root water-uptake*. Journal of Hydrology 107, p. 57-72.
- Javaux, M., Schroeder, T., Vanderborght, J. & H. Vereecken.** 2008. *Use of a three-dimensional detailed modelling approach for predicting root water uptake*. Vadose Zone Journal 7, p. 1079–1088.
- Jayasekera G.A.U., Reid D.M. & E.C. Yeung.** 1989. *Fates of ethanol produced during flooding of sunflower roots*. Canadian Journal of Botany, 68: 2408-2414.
- Jia W. and W.J. Davies.** 2007. *Modification of Leaf Apoplastic pH in Relation to Stomatal Sensitivity to Root-Sourced Abscissic Acid Signals*. Plant Physiology, 143(1), p. 68-77.
- Kara Y. & M. Zoghmar.** 2011. *Etude des caractéristiques racinaires, du statut hydrique et ajustement osmotique de quelques génotypes de blés durs et d'espèces sauvages apparentées : intérêt potentiel de ces variétés pour l'amélioration de la production*. European Journal of scientific research, 48(3), p. 434-445.
- Kaur N. & A.K. Gupta.** 2002. *Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition*. Journal of Bioscience, 27, p. 703-714.
- Kawaguchi R., Girke T., Bray E. & J. Bailey-Serres.** 2004. *Differential mRNA translation contributes to genes regulation under non-stress and dehydration stress conditions in Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 38, p. 823-839.
- Kinet, J.M. & Lutts, S.** 1998. *Les effets des stress sur la croissance et le développement: vue synoptique*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 67, p. 117-136.
- Kinet, J.M. & Lutts, S.** 2003. BIO 1241 Compléments de biologie végétale, UCL, transparents.
- Kizis D. & M. Pagès.** 2002. *Maize DRE-binding proteins DBF1 and DBF2 are involved in rab17 regulation through the drought-responsive element in an ABA-dependent pathway*. Plant Journal, 30, p. 679-689.
- Klotz K.L. and D.M. Haagensohn.** 2008. *Wounding, anoxia and cold induce sugarbeet sucrose synthase transcriptional changes that are*

- unrelated to protein expression and activity*. Journal of Plant Physiology, 165(4), p. 423-434.
- Kondo S., Sugaya S., Sugawa S., Ninomiya M., Kittikorn M., Okawa K., Ohara H., Ueno K., Todoroki Y., Mizutani M. and N. Hirai.** 2012. *Dehydration tolerance in apple seedlings is affected by an inhibitor of ABA 8'-hydroxylase CYP707A*. Journal of Plant Physiology, 169(3), p. 234-241.
- Kotchoni S.O., Kuhns C., Ditzer A., Kirch H.H. & D. Bartels.** 2006. *Over-expression of aldehyde dehydrogenase genes in Arabidopsis thaliana confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress*. Plant Cell Environment, 29, p. 1033-1048.
- Koumanov, K. S., Hopmans, J.W. & L. W. Schwankl.** 2006. *Spatial and temporal distribution of root water uptake of an almond tree under microsprinkler irrigation*. Irrigation Science 24(4), p. 267-278.
- Kramer, P. J.** 1983. *Water relations of plants*. New-York, Academic Press.
- Kramer, P. J. & J.S. Boyer.** 1995. *Water relations of plants and soils*. Academic Press Inc.
- Kudoyarova, G., Veselova, S., Hartung, W., Farhutdinov, R., Veselov, D. & G. Sharipova.** 2011. *Involvement of root ABA and hydraulic conductivity in the control of water relations in wheat plants exposed to increased evaporative demand*. Planta, 233(1), p. 87-94.
- Kumutha D., Ezhilmathi K., Sairam R.K., Srivastava G.C., Deshmukh P.S. and R.C. Meena.** 2009. *Waterlogging induced oxidative stress and antioxidant activity in pigeonpea genotypes*. Biologia Plantarum, 53(1), p. 75-84.
- Kusch, U., Greiner, S., Steininger, H., Meyer, A.D., Corbière-Diviale, H., Harms, K. & T. Rausch.** 2009. *Dissecting the regulation of fructan metabolism in chicory (Cichorium intybus) hairy roots*. New Phytologist, 184(1), p. 127-140.
- Lafitte H.R., Yongsheng G., Yan S. & Z.K. Li.** 2006. *Whole plant responses, key processes, and adaptation to drought stress: the case of rice*. Journal of Experimental Botany, 58, p. 169-175.

- Le Roy K., Verhaest M., Rabijns A., Clerens S., Van Laere A. & W. Van Den Ende.** 2007. *N-glycosylation affects substrate specificity of chicory fructan 1-exohydrolase : evidence for the presence of an inulin binding cleft.* New Phytologist, 176: 317-324.
- Lee, S.H. & D.M. Reid.** 1997. *The role of endogenous ethylene in the expansion of Helianthus annuus leaves.* Canadian Journal of Botany, 75, p. 501-508.
- Lee B.R., Kim K.Y., Jung W.J., Avice J.C., Ourry A. & T.H. Kim.** 2007. *Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (Trifolium repens L.).* Journal of Experimental Botany, 58, p. 1271-1279.
- Lee H.L.** 2009. *The impact of climate change on global food supply and demand, food prices, and land use.* Paddy Water Environment, 7, p. 321-331.
- Lefèvre, I.** 2007. *Investigation of three Mediterranean plant species suspected to accululate and tolerate high cadmium and zinc levels: Morphological, physiological and biochemical characterisation under controlled conditions.* Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale. Louvain-la-Neuve (Belgium), Université catholique de Louvain: 427.
- Leroux, M.** 1995. *Les variétés de chicorée industrielle face aux exigences de qualité du marché.* p. 69-82.
- Li Y., Wang Z., Xu T., Tu W., Liu C., Zhang Y. and Yang C.** 2010. *Reorganization of photosystem II is involved in the rapid photosynthetic recovery of desert moss Syntrichia caninervis upon rehydration.* Journal of Plant Physiology, 167, p. 1390-1397.
- Liao C-T. & C.H. Lin.** 2001. *Physiological adaptation of crop plants to flooding stress.* Proceedings of the National Science Council, 25: 148-157.
- Limani A., Roux L., Laviile J and Y. Roux.** 1993. *Dynamics of nitrogen compounds in the chicory (Cichorium intybus L.) tuberised tap root during season and cold storage period.* Plant Physiology, 106, p. 477-484.

- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. & K. Shinozaki.** 1998. *Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an AREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis.* Plant Cell, 10, p. 1391-1406.
- Loewus F.A. and P.P.N. Murthy.** 2000. *myo-Inositol metabolism in plants.* Plant Science, 150(1), p. 1-19.
- Lü B., Gong Z., Wang J., Zhang J. and J. Liang.** 2007. *Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in Zea mays roots.* Journal of Experimental Botany, 58(10), p. 2565-2572.
- Lutts, S., Bertin, P., & J.F. Ledent.** 2006. *Cours de physiologie végétale.* Louvain-La-Neuve: Université catholique de Louvain.
- Lutts, S. & Batoko, H.** 2007. BIOL 2281 Interactions des plantes avec l'environnement, UCL, transparents.
- Lycops, N.** 2012. Mémoire du diplôme de Bachelier en chimie. *Impact des facteurs de l'environnement sur l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'inuline chez la chicorée industrielle (Cichorium intybus L. var sativum).* Louvain-La-Neuve : Institut Paul Lambin, p 46.
- Lynch, JP and J. Deikman.** 1998. *Phosphorous in Plant Biology: Regulatory Roles in Molecular, Cellular, Organismic and Ecosystem Processes.* ASPP, Rockville, MD.
- Lynch, JP.** 2007. *Roots of the second revolution.* Australian Journal of Botany, 55, p. 493-512.
- Marschner, H.** 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, second edition, Academic Press, pp. 889.
- Martin, A.** 2008. *ALIMENTATION Aliments: Classification et typologie.* Consulté le 31 mai 2009 sur Encyclopaedia Universalis. Références bibliographiques 116.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T. & V. Santoni.** 2008. *Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions.* Annual Review of Plant Biology, 59, p. 595-624.

- Mahouachi J, Argamasilla R and A. Gómez-Cadenas.** 2011. *Influence of exogenous glycine betaine and abscisic acid on papaya in responses to water-deficit stress.* Journal of Plant Growth Regulation, 31, p. 1-10.
- Martinelli T, Whittaker A, Bochicchio A, Vazzana C, Suzuki A and C. Masclaux-Daubresse.** 2007. *Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the resurrection plant *Sporobolus stapfianus*. A comparison between desiccation-tolerant and dessication-sensitive leaves.* Journal of Experimental Botany, 58, p. 3037-3046.
- Maxwell, K. & Johnson, J.N.** 2000. *Chlorophyll fluorescence – a practical guide.* Journal of Experimental Botany, 51, p. 659-668.
- Meurens, M.** 2006. BRAL 2201 Technologies alimentaires, partim : Transformation des productions agricoles, UCL, transparents.
- Minet, J.** 2011. *High-resolution soil moisture mapping by a proximal ground penetrating radar: A numerical, laboratory and field evaluation.* Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale. Louvain-la-Neuve (Belgium), Université catholique de Louvain: pp. 195.
- Mingeot D, Dauchot N, Van Cutsem P, Watillon B.** 2009. *Characterisation of two cold induced dehydrin genes from *Cichorium intybus* L.* Molecular Biology Reports 36, p. 1995-2001.
- Mogensen V.O., Jensen C.R., Mortensen G., Andersen M.N., Schoerring J.K., THage J.H. and J. Koribidis.** 1997. *Pod photosynthesis and drought adaptation of field grown rape (*Brassica napus* L.).* European Journal of Agronomy, 6(3-4), p. 295-307.
- Monreal J.A., Jiménez E.T., Remesal E., Morillo-Velarde R., Garcia-Maurino S. & C. Echevarria.** 2007. *Proline content of sugar beet storage roots: response to water deficit and nitrogen fertilization at field conditions.* Environmental and Experimental Botany, 60, p. 257-267.
- Monti, A., Amaducci, M.T., Pritoni G. and G. Venturi.** 2005. *Growth, fructan yield, and quality of chicory (*Cichorium intybus* L.) as related*

to photosynthetic capacity, harvest time, and water regime. Journal of Experimental Botany, 56, p. 1389-1395.

Monti, A., Brugnoli, E.B., Scartazza A.B. and M.T. Amaducci. 2006. *GTHe effect of transient and continuous drought on yield, photosynthesis and carbon isotope discrimination in sugar beet (Beta vulgaris L.). Journal of Experimental Botany*, 57(6), p. 1253-1262.

Moore, J.P., Vitré-Gibouin, M., Farrant, J.M. & A. Driouich. 2008. *Adaptation of higher plant cell walls to water loss: drought vs dessication. Physiologia Plantarum*, 134, p. 237-245.

Morgan J.M. 1983. *Osmoregulation as a selection criterion for drought tolerance in wheat. Australian Journal of Agricultural Research*, 34, p. 607-6114.

Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M. & Y. Gibon. 2011. *Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. Journal of Experimental Botany*, 62, p. 1715-1729.

Munné-Bosch S. & P. Lalueza. 2007. *Age-related changes in oxidative stress markers and abscisic acid levels in a drought-tolerant shrub, Cistus clusii grown under Mediterranean field conditions. Planta*, 225, p. 1039-1049.

Nebdal, L. and Whitmarsh, J. 2004. Chlorophyll Fluorescence Imaging of Leaves and Fruits. In *Chlorophyll a Fluorescence; A Signature of Photosynthesis*. George C. Papageorgiou and Govongjee (Eds). (The Netherlands: Springer), p. 389-407.

Nelson, P.N., Banabas, M., Scotter, D.R. & M.J. Webb, 2006. *Using soil water depletion to measure spatial distribution of root activity in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.) plantations. Plant and Soil*, 286, p. 109-121.

Neumann P.M. 2008. *Coping Mechanisms for Crop Plants in Drought-prone Environments. Annals of Botany*, 101(7), p. 901-907.

Nishiyama R., Watanabe Y., Fujita Y., Le D.T., Kojima M., Werner T., Vankova R., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., Kakimoto T., Sakakibara H., Schmölling T. and L.S. Tran. 2011. *Analysis of cytokinin*

mutants and regulation of cytokinin metabolic genes reveals important regulatory roles of cytokinins in drought, salt and abscisic acid responses, and abscisic acid biosynthesis. Plant Cell, 23, p. 2169-2183.

Niness, K. R. 1999. *Inulin and oligofructose: What are they?* The journal of nutrition, p. 1402-1406.

Nnyamah, J.U. & T.A. Black. 1977. *Rates and patterns of water uptake in a Douglas-fir forest.* Soil Science Society of America Journal, 41, pp. 972-979.

Ober ES and MC Luterbacher.2002. *Genotypic variation for drought tolerance in Beta vulgaris.* Annals of Botany, 89, p. 917–924.

Ober ES and A Rajabi. 2010. *GAbiotic Stress in Sugar Beet.* Sugar Tech, 12(3-4), p. 294-298.

Parent B, Conejero G and F Tardieu. 2009. *Spatial and temporal analysis of non-steady elongation of rice leaves.* Plant Cell and Environment, 32, p. 1561-1572.

Parry, M.A., Andralojc, P.J., Khan, S., Lea, P.J. & A.J. Keys. 2002. *Rubisco activity: effects of drought stress.* Annals of Botany, 89, p. 833-839.

Palta J.A., Turner N.C. and R.J. French. 2004. *The yield performance of lupin genotypes under terminal drought in a Mediterranean-type environment.* Australian Journal of Agricultural Research, 55(4), p. 449-459.

Parry M.L., Rosenzweig C., Iglesias A., Livermore M. & G. Fischer. 2004. *Effects of climate change on global food production under SRES emissions and socio-economic scenarios.* Global Environmental Change, 14, p. 53-67.

Passioura J. 2007. *The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives.* Journal of Experimental Botany, 58, p. 113-117.

Paulet, P. 1985. *Cichorium intybus and C. endivia.* In Handbook of flowering. Vol. II, Halevy, A.H., ed (Boca Raton: CRC Press), p. 265-277.

- Peleg Z. and E. Blumwald.** 2011. *Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants*. Current Opinion in Plant Biology, 14, p. 290-295.
- Peng, X.X. & M. Yamauchi.** 1993. *Ethylene production in rice bronzing leaves induced by ferrous iron*. Plant and Soil, 149(2), p. 227-234.
- Peng, H.P., Chan, C.S., Shih, M.C. & S.F. Yang.** 2001. *Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis*. Plant Physiology, 126, p. 742-749.
- Peters S., Mundree S.G., Thomson J.A., Farrant J.M., Keller F.** 2007. *Protection mechanisms in the resurrection plant Xerophyta viscose (Baker): both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit*. Journal of Experimental Botany, 58(8), p. 1947-1956.
- Pinheiro H.A., Damatta F.M., Chaves, A.R.M., Loureiro M. and C. Ducatti.** 2005. *Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of Coffea canephora*. Annals of Botany, 96(1), p. 101-108.
- Poroyko V., Spollen W.G., Hejlek L.G., Hernandez A.G., LeNoble M.E., Davis G., Nguyen H.T., Springer G.K., Sharp R.E. & H.J. Bohnert.** 2007. *Comparing regional transcript profiles from maize primary roots under well-watered and low water potential conditions*. Journal of Experimental Botany, 58, p. 279-289.
- Pou A., Flexas J., Alsina, Bota J., Carambula C., De Herralde F., Galmés J., Lovisolo C., Jiménez M., Ribas-Carbó M., Rusjan D., Secchi F., Tomàs M., Zsófi Z. and H. Medrano.** 2008. *Adjustments of water use efficiency by stomatal regulation during drought and recovery in the drought-adapted Vitis hybrid Richter-110 (V. berlandieri × V. rupestris)*. Physiologia Plantarum, 134(2), p. 313-323.
- Puebla A.F., Salerno G.L. & H.G. Pontis.** 1997. *Fructan metabolism in two species of Bromus subjected to chilling and water stress*. New Phytologist, 136; p. 123-129.
- Raghavendra A.S., Gonugunta V.K., Christmann A. and E. Grill.** 2010. *ABA perception and signalling*. Trends Plant Sci., 15(7), 395-401.

- Raymond M.J. and N.Smirnoff.** 2002. *Proline Metabolism and Transport in Maize Seedlings at Low Water Potential*. Annals of Botany, 89(7), p. 813-823.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., Vivekanadan, M.** 2004. *Drought-induces responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants*. Journal of Plant Physiology, 161, p. 1189-1202.
- Reitz, L.P.** 1974. *Breeding for more efficient water use – is it real or a mirage?* Agricultural Meteorology, 14, p. 3-11.
- Ritsema , T. & Smeekens, F.** 2003. *Fructans: beneficial for plants and humans*. Current Opinion in Plant Biology, 6, p. 223-230.
- Rivero R.M., Shulaev V. and E. Blumwald.** 2009. *Cytokinin-Dependent Photorespiration and the Protection of Photosynthesis during Water Deficit*. Plant Physiology, 150(3), p. 1530-1540.
- Roberfroid, M.B., Delzenne, N.M.** 1998. *Dietary fructans*. Annu. Rev. Nutr., 18, p. 117-143.
- Roberfroid, M. B.** 1999. *Caloric value of inulin and oligofructose*. The journal of nutrition, p. 1436-1437.
- Roberfroid, M. B.** 2007. *Inulin-type fructans: Functional food ingredients*. The journal of nutrition, p. 2493-2502.
- Robinson, D. A., Jones, S.B., Wraith, J.M., Or, D. & S. P. Friedman.** 2003. *A review of advances in dielectric and electrical conductivity measurement in soils using time domain reflectometry*. Vadose Zone Journal 2(4), p. 444 - 475.
- Rouhi V., Samson R., Lemeur R. & P. Van Damme.** 2007. *Photosynthetic gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery*. Environmental and Experimental Botany, 59, p. 117-129.
- Ruysschaert, G., Poesen, J., Verstraeten, G., Govers, G.** 2004. *Soil loss due to crop harvesting: significance and determining factors*. Progress in Physical Geography, 28, p. 467-501.

- Sairam R.K., Kumutha D., Ezhilmathi K., Deshmukh P.S. & G.C. Srivastava.** 2008. *Physiology and biochemistry of waterlogging tolerance in plants*. *Biologia Plantarum*, 52: 401-412.
- Sauter A. and W. Hartung.** 2000. *Radial transport of abscisic acid conjugates in maize roots: its implication for long-distance stress signals*. *Journal of Experimental Botany*, 51, p. 929-935.
- Schachtman D.P. and J.Q.D. Goodger.** 2008. *Chemical root to shoot signaling under drought*. *Trends in Plant Science*, 13, p. 281-287.
- Schittenhelm, S.** 1999. *Agronomic Performance of Root Chicory, Jerusalem Artichoke, and Sugarbeet in Stress and Nonstress Environments*. *Crop Sci*, 39, p. 1815-1823.
- Schittenhelm, S.** 2001. *Effect of sowing date on the performance of root chicory*. *European Journal of Agronomy*, 15, p. 209-220.
- Schneider S.** 2009. *Estimation des paramètres hydrodynamiques des sols à partir d'une inversion jointe de données d'infiltration et de résistivité électrique*. Université Paris-Sud 11. Paris (France), pp 142.
- Schneider, C.L., Attinger, S., Delfs, J.O. & A. Hildebrandt.** 2010. *Implementing small scale processes at the soil-plant interface – the role of root architectures for calculating root water uptake profiles*. *Hydrology and Earth System Sciences*, 14, p. 279-289.
- Serraj R. and T.R. Sinclair.** 2002. *Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions*. *Plant, Cell and Environment*, 25(2), p. 333-341.
- Setter, T.L. & I. Waters.** 2003. *Review of prospects for germplasm improvement for waterlogging tolerance in wheat, barley and oats*. *Plant and Soil*, 253, p. 1-34.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A. & Zhao, C.X.** 2008. *Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants*. *Plant Biology and Pathology*, 331, p. 215-225.
- Shatil-Cohen A., Attia Z. and M. Moshelion.** 2011. *Bundle-sheath cell regulation of xylem-mesophyll water transport via aquaporins under*

- drought stress: a target of xylem borne ABA?* The Plant Journal, 67(1), 72-80.
- Sharp, R. E. & W. J. Davies.** 1985. *Root growth and water uptake by maize plants in drying soil.* Journal of Experimental Botany 36(9), p. 1441-1456.
- Shinozaki K. & K. Yamaguchi-Shinozaki.** 2007. *Genes networks involved in drought stress response and tolerance.* Journal of Experimental Botany, 58, p. 221-227.
- Shisanya C.A. & B. Hornetz.** 1997. *Phenological and physiological evaluation of the potential of Tohono O'odham Z16 maize as a new crop for the semi-arid areas of SE-Kenya.* Journal of Agriculture in the Tropics and Subtropics, 98(1), p. 95-109.
- Simova-Stoilova L., Demirevska K., Kingston-Smith A. and U. Feller.** 2012. *Involvement of the leaf antioxidant system in the response to soil flooding in two Trifolium genotypes differing in their tolerance to waterlogging.* Plant Science, 183, 43-49.
- Simunek J. & J.W. Hopmans,** 2009. *Modeling compensated root water and nutrient uptake.* Ecological Modelling 220, p. 505-521.
- Skinner, R.H., Gustine, D.L. & Sanderson, M.A.** 2004. *Growth, Water Relations, and Nutritive Value of Pasture Species Mixture under Moisture Stress.* Crop Sci., 44, p. 1361-1369.
- Skirycz, A. & D. Inzé.** 2010. *More from less: plant growth under limited water.* Current Opinion in Biotechnology, 21, p. 197-203.
- Steudle E.** 2000. *Water uptake by roots: effects of water deficit.* Journal of Experimental Botany, 51, p. 1531-1542.
- Stevens, C.V., Meriggi, A., Booten, K.** 2001. *Reviews: Chemical Modification of Inulin, a Valuable Renewable Resource, and Its Industrial Applications.* Biomacromolecules, 2, p. 1-16.
- Stoimenova M., Hänsch R., Mendel R., Gimmler H. and W.M. Kaiser.** 2003. *The roles of nitrate reduction in the anoxic metabolism of roots I. Characterization of root morphology and normoxic metabolism of*

wild type tobacco and a transformant lacking root nitrate reductase. *Plant and Soil*, 253, p. 145-153.

Taiz, L., Zeiger, E. 2006. *Plant physiology*, fourth edition, Sinauer, pp. 764.

Tardieu F. 2012. *Any trait or trait-related allele can confer drought tolerance: just design the right drought scenario*. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), p. 25-31.

Tardieu F., Granier C. and B. Muller. 2011. *Water deficit and growth. Co-ordination processes without an orchestrator*. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), p. 283-289.

Toldi O., Tuba, Z. and P. Scott. 2009. *Vegetative dessication tolerance: Is it a goldmine for bioengineering crops?* *Plant Science*, 176, p. 187-199.

Topp G.C. 1980. *Electromagnetic determination of soil water content: Measurements in coaxial transmission lines*. *Water resources research*, 16, p. 574-582.

Turner N.C., Abbo S., Berger J.D., Chaturvedi S.K., French R.J., Ludwig C., Mannur D.M., Singh S.J. & H.S. Yadave. 2007. *Osmotic adjustment in chickpea (Cicer arietinum L.) results in no yield benefit under terminal drought*. *Journal of Experimental Botany*, 58, p. 187-194.

Ucan K., Gencoglan C. 2004. *The Effect of Water Deficit on Yield and Yield Components of Sugar Beet*. *Turk J Agric For*, 28, p. 163-172.

Uzilday B., Turkan I., Sekmen A.H., Ozgur R. and H.C. Karakaya. 2012. *Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in Cleome gynandra (C₄) and Cleome spinosa (C₃) under drought stress*. *Plant Science*, 182, p. 59-70.

Van Den Ende W., De Roover J. and A. Van Laere. 1999. *Effect of nitrogen concentration on fructan and fructan metabolizing enzymes in young chicory plants (Cichorium intybus)*. *Physiologia Plantarum*, 105(1), p. 2-8.

Van Dongen, J.T., Schurr, U., Pfister, M. & P. Geigenberger. 2003. *Phloem metabolism and function have to cope with low internal oxygen*. *Plant Physiology*, 131(4), p. 1529-1543.

- Van Laere, A. & W. Van Den Ende.** 2002. *Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system*. Plant, Cell and Environment, 25, p. 803-813.
- Van Loo, J., Coussement, P., De Leenheer, L., Hoebregs, H. & G. Smits.** 1995. *On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western diet*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 35, p. 525– 552.
- Vandoorne, B.** 2007. Mémoire du diplôme de Bio-ingénieur en Sciences et Technologies de l'environnement. *Influence des facteurs environnementaux sur la physiologie et la transition florale de la chicorée à inuline (Cichorium intybus var. sativum)*. Louvain-La-Neuve: Université catholique de Louvain, p 120.
- Valluru R, Van den Ende W.** 2008. Plant fructans in stress environments: emerging concepts and future prospects. *Journal of Experimental Botany* **59**, 2905-2916.
- Vergauwen, R., Van Laere, A. and Van Den Ende, W.** 2003. *Properties of Fructan: Fructan 1-Fructosyltransferases from Chicory and Globe Thistle, Two Asteracean Plants Storing Greatly Different Types of Inulin*. Plant Physiology, 133, p. 391-401.
- Verhaest, M., Lammens, W. & K. Le Roy.** 2007. *X-ray diffraction structure of a cell-wall invertase from Arabidopsis thaliana*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 162, p. 1555-1563.
- Verslues P.E. and T.E. Juenger.** 2011. *Drought, metabolites and Arabidopsis natural variation: a promising combination for understanding adaptation to water-limited environments*. Current Opinion in Plant Biology, 14, 240–245.
- Vile, D., Pervent M., Belluau M., Vasseur F., Bresson J., Muller B., Granier C. and T. Simonneau.** 2012. *Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: Independent or interactive effects?* Plant, Cell and Environment, 35(4), p. 702-718.
- Visser E.J.W., Cohen J.D., Barendse G.W.M., Blom C.W.P.M., Voesenek L.A.C.J.** 1996. *An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded Rumex palustris Sm.*, Plant Physiology, 112, p. 1687-1692.

- Villadsen, D., Rung, J.H. and T.H. Nielsen.** 2005. *Osmotic stress changes carbohydrate partitioning and fructose-2,6-bisphosphate metabolism in barley leaves.* Functional Plant Biology, 32(11), p. 1033-1043.
- Voisin A.S., Reidy B., Parent B., Rolland G., Redondo E., Gerentes D., Tardieu F. and B. Muller.** 2006. *Are ABA, ethylene or their interaction involved in the response of leaf growth to soil water deficit? An analysis using naturally occurring variation or genetic transformation of ABA production in maize.* Plant Cell and Environment, 29, p. 1829-1840.
- Vuylstekker, C., E. Dewaele & S. Rambour.** 1998. *Auxin induced lateral root formation in chicory.* Annals of Botany, 81, p. 449-454.
- Walker, J. P., Willgoose, G.R. & J. D. Kalma.** 2004. *In situ measurement of soil moisture: a comparison of techniques.* Journal of Hydrology 293(1-4), p. 85-99.
- Wample R.L. & R.W. Davis.** 1983. *Effect of flooding on starch accumulation in chloroplasts of sunflower (Helianthus annuus L.).* Plant Physiology, 73: 195-198.
- Wang S., Liang D., Li C., Hao Y., Ma F. and H. Shu.** 2012. *Influence of drought stress on the cellular ultrastructure and antioxidant system in leaves of drought-tolerant and drought-sensitive apple rootstocks.* Plant Physiology and Biochemistry, 51, p. 81–89.
- Wang Y., Liu F. and C.R. Jensen.** 2012. *Comparative effects of deficit irrigation and alternate partial root-zone irrigation on xylem pH, ABA and ionic concentrations in tomatoes.* Journal of Experimental Botany, 63(5), p. 1907-1917.
- Wasternack C.** 2007. *Jasmonates: An Update of Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development.* Annals of Botany, 100(4), p. 681-697.
- Whittaker A., Martinelli T., Farrant J.M., Bochicchio A. and C. Vazzana.** 2007. *Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in desiccation-tolerant leaf material of the C₄ resurrection plant Sporobolus stapfianus during dehydration.* Journal of Experimental Botany, 58(13), p. 3775-3787.

- Wilkinson S and W.J. Davies.** 2009. *Ozone suppresses soil drying- and abscisic acid (ABA)-induced stomatal closure via an ethylene-dependent mechanism.* Plant, Cell and Environment, 32, p. 949-959.
- Wilson, R.G., Smith, J.A., Yonts, C.D.** 2004. *Chicory Root Yield and Carbohydrate Composition is Influenced by Cultivar Selection, Planting and Harvest Date.* Crop Science, 44, p. 748-752.
- Wingler A., Purdy S., MacLean J.A. and Pourteau N.** 2006. *The role of sugar in integrating environmental signals during the regulation of leaf senescence.* Journal of Experimental Botany, 57(2), p. 391-399.
- Wu, X.X, Zha, D.S. & Xiang, T.** 2008. *Effects of low temperature stress on growth, activities of antioxidant enzymes and osmotic substances of eggplant seedlings.* Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 24, p. 471-475.
- Xue, G.P., McIntyre, C.L., Glassop, D. & R.Shorter.** 2008. *Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress.* Plant Molecular Biology, 67(3), p. 197-214.
- Yang J.C., Zhang J.H., Ye Y.X., Wang Z.Q., Zhu Q.S. and L.J. Liu.** 2004. *Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of rice grains to water stress during filling.* Plant, Cell and Environment, 27, p. 1055-1064.
- Yesbergenova Z., Yang G., Oron E., Soffer E., Fluhr R. & M. Sagi.** 2005. *The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid.* Plant Journal, 42, p. 862-876.
- Zhang M., Duan L., Tian X., Zhongpei H., Li J., Wang B., Li Z.** 2007. *Uniconazole-induced tolerance of soybean to water deficit stress in relation to changes in photosynthesis, hormones and antioxidant system.* Journal of Plant Physiology, 164(6), p. 709-717.
- Zhou Y., Lam H.M. & J. Zhang.** 2007. *Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice.* Journal of Experimental Botany, 58, p. 1207-1217.

List of publications

Articles in peer-reviewed journals

- **Vandoorne B., Mathieu A.S., Van den Ende W., Vergauwen R., Périlleux C., Javaux M. and S. Lutts.** 2012. *Water stress drastically reduces root growth and inulin yield in Cichorium intybus (var. sativum) independently of photosynthesis.* Journal of Experimental Botany, pulished online, May 10 2012.
- **Vandoorne B., Beff L., Lutts S. and M. Javaux.** 2012. *Combining modeling and measurements to characterize water uptake dynamics of Cichorium intybus var. sativum under water-stress conditions.* Vadose Zone Journal, submitted.
- **Vandoorne B., Descamps C., Mathieu A.S., Van den Ende W., Vergauwen R., Javaux M. and S. Lutts.** 2012. *Long term intermittent flooding stress affects plant growth and inulin synthesis of Cichoryum intybus (var. sativum),* Annals of Botany, submitted.
- **Rooke J.C., Vandoorne B., Léonard A., Meunier C.F., Cambier P., Sarmiento H., Descy J.P., Su B.L.** 2011. *Prolonging the lifetime and activity of silica immobilised Cyanidium caldarium.* Journal of Colloid and Interface Science 356: 159-164.
- **Beff L., Günther T., Vandoorne B. and M. Javaux.** 2012. *Three-dimensional monitoring of soil water content in a Maize field using Electrical Resistivity Tomography.* Hydrology and Earth System Sciences, submitted.
- **Vandoorne B., Al-Barri B., Beff L., Lutts S. and M. Javaux.** 2012. *3-D soil water depletion due to chicory root water uptake monitored by Electrical Resistivity Tomography.* In preparation.
- **Mathieu A.S., Vandoorne B., Périlleux C., Quinet M., Dielen V., Van Herck J.C. and S. Lutts.** 2012. *The paradoxical promotive impact of high temperatures on flowering in the vernalization-sensitive root-chicory (Cichorium intybus var. sativum) in relation with photosynthesis and plant water status.* Physiologia Plantarum, in preparation.

Communications published as scientific meetings acts

- **Vandoorne B., Dekoninck N., Lutts S., Capelle B., Javaux M.** 2009. *Influence of different irrigation levels on the root water uptake and the physiology of root-chicory,* EGU General Assembly 2009, Geophysical Research Abstract, Vol. 11, EGU2009-13577, oral communication.

Communications in scientific meetings

- **Vandoorne B., Mathieu A.S., Dielen V., Perilleux C., Lutts S.** *Influence of environmental factors on the floral transition, yield and physiology of root-chicory (Cichorium intybus L. var. sativum)* . Groupe de contact FNRS Biologie Végétale : du gene à la fonction, Gembloux-Belgium, 2nd April 2009.
- **Mathieu A.-S., Vandoorne B., Quinet M., Dielen V., Périlleux C. & S. Lutts.** 2011. *The promotive impact of high temperature on flowering in root chicory (Cichorium intybus L.)*, Workshop on molecular mechanisms controlling flower development, Maratea-Italia, 2011.
- **Vandoorne B., Beff L., Mathieu A.S., Couvreur V., Lutts S, Javaux M.** *Consequences of drought on the physiology and root uptake behaviour of chicory (Cichorium intybus var. sativum)*. Inauguration of the Earth and Life Institute, Louvain-La-Neuve - Belgium, 8th June 2011.
- **Besson A., B. Vandoorne, M. Javaux, F. Nguyen and M. Vanclooster.** 2008. *Analyse de l'impact de techniques culturales sur les transferts en eau et en solutés du sol à l'échelle du profil pédologique*. 33èmes journées scientifiques du GFHN. Impact de l'usage du sol sur les ressources en eau souterraines, Avignon, France, 20/11/2008.

Annexe 1

DAS	ERT 1							ERT 2						
	Numb iter	RRMS	Chi ²	Scale (kg)	ERT (kg)	T _{cumul} scale (kg)	T _{cumul} ERT (kg)	Numb iter	RRMS	Chi ²	Scale (kg)	ERT (kg)	T _{cumul} scale (kg)	T _{cumul} ERT (kg)
23	7	7.3	7.0	36.3	36.6	0	0	7	6.3	4.7	33.5	33.4	0	0
49	5	5.8	3.5	33.6	33.2	3.0	3.7	6	7.2	5.9	31.0	30.3	2.7	3.3
71	7	5.6	3.7	32.1	30.5	4.6	6.5	7	5.4	3.4	29.3	28.0	4.5	5.7
84	9	7.6	7.6	31.3	29.8	6.6	8.4	7	5.8	4.0	28.6	27.8	6.4	7.1
92	8	7.3	6.8	31.2	29.5	8.0	10.0	4	6.8	4.9	27.1	27.3	8.4	8.0
99	8	8.5	10.4	27.4	26.4	8.8	10.1	6	6.0	3.6	24.5	26.2	10.9	9.1
106	8	9.5	10.8	28.0	27.4	9.5	10.4	5	8.7	8.6	24.7	24.4	11.0	11.2
113	4	9.6	42.0					6	8.4	7.4		23.7		11.9
120	4	5.4	2.9	25.6	26.0	11.9	11.8	6	8.2	6.3	22.4	22.5	13.2	13.0
127	6	5.9	3.8	25.0	24.9	13.0	13.4	8	6.2	3.6	20.8	21.1	14.8	14.5
131	6	6.6	5.3		24.7		14.0	6	7.1	5.1		20.2		15.6
134	8	7.1	6.1	24.4	24.4	14.6	14.9	6	8.6	8.4	20.6	19.8	15.2	15.9
138	7	7.1	5.3		23.9		15.8	6	8.7	8.6		19.3		16.4
141	8	7.5	7.4	23.3	23.6	16.7	16.7	4	9.3	8.9	19.5	18.6	16.3	17.1
145	7	7.8	8.4		23.0		17.8	6	7.5	5.2		18.2		17.6
147	7	8.1	7.6	23.2	22.7	17.8	18.6	6	7.3	5.7	18.6	18.0	17.3	17.8
152	9	7.7	7.6		22.0		19.7	5	6.7	4.1		17.2		18.6
156	6	8.1	9.0	22.0	21.4	20.0	20.9	6	9.3	8.8	18.0	16.6	18.1	19.4
159	5	7.3	7.4		20.9		21.9	4	10.5	13.0		16.7		
162	8	6.8	5.3	21.2	20.6	21.8	22.7	6	9.3	9.2	17.2	15.9	18.9	20.1
166	6	6.8	5.4		20.0		23.8	5	8.8	7.7		15.6		20.4
169	7	6.7	5.3	20.9	19.6	23.1	24.7	5	8.9	8.1	16.4	15.5	19.9	20.6
Numb iter = Number of iterations ; Scale and ERT = remaining quantity of water estimated by those methods ; T _{cumul} = cumulative transpiration														