



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPubLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT LMD

Spécialité: Toxicologie Cellulaire.

Intitulé

**STATUT NUTRITIONNEL ET PLASTICITE DE REponses AUX
STRESS CHEZ UN MODELE VEGETAL : *Triticum durum* Desf.**

Presentée par : Mlle ISSAAD Ghozlène

Membre de Jury:

| | | | |
|-------------|-------|--------------------|-------------------|
| BERREBAH H. | (Pr) | Président | Universié Annaba. |
| DJEBAR M-R. | (Pr) | Directeur de thèse | Universié Annaba. |
| MEKSEM L. | (Pr) | Examineur | Universié Annaba. |
| SOUIKI L. | (MCA) | Examineur | Universié Guelma |
| SOHANE M. | (Pr) | Examineur | Universié Guelma |

Année universitaire: 2012/2013

SOMMAIRE.

| | |
|-----------------------------|----|
| Remerciements..... | 01 |
| Résumé..... | 04 |
| Liste des figures..... | 07 |
| Liste des tableaux..... | 11 |
| Liste des abréviations..... | 12 |

Chapitre 01. Introduction générale.

| | |
|--|----|
| Introduction..... | 15 |
| Situation du blé dans le monde..... | 16 |
| Situation du blé en Algérie..... | 17 |
| La biologie du blé..... | 17 |
| Description générale du blé dur..... | 17 |
| Le cycle physiologique du blé..... | 18 |
| Période végétative..... | 19 |
| Période reproductrice..... | 19 |
| Origine du blé dur..... | 21 |
| Exigence du blé..... | 21 |
| Les stress abiotiques..... | 22 |
| Définitions de la sécheresse pour la plante..... | 23 |
| Conséquences de la sécheresse sur le fonctionnement des plantes..... | 25 |
| Photosynthèse et transpiration..... | 25 |
| Limitation de l'alimentation minérale par un déficit hydrique..... | 26 |
| Limitation de la croissance des organes reproducteurs..... | 27 |

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

| | |
|--|-----------|
| Introduction..... | 28 |
| Matériel et méthodes..... | 30 |
| Matériel biologique..... | 30 |
| Conduite desessais..... | 30 |
| Paramètres mesurés..... | 32 |
| Paramètres morphométriques..... | 32 |
| Nombre Moyen de Racines (NMR)..... | 32 |
| Longueur Moyenne des Racines (LMR)..... | 32 |
| Longueur Moyenne des Tiges (LMT)..... | 32 |
| Poids frais (PF)..... | 32 |
| Poids sec (PS)..... | 32 |
| Paramètres physiologiques..... | 33 |
| Turgescence relative en eau (RWC)..... | 33 |
| Mesure de la surface foliaire..... | 33 |
| Mesure des chlorophylles <u>a</u>, <u>b</u> et (<u>a</u>+<u>b</u>)..... | 34 |
| Mesure du métabolisme respiratoire (MR)..... | 34 |
| Paramètres biochimiques..... | 35 |
| Mesure des protéines totales..... | 35 |
| Mesure de la proline..... | 36 |
| Mesure des sucres solubles..... | 36 |
| Paramètres histologiques..... | 37 |
| Les coupes histologiques..... | 37 |
| Résultats..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| Effet du stress hydrique sur les paramètres morphophysiologiques..... | 38 |
| Effet du stress hydrique sur les variations du nombre moyen des racines (NMR)... | 38 |
| Effet du stress hydrique sur les variations de la longueur moyenne des racines (LMR)..... | 39 |
| Effet du stress hydrique sur les variations de longueur moyenne des tiges (LMT)... | 39 |
| Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais de la tige (PFT)..... | 40 |
| Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec de la tige (PST)..... | 40 |
| Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais des racines (PFR)..... | 41 |
| Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec des racines (PSR)..... | 41 |
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes relatives en eau (RWC)..... | 42 |
| Turgescence Relative en Eau (RWC.)..... | 42 |
| Effet du stress hydrique sur les variations de la surface foliaire..... | 43 |
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en chlorophylle <u>a</u>, <u>b</u> et <u>(a+b)</u>.... | 43 |
| Effet du stress hydrique sur la chlorophylle <u>a</u>..... | 43 |
| Effet du stress hydrique sur la chlorophylle <u>b</u>..... | 44 |
| Effet du stress hydrique sur la chlorophylle <u>(a+b)</u>..... | 45 |
| Effet du stress hydrique sur la respiration des racines..... | 45 |
| Effet du stress hydrique sur les paramètres biochimiques..... | 46 |
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en protéines au niveau de la tige..... | 46 |
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en protéines au niveau des racines..... | 46 |

| | |
|---|----|
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en proline au niveau des tiges..... | 47 |
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en proline au niveau des racines..... | 47 |
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en sucres totaux au niveau des tiges..... | 48 |
| Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en sucres totaux au niveau des racines..... | 48 |
| Effet du stress hydrique sur les stomates..... | 49 |
| Discussion..... | 50 |

Chapitre 03. Statut nutritionnel de la plante.

| | |
|-------------------|----|
| Introduction..... | 56 |
| L'azote..... | 56 |
| Le bore..... | 57 |
| Le cuivre..... | 58 |
| Le manganèse..... | 59 |
| Le Fer..... | 59 |
| Le zinc..... | 59 |
| Le magnésium..... | 60 |
| Le chrome..... | 61 |
| Le phosphore.... | 61 |
| Le sodium..... | 62 |
| Le potassium..... | 62 |

| | |
|--|-----------|
| Matériel et méthodes..... | 63 |
| Conduite des essais..... | 63 |
| Paramètres mesurés..... | 63 |
| Dosage de l'azote..... | 63 |
| Détermination des teneurs moyennes en B, Cu, Mn, Fe, Zn, Mg, P, Na, K et en Cr..... | 63 |
| Résultats..... | 65 |
| Teneur en azote au niveau des tiges..... | 65 |
| Teneur en azote au niveau des racines..... | 65 |
| Teneur en bore au niveau des tiges..... | 66 |
| Teneur en bore au niveau des racines..... | 66 |
| Teneur en cuivre au niveau des tiges..... | 67 |
| Teneur en cuivre au niveau des racines..... | 67 |
| Teneur en fer au niveau des tiges..... | 68 |
| Teneur en fer au niveau des racines..... | 68 |
| Teneur en magnésium au niveau des tiges..... | 69 |
| Teneur en magnésium au niveau des racines..... | 69 |
| Teneur en manganèse au niveau des tiges..... | 70 |
| Teneur en manganèse au niveau des racines..... | 70 |
| Teneur en zinc au niveau des tiges..... | 71 |
| Teneur en zinc au niveau des racines..... | 71 |
| Teneur en phosphore au niveau des tiges..... | 72 |
| Teneur en phosphore au niveau des racines..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Teneur en sodium au niveau des tiges..... | 73 |
| Teneur en sodium au niveau des racines..... | 73 |
| Teneur en potassium au niveau des tiges..... | 74 |
| Teneur en potassium au niveau des racines..... | 74 |
| Teneur en chrome au niveau des tiges..... | 75 |
| Teneur en chrome au niveau des racines..... | 75 |
| Discussion..... | 76 |

Chapitre 04. ROS et systèmes antioxydants

| | |
|--|----|
| Introduction..... | 80 |
| Le stress oxydatif chez les plantes..... | 80 |
| Les Espèces Réactives de l'Oxygène..... | 81 |
| Les différents types de ROS..... | 82 |
| Les ROS primaires..... | 82 |
| Les ROS secondaires..... | 84 |
| Cibles des ROS..... | 86 |
| Réactivité vis-à-vis des protéines..... | 87 |
| Réactivité vis-à-vis des lipides..... | 88 |
| Réactivité vis-à-vis de l'ADN..... | 88 |
| Principales sources de ROS..... | 89 |
| La chaîne respiratoire mitochondriale..... | 89 |
| La photosynthèse..... | 92 |
| Les réactions primaires de la photosynthèse..... | 93 |
| Les réactions secondaires de la photosynthèse: fixation du CO ₂ | 95 |
| Effets délétères du stress oxydant | 96 |

| | |
|--|------------|
| Les antioxydants..... | 97 |
| Les catalases (CAT)..... | 98 |
| Les ascorbates peroxydases (APX)..... | 98 |
| Les glutathions peroxydases (GPX)..... | 99 |
| | |
| Matériel et méthodes..... | 100 |
| | |
| Matériel biologique..... | 100 |
| | |
| Conduite de l'essai..... | 100 |
| | |
| Mesure de l'activité enzymatique..... | 100 |
| Extraction enzymatique..... | 100 |
| Dosage de l'activité Catalase (CAT)..... | 101 |
| Dosage de l'activité Guaiacol-Peroxydase (GPX)..... | 102 |
| Dosage de l'activité Ascorbate -Peroxydase (APX)..... | 102 |
| Mesure de l'activité malondialdehyde (MDA)..... | 102 |
| Mesure de la production du peroxyde d'hydrogène H₂O₂..... | 103 |
| Localisation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)..... | 103 |
| Localisation de l'anion superoxyde (O₂⁻)..... | 104 |
| | |
| Résultats..... | 105 |
| Mesure de l'activité Catalase au niveau des tiges et des racines..... | 105 |
| Mesure de l'activité Gaïacol-Peroxydase au niveau des tiges et des racines..... | 106 |
| Mesure de l'activité Ascorbate-Peroxydase au niveau des tiges et des racines... | 107 |
| Mesure de l'activié malondialdehyde (MDA) au niveau des tiges et des racines..... | 108 |

| | |
|--|------------|
| Mesure du Peroxyde d'Hydrogène (H₂O₂) produit au niveau des tiges et des racines..... | 109 |
| Localisation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde au niveau des tiges et des racines..... | 110 |
| Discussion..... | 113 |
| Récapitulatif du travail..... | 116 |
| Références bibliographiques..... | 117 |

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à mon encadreur de thèse le Pr. Djebbar Mouhamed-Réda, que j'ai côtoyé durant 6 inoubliables années. Merci pour m'avoir laissé autant d'autonomie pour effectuer ces recherches. Merci encore pour vos conseils scientifiques qui m'ont beaucoup enrichies et les discussions que nous avons eues ensemble ont guidé mon raisonnement. Merci bien Monsieur de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire et pour votre confiance en moi.

Je remercie chaleureusement le Professeur Berrebbah Houria de l'université de Annaba pour sa disponibilité et tout le soutien et l'aide qu'elle a bien voulu m'apporter durant ces longues années.

Je remercie le Professeur Meksem Leila de l'université de annaba pour ses précieux conseils et ses encouragements.

Je tiens à remercier le Professeur Souïki Linda de l'université de Guelma, d'avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteuse de ma thèse et de me faire l'honneur de critiquer ce travail.

Je remercie le Professeur Soltan Mahmoud de l'université de El Taref pour avoir pris le temps de s'intéresser à ce travail et avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie également le Pr Bailly Christophe du laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 pour l'illustration de la localisation des ROS.

A ma petite princesse Ines.

D'une fleur tu as la fraîcheur, ma petite fille au grand cœur. Tout m'émerveille en toi, tu es mon rayon de soleil. Je t'aime de tout mon cœur...

A mon époux Djamel

Je remercie mon très cher époux Djamel pour son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme dans la vie. Tu m'as donné toute l'attention et tout l'amour qu'un être puisse espérer. Puisse le tout puissant nous accorder bonheur, santé et une longue vie.

A mes très chers parents Haoues et Aïcha

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond respect, mon affection et toute ma gratitude pour les sacrifices que vous avez consenti. Aucun de mes mots ne saurait exprimer l'ampleur de ma reconnaissance. Merci pour vos instructions, votre soutien, que le tout puissant vous accorde une longue vie. papa, maman.

A mon très cher ami et frère Hamza Grine et sa famille.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Hamza et toute sa famille. Vous m'aviez beaucoup soutenu et aidé, je vous remercie infiniment. Que Dieu vous bénisse et vous guide vers le meilleur inshallah.

A mon très cher frère Abd El Kader et sa femme Lamia.

Vous trouverez ici l'expression de mon profond respect, mon amour, et ma gratitude. Que dieu vous garde ainsi que mon adorable neveu PISSA.

A ma très chère sœur Imene et son époux Youcef.

J'espère que vous trouverez dans cette thèse l'expression de mon amour, ma sympathie et ma grande gratitude. Que dieu vous garde et protège notre petit POPO.

Je remercie mes voisins et en particulier meriouma de m'avoir soutenu et encouragé.

Je remercie mon oncle mourad et sa fille selmouta pour leurs encouragements ininterrompus.

Un merci tout particulier à mon oncle Badr Eddine et sa famille pour ses encouragement et m'avoir aidé a effectué des analyses au sein du laboratoire du complexe Fertial de Annaba.

A tous mes amis, ma famille et à ceux qui m'ont aidée de près ou de loin et que j'aime.

Résumé.

Les plantes sont au cours de leur vie constamment confrontées à différents types de stress influant sur leur croissance. En plus des agressions causées par des organismes vivants, sources de stress biotiques, les plantes sont exposées à des variations environnementales regroupées sous le terme de stress abiotiques.

Le présent travail s'intéresse à l'étude des effets d'un déficit hydrique sur les tiges et les racines d'un modèle végétal : le blé dur (*Triticum durum*) de la variété GTA. Après germination, les plantes sont soumises à un stress hydrique pendant (03/ 05 / 07 et 09 jours).

Nos résultats mettent en évidence d'une part des perturbations morphophysiologiques et biochimiques de la graine soumise à un déficit hydrique et d'autre part, l'examen histologique révèle une fermeture des stomates induite par ce stress.

Les dosages enzymatiques montrent une augmentation de l'activité Catalase (CAT), Ascorbate-Peroxydase (APX) (Enzymes spécifiques du système de détoxification cellulaire) et à un degré moindre de l'activité Gaïacol-Peroxydase (GPX). Egalement, on enregistre une stimulation de l'activité Malondialdéhyde (MDA) à l'origine d'une peroxydationlipidique. Nous avons aussi mis en évidence une forte augmentation du taux de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) au niveau des tiges et des racines. Cette augmentation est proportionnelle au degré de stress induit. Il est conclu que le stress a engendré une toxicité qui s'est manifestée par la production de formes réactives de l'oxygène dont, le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde chez le modèle végétal utilisé. L'observation au microscope à fluorescence nous a permis de localiser les ROS étudiées. Enfin, concernant les teneurs en éléments nutritifs, le manque d'eau a provoqué des modifications importantes chez la variété GTA dur.

Mots clés : Déficit hydrique, Blé dur, Stress oxydatif, Peroxyde d'hydrogène, Anion superoxyde, Systèmes antioxydants, Eléments nutritifs.

Abstract.

Plants are in their lives constantly facing different types of stress affecting their growth. In addition to attacks caused by living organisms, sources of biotic stress, plants are exposed to environmental variations grouped under the term of abiotic stress. This work focuses on study of the effects of water deficit on the stems and roots of a plant model: durum wheat (Triticum durum) of the GTA variety. After germination, the plants are subjected to a water stress during (3, 5, 7 and 9th days).

Our results show, morphophysiological and biochemical disturbances of seeds subjected to water deficit. Histological examination reveals a stomatal closure induced by stress.

We also note that stress causes an increase in the catalase activity (CAT), ascorbate peroxidase (APX) (specific enzymes of cellular detoxification system) and to a lesser level of guaiacol-peroxidase activity (GPX). In addition were corded that stimulation of the activity of Malondialdehyde (MDA) cause a lipid peroxidation.

We also revealed a significant increase in the rate of hydrogen peroxide (H₂O₂) and superoxide anion (O₂⁻) in stems and roots. This increase is proportional to the degree of stress induced. It is concluded that stress causes toxicity manifested by the production of reactive forms of oxygen, hydrogen peroxide and superoxide anion in our model plant: Triticum durum Desf the GTA hard variety. The observation by fluorescence microscopy allowed us to locate the measured ROS.

Regarding nutrient levels, water stress causes significant changes in the GTA hard variety.

Keywords: water deficit, Durum, oxidative stress, hydrogen peroxide, superoxide anion, antioxidant systems, Nutrients.

ملخص:

تواجه النباتات باستمرار أنواع مختلفة من الإجهاد التي تؤثر على نموها. بالإضافة إلى الهجمات التي تسببها الكائنات الحية، تتعرض النباتات للتغيرات البيئية مجمعة تحت وطأة أحيائية الأجل. ويركز هذا العمل على دراسة الآثار المترتبة على العجز المائي على السيقان وجذور النباتات من نموذج القمح القاسي، وتتعرض النباتات لإجهاد مائي خلال (07,05,03 و 09 أيام).

كشفت نتائجنا أن النقص في الماء يؤدي إلى تغيرات مورفوفيزيولوجية، و كشف الفحص النسيجي إغلاق الثغور الناجمة عن الإجهاد.

أدى النقص في الماء إلى زيادة نشاط الإنزيمات المعينة من نظام إزالة السموم الخلوية و المتمثلة في : أسكوربات- البيروكسيديز, الكاتلاز, غاياكولالبيروكسيديز. و أدى أيضا إلى تحفيز المالونديالدهيد.

من ناحية أخرى نسجل زيادة حادة في معدل بيروكسيد الهيدروجين وأنيون الفائق في الجذور و السيقان, هذه الزيادة متناسبة مع درجة الاجهاد الناجم. و تم إثبات و تحديد موقع بيروكسيد الهيدروجين وأنيون الفائق بواسطة المجهر المستشع.وقد تسبب نقص المياه في تغييرات كبيرة في مستويات المغذيات.

كلمات البحث: العجز المائي، القمح القاسي، إجهاد الاكسدة، بيروكسيد الهيدروجين، أنيون الفائق، نظم مضادة للأكسدة والمغذيات.

Liste des figures.

| | |
|--|----|
| Figure 1. Les étapes de maturation du grain de blé..... | 20 |
| Figure 2. Présentation de l'essai..... | 30 |
| Figure 3. Dispositif expérimental de l'essai..... | 31 |
| Figure 4. Schéma de l'Electrode à Oxygène..... | 35 |
| Figure 5. Effet du stress hydrique sur les variations du nombre moyen des racines..... | 38 |
| Figure 6. Effet du stress hydrique sur les variations de la longueur moyenne des racines.... | 39 |
| Figure 7. Effet du stress hydrique sur les variations de longueur moyenne des tiges..... | 39 |
| Figure 8. Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais de la tige..... | 40 |
| Figure 9. Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec de la tige..... | 40 |
| Figure 10. Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais des racines..... | 41 |
| Figure 11. Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec des racines..... | 41 |
| Figure 12. Turgescence Relative en Eau (RWC) au niveau des tiges. | 42 |
| Figure 13. La Turgescence Relative en Eau (RWC) au niveau des racines..... | 42 |
| Figure 14. Effet du stress hydrique sur l'évaluation la surface foliaire..... | 43 |
| Figure 15. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs en chlorophylle <u>a</u> | 44 |
| Figure 16. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs en chlorophylle <u>b</u> | 44 |
| Figure 17. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs en chlorophylle (<u>a+b</u>) | 45 |
| Figure 18. Effet du stress hydrique le métabolisme respiratoire des racines..... | 45 |
| Figure 19. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs en protéines au niveau de la tige..... | 46 |
| Figure 20. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs moyennes en protéines au niveau des racines..... | 46 |

| | |
|--|----|
| <u>Figure 21.</u> Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en proline au niveau des tiges..... | 47 |
| <u>Figure 22.</u> Effet du stress hydrique sur la teneur moyenne en proline au niveau des racines..... | 47 |
| <u>Figure 23.</u> Effet du stress hydrique sur la teneur moyenne en sucres totaux au niveau des tiges..... | 48 |
| <u>Figure 24.</u> Effet du stress hydrique sur la teneur moyenne en sucres totaux au niveau des racines..... | 48 |
| <u>Figure 25.</u> Étude caractéristique des stomates des feuilles de blé dur soumises à un stress hydrique..... | 49 |
| <u>Figure 26.</u> Teneur en azote au niveau des tiges..... | 65 |
| <u>Figure 27.</u> Teneur en azote au niveau des racines..... | 65 |
| <u>Figure 28.</u> Teneur en bore au niveau des tiges..... | 66 |
| <u>Figure 29.</u> Teneur en bore au niveau des racines..... | 66 |
| <u>Figure 30.</u> Teneur en cuivre au niveau des tiges..... | 67 |
| <u>Figure 31.</u> Teneur en cuivre au niveau des racines..... | 67 |
| <u>Figure 32.</u> Teneur en fer au niveau des tiges..... | 68 |
| <u>Figure 33.</u> Teneur en fer au niveau des racines..... | 68 |
| <u>Figure 34.</u> Teneur en magnésium au niveau des tiges..... | 69 |
| <u>Figure 35.</u> Teneur en magnésium au niveau des racines..... | 69 |
| <u>Figure 36.</u> Teneur en manganèse au niveau des tiges..... | 70 |
| <u>Figure 37.</u> Teneur en manganèse au niveau des racines..... | 70 |
| <u>Figure 38.</u> Teneur en zinc au niveau des tiges..... | 71 |
| <u>Figure 39.</u> Teneur en zinc au niveau des racines..... | 71 |
| <u>Figure 40.</u> Teneur en phosphore au niveau des tiges..... | 72 |

| | |
|---|-----------|
| <u>Figure 41.</u> Teneur en phosphore au niveau des racines..... | 72 |
| <u>Figure 42.</u> Teneur en sodium au niveau des tiges..... | 73 |
| <u>Figure 43.</u> Teneur en sodium au niveau des racines..... | 73 |
| <u>Figure 44.</u> Teneur en potassium au niveau des tiges..... | 74 |
| <u>Figure 45.</u> Teneur en potassium au niveau des racines..... | 74 |
| <u>Figure 46.</u> Teneur en chrome au niveau des tiges..... | 75 |
| <u>Figure 47.</u> Teneur en chrome au niveau des racines..... | 75 |
| <u>Figure 48.</u> Structure électronique de la molécule de dioxygène et de quelques dérivés..... | 82 |
| <u>Figure 49.</u> Transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique..... | 83 |
| <u>Figure 50.</u> Réaction d’Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle..... | 84 |
| <u>Figure 51.</u> Espèces réactives de l’oxygène et dommages cellulaires..... | 87 |
| <u>Figure 52 :</u> Dommages de l’ADN causé par stress oxydatif..... | 89 |
| <u>Figure 53 :</u> Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons, des sites de pompage des protons et des inhibiteurs de chaque complexe..... | 91 |
| <u>Figure 54.</u> Chaîne chloroplastique de transfert d’électron localisée dans les membranes thylacoïdiennes..... | 92 |
| <u>Figure 55.</u> Transfert d’énergie par résonance des pigments assimilateurs au centre réactionnel..... | 93 |
| <u>Figure 56.</u> Les destins possibles de chlorophylle excitée..... | 94 |
| <u>Figure 57.</u> Transport cyclique d’électrons. Ce transport ne produit pas de NADPH mais l’énergie peut être utilisée pour produire de l’ATP..... | 95 |
| <u>Figure 58.</u> Cycle de Calvin-Benson-Bassham simplifié..... | 96 |

| | |
|---|------------|
| <u>Figure 59.</u> Localisation des différentes voies enzymatiques de détoxication des ROS au niveau d'une cellule végétale..... | 97 |
| <u>Figure 60.</u> Effet su stress hydrique sur l'activité catalase au niveau des tiges..... | 105 |
| <u>Figure 61.</u> Effet su stress hydrique sur l'activité catalase au niveau des racines..... | 105 |
| <u>Figure 62.</u> Effet su stress hydrique sur l'activité gaïacol-peroxydase au niveau des tiges... | 106 |
| <u>Figure 63.</u> Effet su stress hydrique sur l'activité gaïacol-peroxydase au niveau des racines..... | 106 |
| <u>Figure 64.</u> Effet su stress hydrique sur l'activité Ascorbate-Peroxydase au niveau des tiges..... | 107 |
| <u>Figure 65.</u> Effet su stress hydrique sur l'activité Ascorbate-Peroxydase au niveau des racines..... | 107 |
| <u>Figure 66.</u> Effet su stress hydrique sur les teneurs en malondialdehyde (MDA) au niveau des tiges..... | 108 |
| <u>Figure 67.</u> Effet su stress hydrique sur les teneurs en malondialdehyde (MDA) au niveau des racines..... | 108 |
| <u>Figure 68.</u> Teneur moyenne en peroxyde d'hydrogène produit au niveau des tiges du blé dur..... | 109 |
| <u>Figure 69.</u> Teneur moyenne en peroxyde d'hydrogène produit au niveau des racines du blé dur..... | 109 |
| <u>Figure 70.</u> La mise en évidence du peroxyde d'hydrogène au niveau des tiges et des racines..... | 110 |
| <u>Figure 71.</u> Localisation de l'anion superoxyde au niveau des racines..... | 111 |
| <u>Figure 72.</u> La mise en évidence de l'anion superoxyde au niveau des tiges observé chez les témoins et les stressées | 112 |
| <u>Figure 73.</u> Représentation de la formation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène au niveau de la mitochondrie et le chloroplaste du blé dur « <i>Triticum durum</i> Desf »..... | 115 |

Liste des tableaux.

Tableau 01. Représentation du bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de blé sur le marché mondial.....**16**

Tableau 2. Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (ERA) radicalaires ou non.....**85**

Liste des abréviations.

ABA : Acide abscissique.

ADP : Adénosine diphosphate.

AOX: Alternative oxydase

APX : Ascorbates peroxydase.

ATP : Adénosine Tri Phosphate.

ATPase: Adénosine Tri Phosphatase.

BSA : Albumine de sérum de bœuf.

CaCO₃ : Bicarbonate de calcium

CAT : Catalase

CBB : Cycle de Calvin- Benson- Bassham

Chl: Chlorophylle.

CH₃COOH : Acide acétique

COX: Cytochrome oxydase

CTE : Chaînes de transport d'électrons

DW: Poids sec (Dry weight).

FAO: Organisation des nations unis pour l'agriculture de l'alimentation.

FNR : Ferrédoxine NADP réductase

FW : Poids frais (Fresh weight).

GPX : Glutathions peroxydases

GSH : Glutathion réduit

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IR : Intensité respiratoire

LHC : Light harvesting complexe

LMR : Longueur moyenne des racines

LMT : Longueur moyenne des tiges

MDA : Malondialdehyde

MF : Matière fraîche

MgSO₄ : Sulfate de magnésium

MR : Métabolisme respiratoire

NBT : Tétrazolium nitrobleu

NMR : Nombre moyen de racines

OAIC : Office Algérien interprofessionnelle des céréales

OH• : Radical hydroxyle.

O₂•- : Anion radical superoxyde.

O₂²⁻ : Ion peroxyde

¹O₂ : Oxygène singulet

PC : Plas-tocyanine

PF : Poids frais

PQ : Plastoquinone

PS: Poids sec

PSI : Photosystème I

PSII : Photosystème II

ROS: Espèces réactives de l-oxygène.

RuBisCO : Ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase

SF : Surface foliaire

SOD : Superoxyde dismutase

TCA : Acide tricarboxylique

TCD : Détecteur à conductibilité thermique.

TW : Poids à la turgescence (Turgid weight)

V_e = Volume de l'extrait enzymatique

V_t = Volume total du mélange réactionnel.

ΔA : Difference moyenne de l'absorbance

Σ : Coefficient d'extinction linéique molaire.

^{12}C : Isotope du carbone 12

^{13}C : Isotope du carbone 13

Introduction

Les plantes sont d'une importance globale pour la vie sur Terre. Elles représentent la principale source de carbone et un producteur de l'oxygène que l'on respire. Elles sont aussi une source de fibres, carburants, médicaments, aliments et matériaux. La croissance démographique que nous connaissons actuellement engendre un besoin croissant envers la ressource importante que représente le règne des végétaux.

Les variations de l'environnement auxquelles sont sujets les végétaux les contraignent à posséder une forte capacité d'adaptation. Lorsque ces changements sont trop brutaux, ils peuvent provoquer l'apparition d'un stress oxydant caractérisé par la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS). Ce stress peut ainsi provenir de facteurs abiotiques, par exemple dans le cas d'un stress lumineux, d'une sécheresse, d'une exposition au froid, à la chaleur ou aux UV, ou de conditions d'hypoxie (Price et Hendry, 1997 ; Noctoret Foyer, 1998 ; Mittler, 2002 ; Parent *et al*, 2008). Il peut également être de nature biotique comme l'attaque par des insectes et des animaux, ou par des micro-organismes pathogènes tels des virus, des bactéries ou des champignons. Ces facteurs étrangers à la plante vont bouleverser son métabolisme, conduisant à la formation de composés réactifs qui peuvent induire différentes réactions de la plante (Noctoret Foyer, 2000).

Chapitre 01. Introduction générale

Situation du blé dans le monde.

Le monde passe sur une crise alimentaire, particulièrement aux Etats-Unis et en Russie. Cette crise est due à la hausse des prix des céréales, sous l'effet de la sécheresse.

En 2010, la production mondiale de blé diminue de plus de 4 %. Les pays de la mer Noire (Principalement la Russie et l'Ukraine) ont subi une sécheresse exceptionnelle, réduisant considérablement les récoltes de blé. La Russie a ainsi décidé un embargo sur ses exportations de blé, réduisant l'offre au niveau mondial. (Anonyme, 2011).

Tableau 01. Représentation du bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de blé sur le marché mondial. (Anonyme, 2011).

| Marché mondial du blé | | | | | | |
|---|---------|---------|---------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| | 2008/09 | 2009/10 | 2010/11 | 2011/12 estimation | 2012/13 prévision | |
| | | | | | précédente (08 nov 2012) | dernière (06 dec 2012) |
| (.....millions de tonnes.....) | | | | | | |
| Production¹ | 683.9 | 685.7 | 655.3 | 699.4 | 661.2 | 659.4 |
| Disponibilités² | 816.6 | 846.8 | 844.6 | 883.0 | 850.4 | 843.3 |
| Utilisation | 646.5 | 656.6 | 660.5 | 694.5 | 687.5 | 686.0 |
| Commerce³ | 140.1 | 130.6 | 125.3 | 146.2 | 135.0 | 136.0 |
| Stocks de clôture⁴ | 161.1 | 189.3 | 183.6 | 183.9 | 166.7 | 163.3 |
| (.....pour cent.....) | | | | | | |
| Rapport stocks mondiaux-utilisation | 24.5 | 28.7 | 26.4 | 26.8 | 24.0 | 23.6 |
| Rapport stocks des principaux exportateurs-utilisation total⁵ | 17.9 | 21.6 | 20.2 | 18.7 | 13.9 | 14.1 |

Chapitre 01. Introduction générale

Situation du blé en Algérie.

Le secteur des céréales occupe une place très importante dans l'économie algérienne car l'Algérie appartient au groupe des plus gros importateurs de blé dans le monde. En effet, les céréales et leurs dérivés constituent l'épine dorsale du système alimentaire algérien. (Kellou, 2008).

Les quantités de blé importées par l'Algérie ont atteint 3,97 millions de tonnes durant le premier semestre de 2011 contre 2,93 millions de tonnes en 2010, soit une augmentation de 1,03 million de tonnes.

La population algérienne est caractérisée par un mode alimentaire basé essentiellement sur la consommation des céréales sous toutes ses formes (pain, pâtes alimentaires, couscous, galettes de pain, etc.). En 2003, les céréales constituaient 54% des apports énergétiques et 62% des apports protéiniques journaliers dans le modèle de consommation alimentaire algérien. (Boussard et Chabane, 2011)

Malgré l'amélioration des productions des céréales en général et du blé en particulier, le secteur agricole est souvent incapable de faire face à la croissance de la demande en blé. Cette croissance de demande est liée essentiellement aux changements des habitudes alimentaires et à l'élévation des niveaux de vie, avec plus de 203 kg/personne et par an. (FAO, 2005).

À ce défi démographique s'ajoute la menace du réchauffement climatique qui pourrait engendrer plusieurs impacts sur les ressources naturelles et sur les niveaux des productions quantitativement et qualitativement. Le réchauffement induira indubitablement des modifications des cycles d'eau, une dégradation des qualités des terres agricoles, une baisse de fertilité des sols, une érosion de la biodiversité, un déplacement des étages bioclimatiques ainsi que des risques parasitaires et sanitaires multiples. (Nelson *et al.*, 2009).

La biologie du blé.

Description générale du blé dur.

Le blé dur est une monocotylédone de la famille des Graminées et du genre *Triticum*. En termes de production commerciale et d'alimentation humaine, cette espèce est la deuxième plus importante du genre *Triticum* après le blé tendre (*Triticum aestivum* L.).

Chapitre 01. Introduction générale

Il s'agit d'une graminée annuelle d'une hauteur moyenne dont le limbe des feuilles est aplati. L'inflorescence en épi terminal se compose de fleurs parfaites (Bozzini, 1998). Comme pour le blé tendre, il existe des variétés de blé dur demi-naines. Le système racinaire comprend des racines séminales produites par la plantule durant la levée, ainsi que des racines adventives qui se forment plus tard à partir des nœuds à la base de la plante et constituent le système racinaire permanent. Le blé dur possède une tige cylindrique, dressée, habituellement creuse et subdivisée en entrenœuds. Certaines variétés possèdent toutefois des tiges pleines (Clarke *et al.*, 2002). Le chaume (talles) se forme à partir de bourgeons axillaires aux nœuds à la base de la tige principale. Le nombre de brins dépend de la variété, des conditions de croissance et de la densité de plantation. Dans des conditions normales, une plante peut produire en tout trois brins en plus de la tige principale, mais tous ne grènent pas nécessairement (Bozzini, 1988). Comme pour d'autres graminées, les feuilles de blé dur se composent d'une base (gaine) entourant la tige, d'une partie terminale qui s'aligne avec les nervures parallèles et d'une extrémité pointue. Au point d'attache de la gaine de la feuille se trouve une membrane mince et transparente (ligule) comportant deux petits appendices latéraux (oreillettes). La tige principale et chaque brin portent une inflorescence en épi terminal.

Qu'elle soit vivace ou annuelle, toutes les graminées ont un rythme de végétation et de fructification annuel. Au cours de ses différents stades de croissance, le blé présente des exigences variables en eau et en matières minérales. Ainsi les différents stades du cycle de développement du blé sont tous très importants mais, toutefois, trois phases peuvent être retenues, il s'agit de la phase : Levée début Montaison, Montaison Floraison et FloraisonMaturation, chacune d'elles coïncidant avec les phases d'élaboration du rendement caractérisées par l'une des composantes : épis/plant, grains/épis et poids du grain (Gateet *al.*, 1997).

Le cycle physiologique du blé.

Dans ce cycle annuel, une série d'étapes séparées par des stades repères, permettent de diviser le cycle évolutif du blé en deux grandes périodes :

- Une période végétative.
- Une période reproductrice.

Chapitre 01. Introduction générale

Période végétative.

Elle s'étend de la germination à l'ébauche de l'épi. On y trouve deux stades :

Phase Germination – levée.

La germination est le passage de la semence de l'état de vie lente à l'état de vie active. (Chabiet *al.*, 1992).

Phase Levée- Tallage.

Le début du tallage est marqué par l'apparition de l'extrémité de la première feuille de la talle latérale primaire, (Chikhi, 1992). Le tallage marque la fin de la période végétative et le début de la phase reproductive, conditionnée par la photopériode et la vernalisation qui permettent l'élongation des entre-nœuds (Gate, 1995).

Période reproductrice.

Elle comprend la formation et la croissance de l'épi ; elle se caractérise par :

Phase Montaison Gonflement.

Elle se manifeste à partir du stade épi à 1 cm, c'est la fin du tallage herbacé et la tige principale ainsi que les talles les plus âgées commencent à s'allonger suite à l'élongation des entrenœuds, auparavant emplies sous l'épi (Belaid, 1996). Il est suivi du stade 1 à 2 nœuds, ici les nœuds sont aisément repérables sur la tige. Pendant cette phase de croissance active, les besoins en éléments nutritifs notamment en azote sont accrus (Merizek, 1992).

Epiaison – fécondation.

C'est au cours de cette période que s'achève la formation des organes floraux et que va s'effectuer la fécondation (Clement et Prats, 1970).

Grossissement du grain.

Il correspond à la croissance de l'ovaire. Il s'agit d'une phase d'intense activité de la photosynthèse. (Chabiet *al.*, 1992).

Maturation du grain.

C'est la dernière phase du cycle végétatif. D'après Belaid (1996) la maturation correspond à l'accumulation de l'amidon dans les grains. Par la suite, les grains perdent leur humidité :

- A 45% d'humidité, c'est le stade pâteux.
- A 20% d'humidité, c'est le stade rayable à l'ongle.
- A 15 – 16% d'humidité, c'est le stade cassant (mûr pour la récolte).

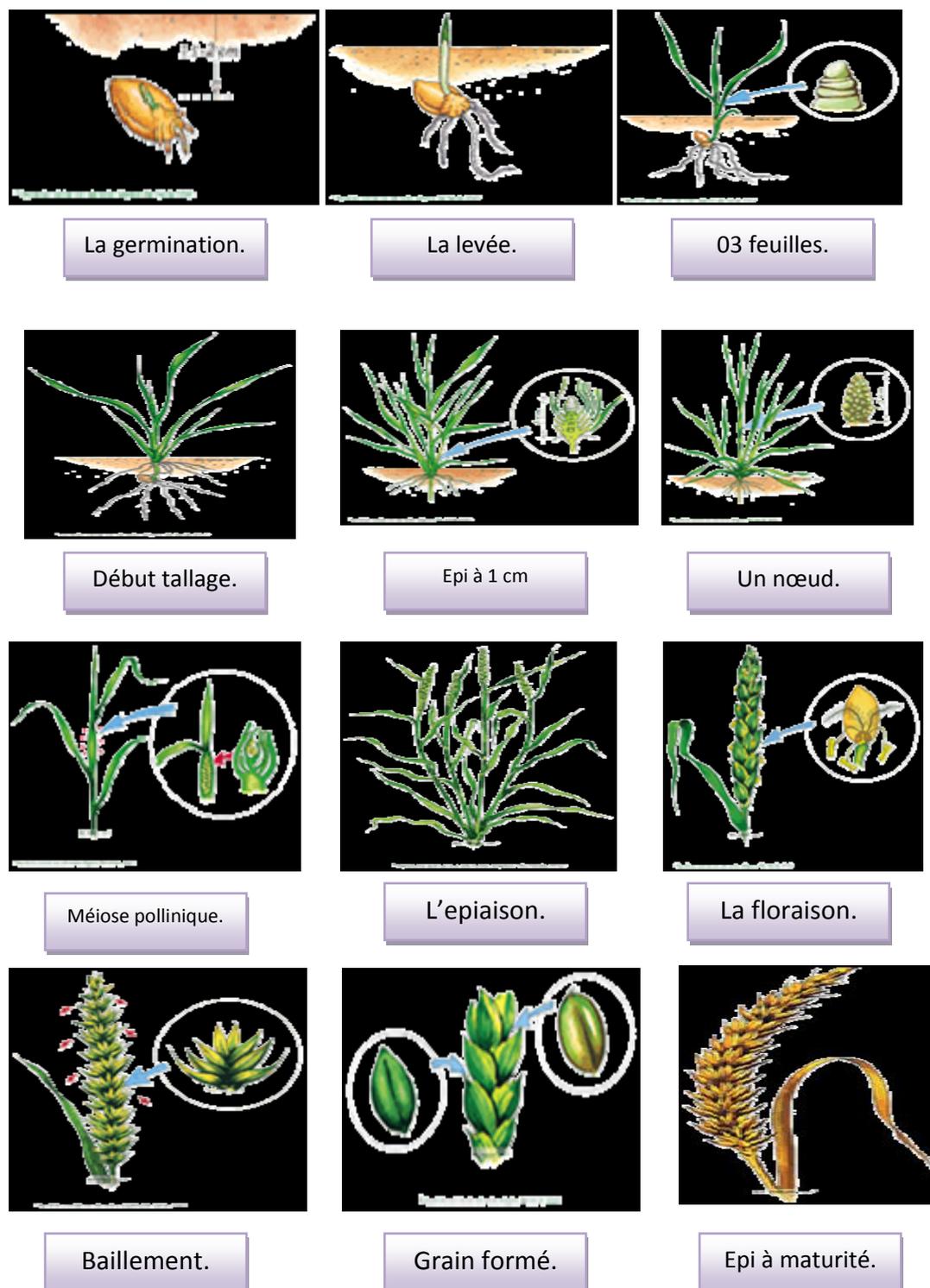


Figure 1. Etapes de maturation du grain de blé (<http://biosol.esitpa.org>)

Origine du blé dur

Les blés sauvages tétraploïdes sont largement répandus au Proche-Orient, où les humains ont commencé à les récolter dans la nature (Bozzini, 1988). Comparativement aux blés diploïdes, leurs grands épis et leurs gros grains les rendaient beaucoup plus intéressants pour la domestication. On croit que le blé dur provient des territoires actuels de la Turquie, de la Syrie, de l'Iraq et de l'Iran (Feldman, 2001). Le blé dur est allotétraploïde (deux génomes : AABB), comptant au total 28 chromosomes ($2n=4x=28$), contenant le complément diploïde complet des chromosomes de chacune des espèces souches. Comme telle, chaque paire de chromosomes du génome Aa une paire de chromosomes homologues dans le génome B, à laquelle elle est étroitement apparentée. Toutefois, durant la méiose, l'appariement des chromosomes est limité aux chromosomes homologues par l'activité génétique de gènes inhibiteurs. Les chercheurs ont identifié un certain nombre de gènes inhibiteurs, mais le gène *Ph1* situé sur le long bras du chromosome 5B est considéré comme le gène inhibiteur critique (Wall *et al.*, 1971).

Exigence du blé

Un bon comportement de la culture durant tout son cycle de développement exige la réunion de certains facteurs qui conduisent à l'observation d'un meilleur rendement et parmi les exigences on peut citer :

Climat

Selon Clement et Prats(1970), les facteurs climatiques ont une action prépondérante sur les différentes périodes de la vie du blé.

Température

La température conditionne à tout moment la physiologie de blé selon le zéro de végétation et de germination : la température à partir de laquelle un blé germe et pousse, est de 0°C cependant l'optimum se situe entre 20 et 22 °C entre ces deux extrêmes, une température élevée sera favorable au développement et à la croissance (Simon *et al.*, 1989). Il est généralement admis que la température agit de manière positive sur la croissance optimale. Baldy (1993a) ajoute que les fortes températures provoquent une levée trop rapide et parfois

Chapitre 01. Introduction générale

un déséquilibre entre la partie aérienne et la partie souterraine : Les températures entre 25 et 32 °C défavorisent l'allongement racinaire l'optimum se situe entre 5 et 12 °C (Mekhlouf *et al.*,2001).

Le zéro de végétation du blé est de 0°C, mais ses exigences globales en chaleur sont assez importantes. Clement et Prats(1970) voient que la température journalière intervient à divers moments du cycle du blé de plusieurs manières :

- Elle détermine la rapidité de la germination et du début du développement de la jeune plante.
- Elle intervient au moment de la montaison dans l'élaboration de la quantité de matière sèche, mais elle a un effet défavorable sur l'évolution des talles vers l'épiaison (conditions de déficit hydrique).
- En excès et au cours de la maturation du grain, elle peut conduire à l'échaudage (Mekhlouf *et al.*,2001).

Eau

Selon Soltner(1990), l'eau a une grande importance dans la croissance de la plante. En plus de l'eau de constitution des cellules et de celle qui entre dans les synthèses glucidiques catalysées par la chlorophylle, l'eau est le véhicule des éléments minéraux solubles de la sève brute.

A cet égard, CLARKE et Mc CAIG (1982) voient qu'il est intéressant de déterminer la teneur relative en eau (RWC), c'est-à-dire mesurer le pourcentage d'eau présent dans la plante.

Les stress abiotiques

Les basses températures hivernales, les chaleurs extrêmes de l'été, la sécheresse, les radiations élevées, la salinité et la pollution de l'air et des sols ne sont que quelques exemples de ce à quoi une plante doit faire face. Dans l'environnement, des conditions qui génèrent des stress sont créées lorsque les paramètres environnementaux atteignent des valeurs extrêmes. Il peut en résulter des impacts importants sur la physiologie, le développement et la survie des plantes. Bien que la terminologie existante ne fasse pas l'unanimité chez tous les scientifiques, la définition qui peut être la plus pertinente d'un stress biologique serait: une

Chapitre 01. Introduction générale

force ou une influence hostile qui tend à empêcher un système de fonctionner normalement (Jones et Jones, 1989).

Avec le réchauffement climatique, la pression exercée par certains stress augmentera très certainement. La sécheresse, par exemple, est déjà l'un des principaux facteurs limitant la productivité des récoltes à l'échelle mondiale (Boyer, 1982; Bartelset Nelson, 1994). Augmenter la résistance des cultures au stress de sécheresse pourrait être l'approche la plus économique pour améliorer la productivité en agriculture et réduire l'utilisation des ressources d'eau douce (Xionget *al.*, 2006). Le stress oxydatif, quant à lui, peut être causé directement par les oxydants atmosphériques ou indirectement dans les réponses initiées par une multitude d'autres stress. Il est reconnu que le stress oxydatif représente aussi l'une des principales causes de la baisse de production en agriculture (Foyer etNoctor, 2005).

Définition de la sécheresse chez la plante.

La sécheresse provoque des dommages qui résultent de la dessiccation du protoplasme. La sortie de l'eau de la cellule provoque une augmentation de la concentration des solutés, entraînant des conséquences sérieuses tant sur le plan structural que sur le plan métabolique. L'intégrité des membranes et des protéines est également affectée par la dessiccation, ce qui entraîne des dysfonctionnements métaboliques. Les protéines cytoplasmiques et les organites peuvent ainsi subir d'importantes pertes d'activité ou être complètement dénaturés lorsqu'ils sont déshydratés. La photosynthèse et la croissance cellulaire sont parmi les premiers processus affectés lors de la sécheresse (Chaveset *al.*, 2008). L'effet peut être direct, comme la diminution de la disponibilité en CO₂ causée par la limitation de la diffusion dans le mésophylle (Flexaset *al.*, 2004; Flexaset *al.*, 2007), l'altération du métabolisme photosynthétique (LawloretCornic, 2002), ou par le stress oxydatif.

Lors de sécheresse, la déficience en CO₂ intracellulaire résulte en une sur-réduction des composantes de la chaîne de transport d'électrons et les électrons sont transférés à l'oxygène au niveau du photosystème I (PSI). Ce transfert mène à la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Lors de conditions sévères de sécheresse, le déclin de la photosynthèse est aussi dû à une diminution de l'activité de la ribulose 1,5 biphosphate carboxylase/oxygénase (RuBisCO) (MahajanetTuteja, 2005).

Bien que le stress hydrique soit généralement causé par une baisse d'humidité ou un manque de précipitation, il est aussi provoqué par le gel. Puisque le point de congélation de l'eau extracellulaire est plus élevé que celui de l'eau intracellulaire, le gel provoque la formation de

Chapitre 01. Introduction générale

cristaux de glace en premier lieu à l'extérieur de la cellule végétale. Le gradient de potentiel hydrique entre l'eau intra- et extracellulaire provoque le déplacement de l'eau intracellulaire vers l'extérieur de la cellule, ayant pour conséquence une déshydratation. C'est pourquoi la cellule réajuste la dimension de ses membranes au cours du gel (Steponkus, 1984). La diminution du volume cytoplasmique et la déshydratation à la surface des membranes (survenant de -4 à -10°C) peuvent aussi provoquer un rapprochement des membranes plasmiques et chloroplastiques. Puisque ces dernières ont une composition lipidique différente, un mélange se produit et on assiste à la formation de vésicules lipidiques mixtes de type phase hexagonale II. Lorsque la température redevient élevée, ces vésicules mixtes fusionnent aux différentes membranes et changent leur composition et leur fluidité, les rendant dysfonctionnelles et plus sensibles aux bris (Steponkus, 1984).

Les plantes possèdent divers mécanismes de résistance contre le stress hydrique. Lors d'un déficit en eau, les stomates se ferment, la biosynthèse d'osmolytes particuliers augmente, la balance de ces métabolites et la consommation, le partitionnement et la séquestration des ions change, la composition des membranes est modifiée, et une cascade de signalisation est initiée (Bohnert *et al.*, 1995). La réponse d'acclimatation lors du stress de sécheresse inclut aussi l'inhibition de la croissance et la desquamation des feuilles, ce qui restreint la dépense en eau des tissus sources et aide à maintenir le statut en eau et l'assimilation de CO₂ chez la plante. Les composés osmotiques comme les sucres et autres osmolytes sont aussi produits en réponse à une lente induction de la déshydratation, et ont une fonction dans le maintien de l'activité métabolique des tissus.

Une des difficultés pour analyser l'état des connaissances sur les réactions des plantes à la sécheresse est la grande diversité de définitions. Pour le grand public, mais aussi pour une majorité des études de biologie moléculaires, sécheresse implique symptômes sévères et mort possible de la plante. Une plante tolérante à la sécheresse est, dans cette acception, celle qui survit à ces situations de stress sévère.

La définition est toute autre pour un agriculteur ou un agronome, pour lequel une sécheresse est définie par tout manque d'eau qui ne permet pas aux plantes cultivées d'exprimer le rendement qui serait attendu en situation favorable, ou qui peut affecter la qualité des produits récoltés. On se situe alors sur des échelles de temps longues, les quelques mois d'un cycle cultural, pendant lesquels les plantes ont eu le temps d'adapter leur structure et leur physiologie. Une plante tolérante pour un agriculteur est celle qui permet d'atteindre une production aussi élevée que possible dans un scénario donné de sécheresse. (Tardieu, 2003).

La sécheresse est parmi les facteurs les plus invoquées pour expliquer la faiblesse et la variabilité des rendements des céréales. Le rendement d'une culture sera affecté en fonction de l'intensité du déficit et de sa position dans le cycle de la plante. On a tendance à identifier la sécheresse au stress hydrique ; la sécheresse possède un rapport à un aspect climatique, et le stress hydrique plutôt physiologique (Ait-kaki ,1993 ; Baldy ,1993b).

Conséquences de la sécheresse sur le fonctionnement des plantes.

Photosynthèse et transpiration

Le gaz carbonique (CO₂) de la photosynthèse pénètre dans les feuilles par les stomates, qui contrôlent aussi la transpiration. La fermeture des stomates qui permet de maintenir l'état hydrique foliaire diminue donc la photosynthèse, et donc la production des plantes. Une controverse existe depuis plusieurs années sur les parts stomatique et biochimique de la réduction de la photosynthèse en cas de déficit hydrique. Dans une grande gamme de déficits hydriques compatibles avec l'activité agricole, la part stomatique est probablement la plus importante (Cornicet *al.*, 2002). La diminution de la photosynthèse a des conséquences sur le métabolisme du carbone, et certaines enzymes impliquées dans la circulation des assimilats sont régulées en réponse au déficit hydrique (Zinselmeyer *et al.*, 1999 ; Kim *et al.*, 2000).

Cependant, le rapport photosynthèse / transpiration, nommé efficacité de l'eau, varie avec les conditions environnementales et a une variabilité génétique importante. L'efficacité de l'eau varie d'une part avec les conditions climatiques, d'autre part avec l'espèce. Farquhar *et al.*, (1982) ont montré l'utilisation possible de la discrimination de l'isotope lourd du carbone (¹³C) par rapport à son isotope léger (¹²C) pour évaluer directement l'efficacité de l'eau qui peut alors être mesurée facilement avec un spectromètre de masse. Des mesures directes peuvent également être effectuées.

- On observe de grandes différences entre espèces pour un climat donné, avec une efficacité maximale chez certaines espèces disposant d'un métabolisme dit C₄ (maïs, sorgho), et une variabilité génétique importante à l'intérieur de chaque espèce (Condon *et al.*, 2004).
- Pour un génotype donné, l'efficacité de l'eau est d'autant plus faible que la demande climatique est plus importante, puisque la plante transpire plus.

Chapitre 01. Introduction générale

Une conséquence importante des réductions de photosynthèse en cas de sécheresse est la synthèse de composés toxiques oxydants dans les cellules. Si l'énergie solaire captée par les photosystèmes de la feuille n'est plus utilisée entièrement par la photosynthèse, des formes toxiques de l'oxygène peuvent apparaître, radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}). Ces radicaux sont les mêmes que ceux qui causent le vieillissement des cellules végétales et animales, en provoquant la peroxydation des lipides et la dénaturation des protéines et de l'ADN. Différents mécanismes permettent de contrecarrer cette accumulation de radicaux toxiques. Un premier consiste à dissiper l'énergie lumineuse sous forme de chaleur. Les caroténoïdes sont impliqués dans ce mécanisme *via* le cycle des xanthophylles (Munné-Bosch et Alegre, 2000). Un deuxième mécanisme est la détoxification, qui consiste à empêcher l'accumulation d'hydroxyles en intervenant à différentes étapes de leur formation. Les superoxydes dismutases (SOD) produisent H_2O_2 à partir des superoxydes et H_2O_2 peut ensuite être éliminé par des catalases ou par le cycle ascorbate-glutathione. Les catalases sont induites par H_2O_2 , des ascorbates peroxydases sont induites par différents stress dont l'ABA, l'éthylène, la sécheresse (Inze et van Montagu, 1995), et des SOD sont induites par la sécheresse et l'ABA (Guan et Scandalios, 1998 ; Kaminaka *et al.*, 1999).

Limitation de l'alimentation minérale par un déficit hydrique

La sécheresse altère les besoins en azote des cultures puisque ceux-ci croissent avec la biomasse produite. La conséquence immédiate de la sécheresse est donc de réduire la demande en azote minéral du sol. Il s'ensuit qu'après des épisodes de sécheresse la quantité d'azote minéral dans le sol est relativement plus élevée et la lixiviation (entraînement de solutés vers les nappes par l'eau qui draine) peut être plus importante si le sol reste nu. Il faut ajouter à cela la mortalité des racines durant la période sèche, qui peut libérer encore davantage d'azote dans le sol. Cependant le déficit hydrique induit un déficit de nutrition azotée (Garwood et Williams, 1967 ; Van Keulen, 1981 ; Lemaire et Denoix, 1987), qui provient principalement des réductions de flux d'azote à la racine, et secondairement des réductions des capacités d'absorption par les racines et de la réduction du transport entre les parties souterraines et racinaires du fait de la chute de la transpiration. Les flux convectifs dans le sol (liés au transfert d'eau vers les racines) sont directement liés à la transpiration et faute de ce réapprovisionnement, la quantité d'azote de la rhizosphère est alors susceptible de devenir limitante. Les flux diffusifs (liés à la diffusion de solutés dans l'eau du sol) dépendent de l'humidité du sol qui détermine la porosité capable de transporter les solutés et de la

Chapitre 01. Introduction générale

densité racinaire (Van Keulen, 1981). Enfin, on ne sait pas avec certitude, à ce jour, pourquoi certaines espèces montrent des états de nutrition azotée optimale en sec (sorgho, dactyle aggloméré) alors que chez d'autres (blé, fétuque élevée...) ils se révèlent très sensibles (Bassirad *et al.*, 1999 ; James et Richards, 2005 ; Gonzalez Dugo, 2006) si bien que le stress azoté se combine au déficit hydrique (Sadras, 2005). Enfin, chez les légumineuses qui fixent l'azote de l'air, la haute sensibilité de la fixation symbiotique de l'azote (Durand *et al.*, 1987) entraîne le plus souvent des déficits de nutrition azotée du même ordre que chez les plantes alimentées essentiellement à partir de l'azote en solution dans le sol (Lemaire *et al.*, 1989).

Limitation de la croissance des organes reproducteurs

De la même manière que pour les organes végétatifs, tant la croissance des jeunes organes reproducteurs (ovules, puis fleurs puis grains) que leur nombre, définis par des processus de ramification, sont limités en cas de déficit hydrique (Robelin, 1963 ; Hileret *et al.*, 1972 ; Chapman et Edmeades, 1999 ; Fonseca et Westgate, 2005). Il s'ensuit une réduction du nombre de grains et donc du rendement.

Objectif du travail

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Introduction

Les plantes sont au cours de leur vie constamment confrontées à différentes agressions causées par des organismes vivants, sources de stress biotiques et des variations environnementales regroupées sous le terme de stress abiotiques. Au cours de l'évolution, l'ensemble de ces contraintes a conduit à la mise en place des stratégies de défense permettant une meilleure adaptation des plantes à leur environnement. Ce processus fait intervenir une large combinaison de facteurs morphologiques, physiologiques et biochimiques (Monneveux et Belhassen, 1997).

Lorsque la plante est confrontée à un changement environnemental potentiellement altérant, les mécanismes de défense mis en œuvre permettent dans la plupart des cas de lutter efficacement contre ce stress. Ce processus est qualifié d'interaction incompatible et la plante est résistante. Toutefois, il arrive que ces défenses soient inefficaces, car déclenchées trop tard ou bloquées par le stress. L'interaction est alors dite compatible et la plante est sensible.

Les besoins de la plante se limitent à l'eau et aux substances minérales du sol, ainsi qu'à CO_2 et O_2 de l'atmosphère. Sa matière fraîche est composée d'environ 70 à 80% d'eau (Heller *et al.*, 1993). L'eau peut être perdue par toutes les surfaces de la plante, cependant les stomates demeurent la principale voie d'émission de la vapeur d'eau (85 à 100%). Les stomates sont des ouvertures microscopiques dans l'épiderme des feuilles permettant la transpiration et assurant les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère.

La transpiration se manifeste par une perte d'eau sous forme de vapeur d'eau entraînant un refroidissement des tissus de la plante. Près de 98% de l'eau absorbée par la plante est perdue par la transpiration. Cette perte est inévitable car les stomates doivent s'ouvrir pour permettre l'entrée du CO_2 et assurer la photosynthèse. De plus, elle entraîne une absorption supplémentaire d'eau et favorise l'absorption et la circulation des éléments minéraux. Les stomates se ferment dès que, pour une cause ou pour une autre (sécheresse de l'air, température excessive, baisse de l'absorption par l'effet du froid, etc.), le déficit hydrique devient trop important. L'eau participe à la qualité et au rendement de la production agricole. L'irrigation vient compenser le manque ou l'insuffisance d'eau lorsque le contexte climatique ne le permet pas.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

En situation de déficit hydrique, la plante ferme ses stomates pour réduire ses pertes en eau (Tardieu et Dreyer, 1997). Cette fermeture va entraîner des modifications morphophysiologiques et biochimiques. L'entrée du CO₂ est également verrouillée lors de cette fermeture, entraînant une perturbation de l'activité photosynthétique et respiratoire.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiological, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans ce travail est le blé dur de la famille des Poacées plus précisément *Triticum durum Desf.* Les organes choisis pour réaliser cette étude sont les feuilles, tiges et racines. Les échantillons proviennent de l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales (OAIC) d'El Hadjar, Annaba, Algérie. Nous avons utilisé la variété GTA dur.

Conduite des essais

Les essais sont menés au niveau du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université de Annaba et au Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. Les graines sont méticuleusement choisies avant leur utilisation. (Pas de cassures ni signes apparents de maladies). Après 4 jours de germination, les germes de blé subissent un stress hydrique par arrêt d'arrosage et des échantillons de blé sont analysés au 3, 5, 7 et 9^{ème} jour après arrêt de l'arrosage. Une partie continue à être arrosée normalement et est considérée comme témoin.

La germination a lieu à une température de jour 21°C et de nuit 17-21°C avec un éclairage artificiel de 6 H à 22 H.

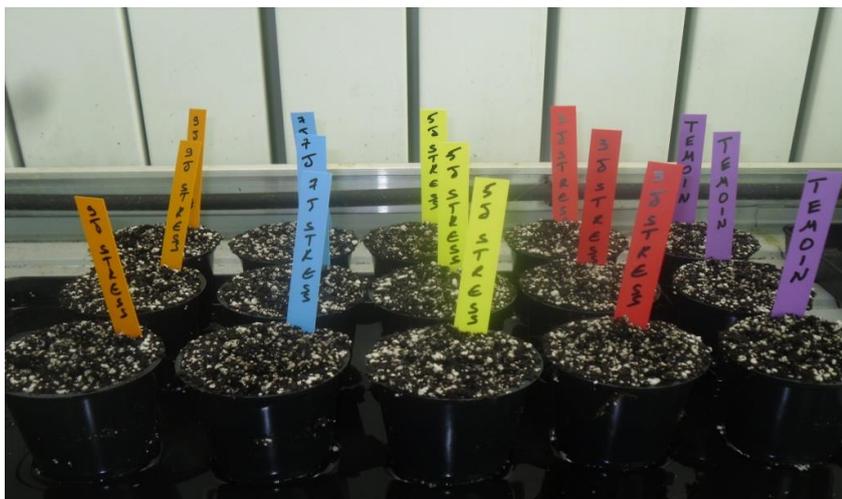


Figure 2. Présentation de l'essai.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiological, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

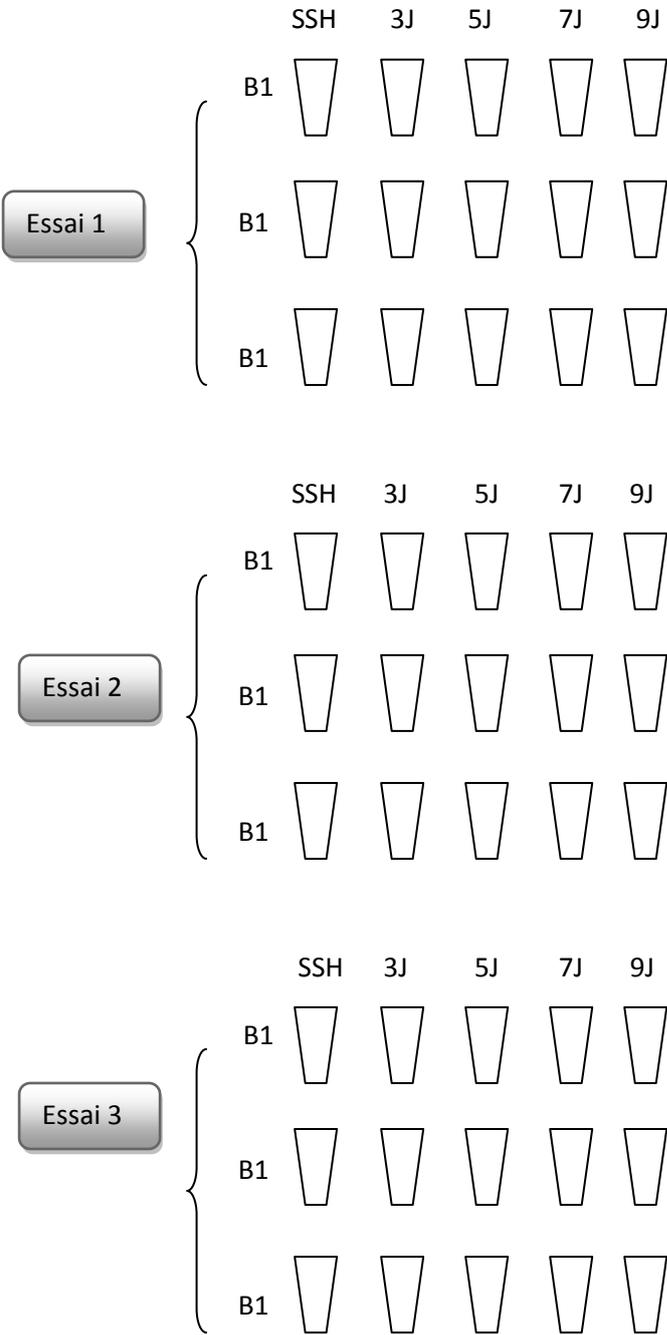


Figure 3. Dispositif expérimental de l'essai.
B : Bloc ; ASH : Avec Stress Hydrique ; SSH : Sans Stress Hydrique.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Paramètres mesurés

Paramètres morphométriques.

Nombre Moyen des Racines (NMR).

Le nombre moyen de racines est déterminé en fonction des temps choisies (3, 5, 7, 9 jours) avec ou sans stress hydrique.

Longueur Moyenne des Racines (LMR).

Les paramètres d'élongation racinaires sont déterminés sur les racines principales, à l'aide d'un mètre ruban en fonction des temps choisies (3, 5, 7, 9 jours) avec ou sans stress hydrique.

Longueur Moyenne des Tiges (LMT).

Les paramètres d'élongation des tiges sont déterminés à l'aide d'un mètre ruban en fonction des temps choisies (3, 5, 7, 9 jours) avec ou sans stress hydrique.

Poids frais (PF).

Le poids frais des tiges et des racines est déterminée à l'aide d'une balance de précision en fonction des temps choisies (3, 5, 7, 9 jours) avec ou sans stress hydrique.

Poids sec (PS).

Après avoir séché les échantillons dans une étuve pendant 48h, le poids sec des tiges et des racines est déterminée à l'aide d'une balance de précision en fonction des temps choisies (3, 5, 7, 9 jours) avec ou sans stress hydrique.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Paramètres physiologiques.

Turgescence relative en eau (RWC).

La turgescence relative en eau est déterminée par le pourcentage d'eau présent dans les tiges excisées et immergées dans l'eau pendant 2 heures, selon la méthode de Clarke et Mc Caig (1982) qui est également utilisée par Rascio (1988). Le calcul se fait selon Ladiges (1975).

$$\text{RWC} = \frac{\text{FW} - \text{DW}}{\text{TW} - \text{DW}} \times 100$$

RWC : Relative water content.

FW : Poids frais (Fresh weight).

DW: Poids sec (Dry weight).

TW : Poids à la turgescence (Turgid weight)

Mesure de la surface foliaire (SF)

La surface foliaire est estimée par la méthode de Paul *et al.* (1979) qui consiste à

- placer la feuille sur du papier calque
- découper les contours de la feuille
- peser la partie du calque représentant la feuille (Pf)
- déterminer par peser le poids (Pq) correspondant à une surface Sq connue d'un carré du même papier calque
- déduire la surface de la feuille Sf par la formule suivante : $Sf = (Pf * Sq) / Pq$.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Mesure des chlorophylles \underline{a} , \underline{b} et $(\underline{a}+\underline{b})$.

L'extraction de la chlorophylle \underline{a} est effectuée, selon la méthode de (Holden, 1975), basée sur une macération du végétal dans de l'acétone le traitement des échantillons se fait comme suit :

- 100mg (pour chaque essai prélevé sur les tiers médians des plus jeunes feuilles, sont broyés dans de l'acétone à 80% et environ 100mg de bicarbonate de calcium (CaCO_3) ;
- Après broyage total, la solution est ensuite filtrée et mise dans des boîtes noires, afin d'éviter l'oxydation des chlorophylles par la lumière.
- La lecture se fait aux deux longueurs d'onde 645 nm et 663 nm, après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin d'acétone à 80%.
- La formule relative au solvant, nous permet de calculer les valeurs des chlorophylles.

(Arnon, 1949).

- $\text{Chl } \underline{a} = 12,70.\text{DO} (633) - 2,69.\text{DO} (645).$
- $\text{Chl } \underline{b} = 22,90.\text{DO} (646) - 4,60.\text{DO} (663).$
- $\text{Chl } (\underline{a}+\underline{b}) = 8,02.\text{DO} (663) + 20,20.\text{DO} (645).$

Mesure du métabolisme respiratoire (MR)

Le métabolisme respiratoire est évalué par la mesure de l'intensité respiratoire (IR) des racines isolées de blé dur. L'intensité respiratoire est suivie à l'aide d'une électrode à oxygène de Clarck (Hansatech Ltd, Kinj's Lym, U.K) (Figure 03) couplée à un ordinateur. Le milieu réactionnel renferme de l'eau distillée additionnée de tampon (phosphate 10 mM) ajusté à pH 7,2 et 0,5 à 1g de racines isolées.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

La cellule en verre, d'un volume réglable de 1 à 2 ml est thermostatée à $25^{\circ}\text{C} \pm 0,02^{\circ}\text{C}$. La concentration initiale en oxygène du milieu d'électrode en équilibre avec l'atmosphère est de 240 μmoles (Djebar et Djebar, 2000).

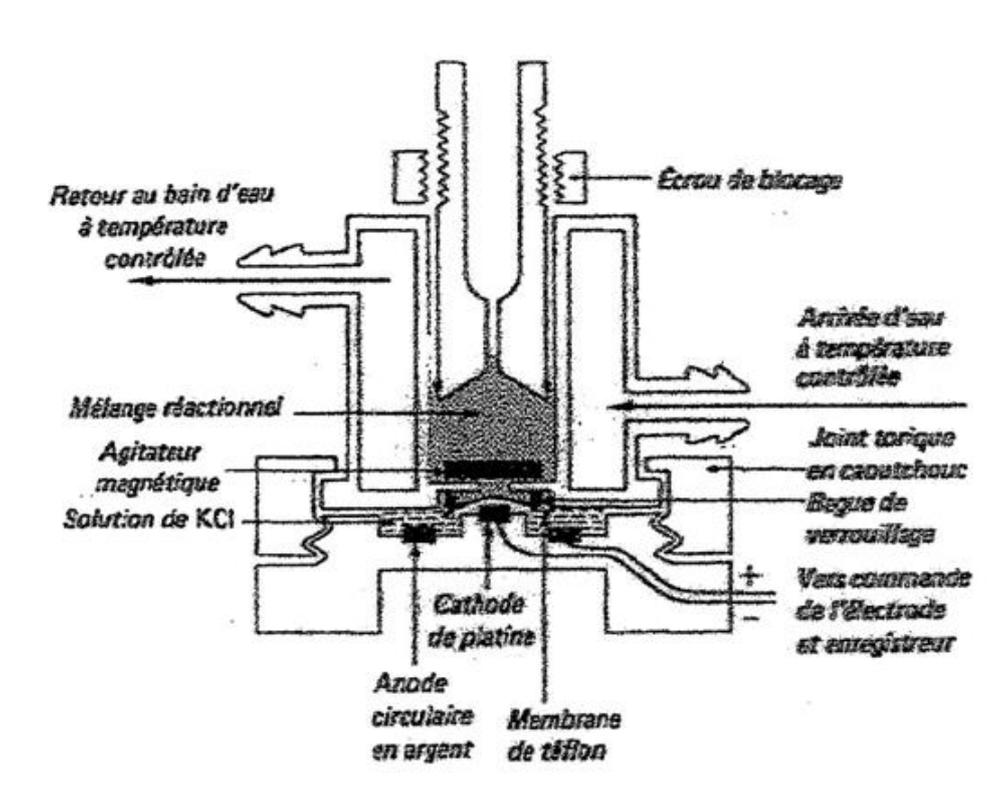


Figure 4. Schéma de l'Electrode à Oxygène (Djebar et Djebar, 2000).

Paramètres biochimiques.

Mesure des protéines totales.

Les protéines totales des tiges et des racines de *Triticum durum* sont mesurées selon la méthode de Bradford (1976), utilisant l'albumine de sérum de bœuf (BSA) comme standard (Merk). La gamme d'étalonnage est réalisée à partir d'une solution mère de BSA (1mg/ml).

Le dosage des protéines des tiges et des racines est effectué avec une fraction aliquote de 100 μl .

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Les densités optiques sont mesurées grâce à un spectrophotomètre (Jenway- 6300), la mesure est réalisée à une longueur d'onde de 595 nm.

Dosage de la proline.

La technique de mesure de la proline utilisée est celle de Troll et Lindsley (1955), modifiée par Dreier et Goring (1974). Pour chaque échantillon, prélever 100 mg de matière végétale fraîche, pesée juste après leur prélèvement, introduite ensuite dans des tubes à essai propres auxquels sont ajoutés 2ml de méthanol 40%. L'ensemble est porté à 85°C dans un bain marie pendant une heure. Après refroidissement on prélève 1ml de la solution, auquel on ajoute 1ml d'acide acétique (CH₃COOH) et 1ml de mélange contenant (120ml d'eau distillée + 300ml d'acide acétique + 80ml d'acide orthophosphorique) et 25mg de ninhydrine. Les solutions sont portées à ébullition pendant 30 min, elles virent au rouge ; après refroidissement, on ajoute 5ml de toluène, et on procède à une agitation, deux phases se séparent : Une phase inférieure sans proline et une phase supérieure qui contient la proline. Cette phase est ensuite récupérée et déshydratée par l'adjonction de Na₂SO₄. On procède enfin à la détermination des densités optiques des échantillons à la longueur d'onde 528 nm, après étalonnage de l'appareil par mélange (acide acétique, eau distillée, acide orthophosphorique et ninhydrine).

Dosage des sucres solubles.

Le dosage des sucres est réalisé selon la méthode de Schields et Burnet (1960) qui utilise l'anthrone en milieu sulfurique comme réactif (150mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose à 50µg/ml. Cette méthode comprend l'extraction où 100mg d'échantillon (MF) sont pesés. On ajoute ensuite 3ml d'éthanol à 80%, on laisse le mélange à une température ambiante pendant 48h environ. On chauffe au bain Marie à 70°C, pendant 30 min, et on prélève 2ml d'extrait pour le dosage. Le dosage des sucres totaux est effectué dans une fraction aliquote (100) µl). Les absorbances sont mesurées grâce à un spectrophotomètre (Jenway- 6300) et la lecture est réalisée à une longueur d'onde de 585nm.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Paramètres histologiques.

Pour compléter l'étude morphophysiologique et biochimique comparant les quantités de plusieurs molécules photosynthétiques, osmoprotecteurs et biomarqueurs de stress présents dans notre modèle végétal, il nous paru important de mener une étude sur les tissus de cette plante.

Les coupes histologiques.

Les coupes histologiques sont effectuées sur des feuilles de blé dur avec ou sans stress hydrique, il est important qu'elles soient très fines et d'une épaisseur identique. Les solutions utilisées pour la coloration sont : Eau de javel : Pour vider les cellules de leur contenu cytoplasmique, Acide acétique à 20% : Pour neutraliser l'excès d'eau de javel et Solution alcoolique de vert d'iode : Afin de colorer les parois lignifiées en vert, bleu ou violet. Selon le degré d'altération des parois, Solution de carmin (ou rouge congo) : Coloration des parois cellulosique en rose. Le montage des échantillons est effectué entre lame et lamelle. Ils sont ensuite prêts pour l'observation microscopique. (Chaker, 2003).

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Résultats

Effet du stress hydrique sur les paramètres morphophysiologiques

Effet du stress hydrique sur les variations du nombre moyen des racines (NMR).

La figure 5 représente les effets du stress hydrique sur les variations du nombre moyen des racines.

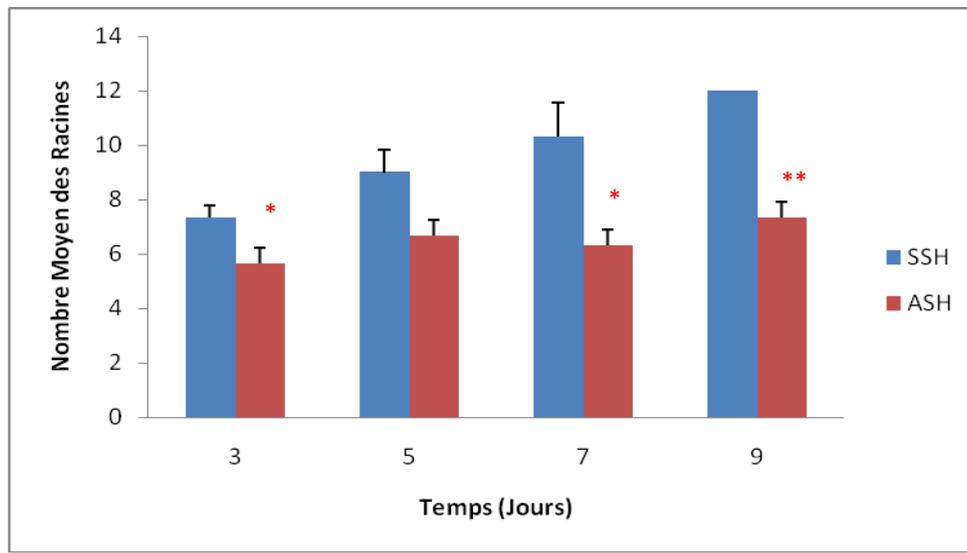


Figure 5. Effet du stress hydrique sur les variations du nombre moyen des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique

La figure ci-dessus montre une augmentation du nombre moyen des racines chez les témoins du 3^{ème} jour au 9^{ème} jour. Par on note une diminution chez les graines stressées. Cette diminution est de 40% le 9^{ème} jour de stress.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologicals, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les variations de la longueur moyenne des racines (LMR).

La figure 6 représente les effets du stress hydrique sur les variations de la longueur moyenne des racines.

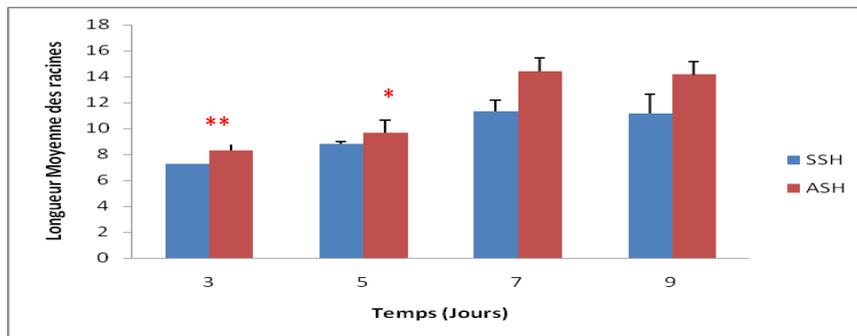


Figure 6. Effet du stress hydrique sur les variations de la longueur moyenne des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique

On observe une élévation importante tout au long du stress induit, en effet, la longueur moyenne des racines est en augmentation assez importante pour les échantillons stressés par rapport aux témoins. (environ 20%)

Effet du stress hydrique sur les variations de longueur moyenne des tiges (LMT).

La figure 7 représente les variations de la longueur moyenne des tiges.

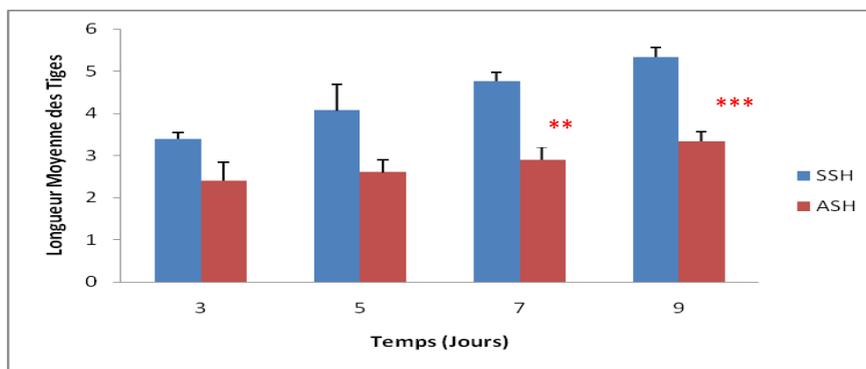


Figure 7. Effet du stress hydrique sur les variations de longueur moyenne des tiges.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

On enregistre une augmentation de la longueur moyenne des tiges du 3^{ème} au 9^{ème} jour chez la variété arrosée normalement. Par contre, on note une diminution chez les graines stressées. Cette diminution est plus nette le 5, 7 et 9^{ème} jour où elle atteint 40%.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiological, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais de la tige.

La figure 8 représente les effets du stress hydrique sur les variations du poids frais de la tige.

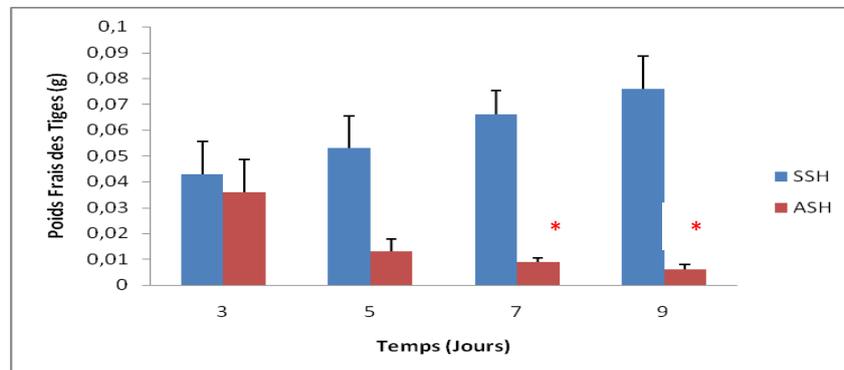


Figure 8. Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais de la tige.

SSH : Sans Stress Hydrique ; **ASH :** Avec Stress Hydrique.

On constate une augmentation du 3^{ème} au 9^{ème} jour du pourcentage d'eau chez la variété arrosé. Par contre, on enregistre une chute du pourcentage d'eau au niveau des tiges stressées. Cette chute devient de plus en plus nette au fur et à mesure que le niveau de stress s'accroît. La chute est de 85% le 9^{ème} jour de stress.

Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec de la tige.

La figure 9 représente les effets du stress hydrique sur les variations du poids sec de la tige.

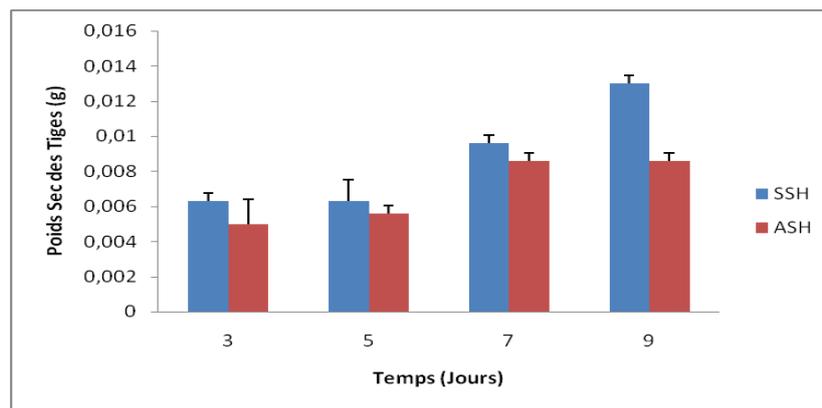


Figure 9. Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec de la tige.

SSH : Sans Stress Hydrique ; **ASH :** Avec Stress Hydrique.

Les résultats relatifs au poids sec des tiges arrosées montrent une augmentation du 3^{ème} au 9^{ème} jour. Par contre, on note une baisse chez les tiges stressées où elle atteint 30%.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais des racines.

La figure 10 représente les Effets du stress hydrique sur les variations du poids frais des racines.

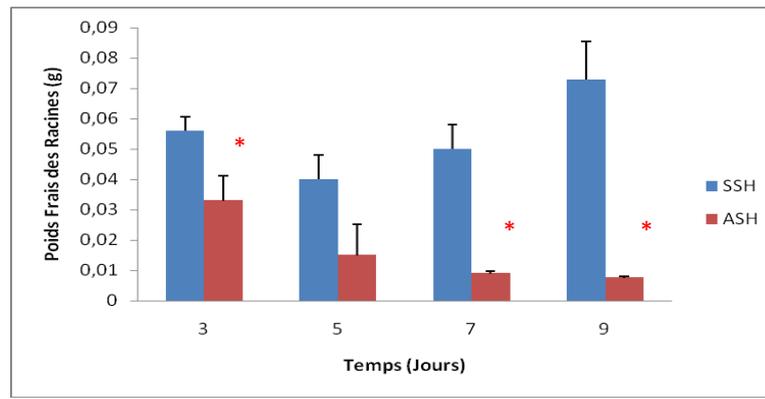


Figure 10. Effet du stress hydrique sur les variations du poids frais des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

La figure montre une augmentation du poids frais des racines chez les témoins. Par contre, on constate une diminution significative chez les racines stressées. Cette diminution atteint 80%.

Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec des racines.

La figure 11 représente les effets du stress hydrique sur les variations du poids sec des racines.

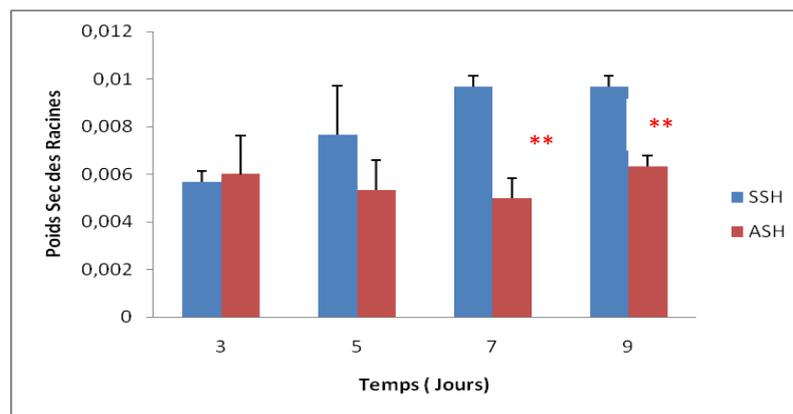


Figure 11. Effet du stress hydrique sur les variations du poids sec des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

La mesure du poids sec des racines sans stress hydrique montre une augmentation du 3^{ème} au 9^{ème} jour. Par contre on note une nette diminution au-delà du 3^{ème} jour chez les racines stressées. Cette diminution est plus de 30% à partir du 7^{ème} jour.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiological, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes relatives en eau (RWC)

Turgescence Relative en Eau au niveau des tiges(RWC).

Les figures 12 et 13, représentent les effets du stress hydrique sur la turgescence relative en eau (RWC), déterminées par le pourcentage d'eau présent dans les tiges et les racines.

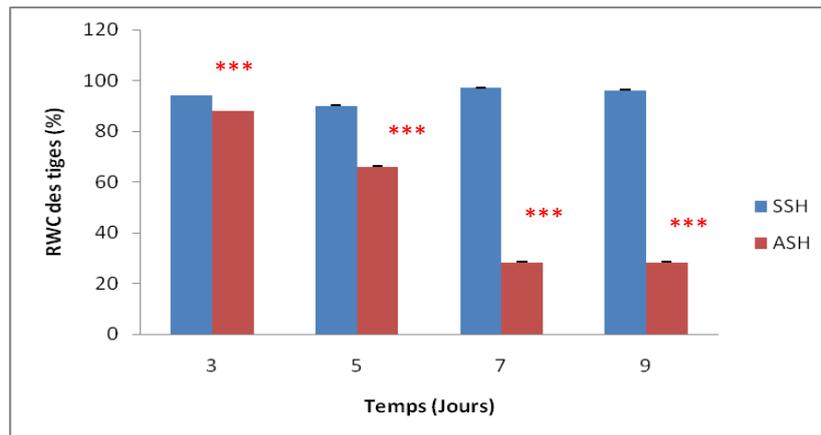


Figure 12. Turgescence Relative en Eau (RWC) au niveau des tiges.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

Turgescence Relative en Eau au niveau des racines(RWC).

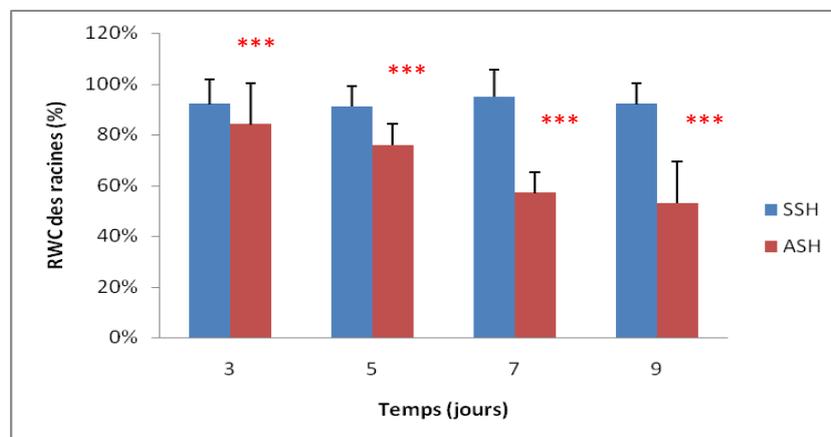


Figure 13. La Turgescence Relative en Eau (RWC) au niveau des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

Nous constatons que la teneur relative en eau augmente chez les témoins. Par contre, on constate une diminution chez les tiges et les racines soumises à un stress hydrique. La diminution dépasse les 50% à partir du 7^{ème} jour chez les deux organes.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiological, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les variations de la surface foliaire.

Les effets du stress hydrique sur les variations de la surface foliaire sont représentés par la figure 14.

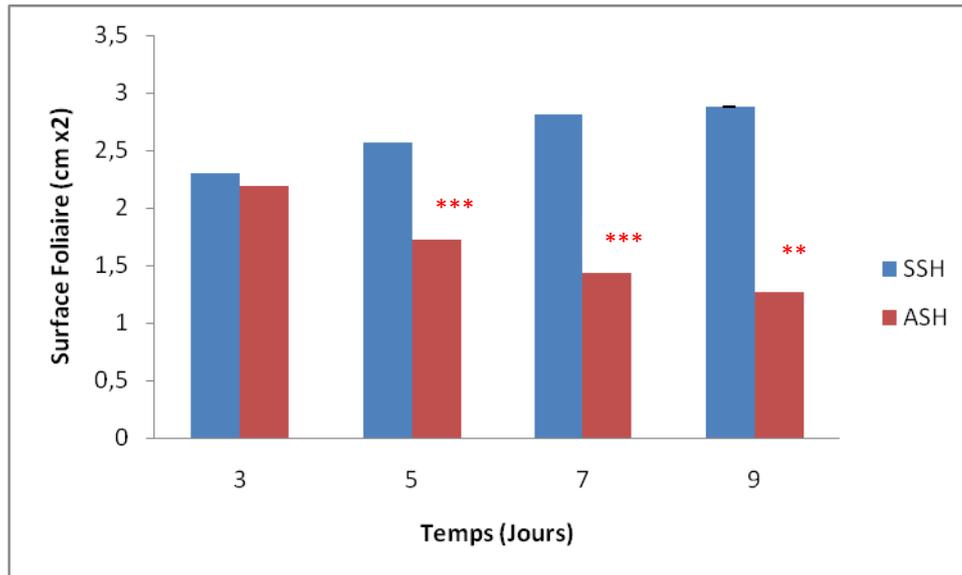


Figure 14. Effet du stress hydrique sur l'évaluation de la surface foliaire.

SSH : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Les résultats illustrent que la surface foliaire continue à augmenter chez les graines arrosées. Par contre, le déficit en eau entraîne une diminution progressive de celle-ci, jusqu'à atteindre 50% de la surface initiale.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en chlorophylle a, b et (a+b)

Effet du stress hydrique sur la chlorophylle a.

La figure 15 représente les effets du stress hydrique sur les variations de la teneur en chlorophylle a.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

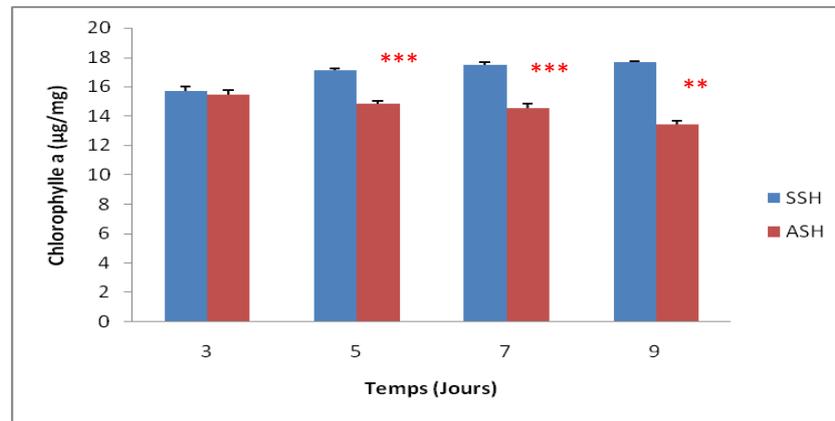


Figure 15. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs moyennes en chlorophylle a.
SSH : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Les résultats indiqués dans le graphe ci-dessus montrent au 3^{ème} jour une augmentation de la teneur moyenne en chlorophylle a chez les témoins. Par contre, on note une diminution chez les stressées à partir du 3^{ème} jour où elle atteint 30%.

Effet du stress hydrique sur la chlorophylle b.

La figure 16 représente les effets du stress hydrique sur les variations de la teneur moyenne en la chlorophylle b.

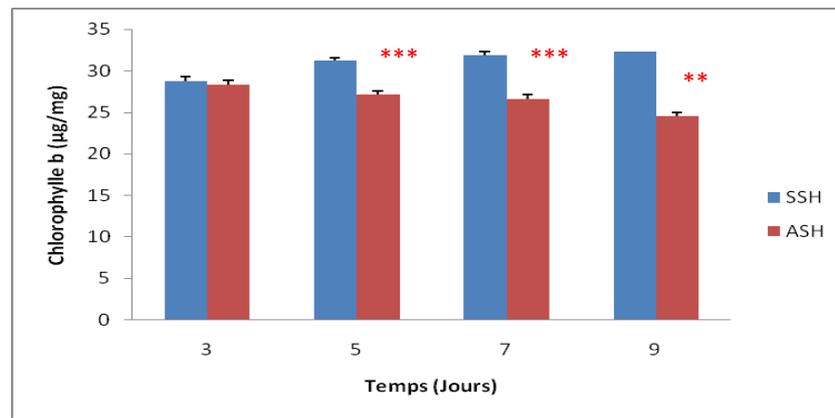


Figure 16. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs moyenne en chlorophylle b.
SSH : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

On enregistre le 3^{ème} jour une différence négligeable entre les graines soumises au stress hydrique et les graines arrosées normalement. Par contre, la différence devient plus importante à partir du 5^{ème} jour.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiological, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur la chlorophylle (a+b).

La figure 17 représente les effets du stress hydrique sur la chlorophylle (a+b).

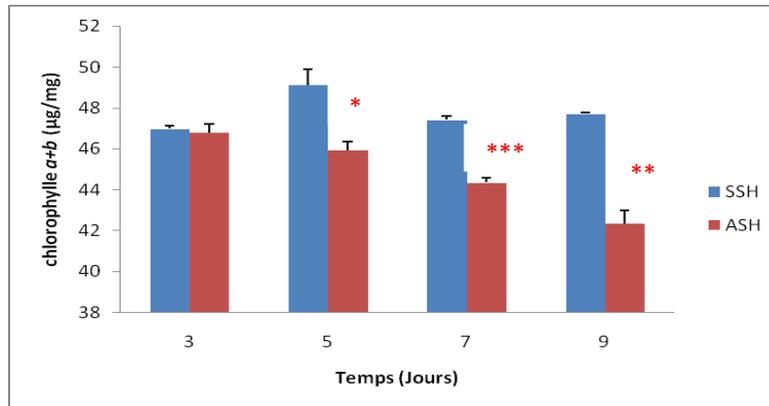


Figure 17. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs moyenne en chlorophylle (a+b). SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

Le graphe ci-dessus illustre peu de différence entre les graines stressées et les témoins, le 3ème jours. Par contre la différence dépasse les 25% à partir du 5ème jour.

Effet du stress hydrique sur la respiration des racines.

La mesure des variations de l'intensité respiratoire est représentée dans la figure 18.

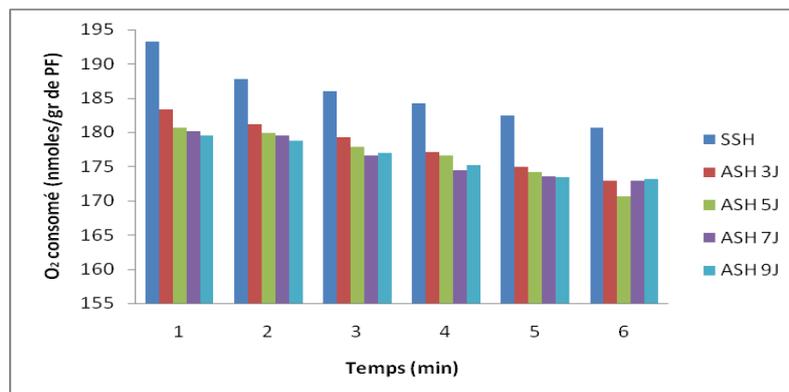


Figure 18. Effet du stress hydrique sur le métabolisme respiratoire des racines. SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

La figure montre une chute de l'intensité respiratoire chez les témoins et les stressées. La diminution est plus importante chez les racines stressées où elle atteint les 35%.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les paramètres biochimiques.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en protéines au niveau de la tige.

La figure 19 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en protéines au niveau de la tige.

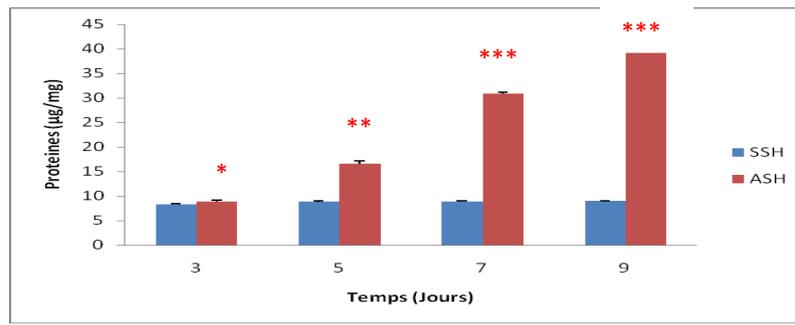


Figure 19. Effet du stress hydrique sur les variations teneurs moyennes en protéines au niveau de la tige. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

L'évolution des teneurs moyennes en protéines totales, extraites à partir de la tige montre qu'il y a une augmentation considérable du taux des protéines totales lors du stress hydrique. La quantité des protéines a augmenté plus de 80% le 9ème jours par rapport au 3ème jours.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en protéines au niveau des racines.

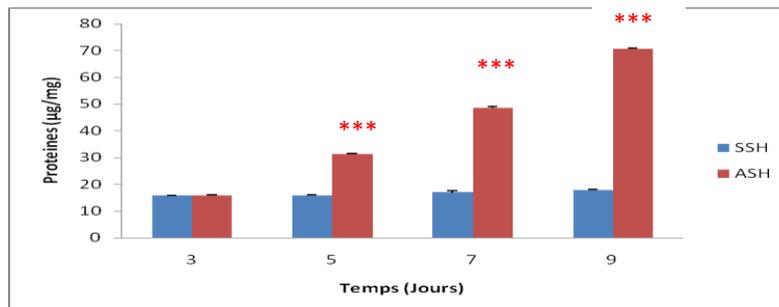


Figure 20. Effet du stress hydrique sur les variations des teneurs moyennes en protéines au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

L'évolution des teneurs en protéines totales, extraites à partir des racines monte le stress induit une stimulation des protéines totales produites aussi bien au 3ème jours que pour le 5, 7 et 9ème jours. Cette augmentation est de 85% le 9ème jour de stress.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en proline au niveau des tiges.

Les figures 21 et 22 représentent les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en proline au niveau des tiges et des racines.

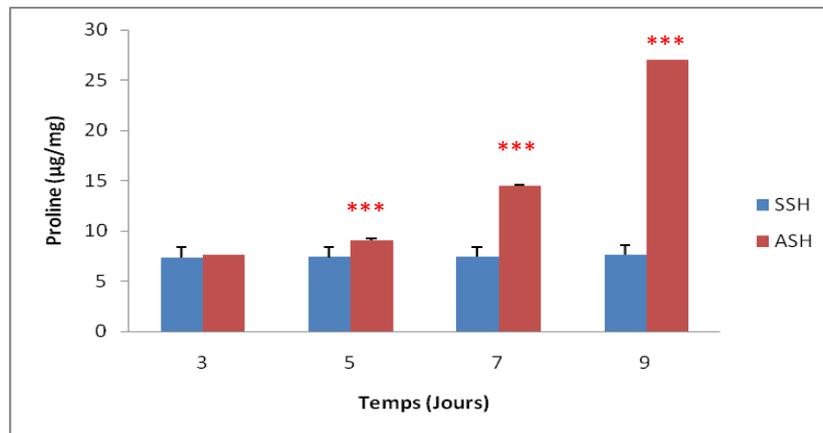


Figure 21. Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en proline au niveau des tiges.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en proline au niveau des racines.

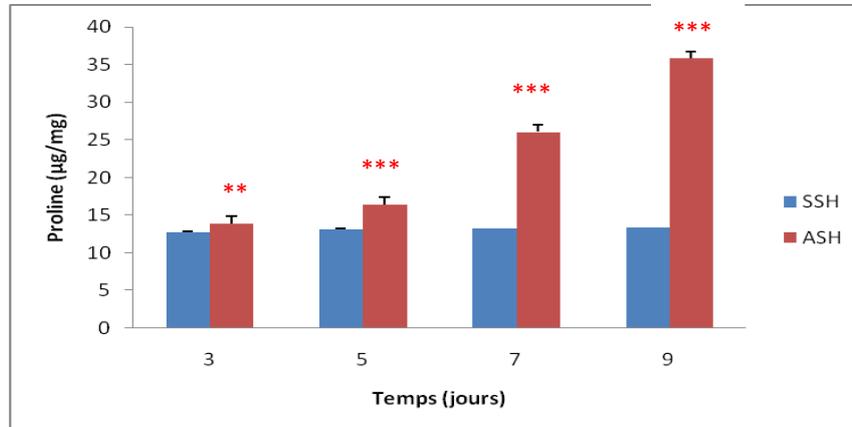


Figure 22. Effet du stress hydrique sur la teneur moyenne en proline au niveau des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

Le dosage de la proline chez les témoins montre une stabilité à partir du 3^{ème} jour. Par contre, on note une accumulation de la molécule chez les deux organes soumis à un stress hydrique. L'augmentation de la molécule dépasse 70% chez les tiges et les racines stressées par rapport aux témoins.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en sucres totaux au niveau des tiges.

Les figures 23 et 24 représentent les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en sucres totaux au niveau des tiges et des racines.

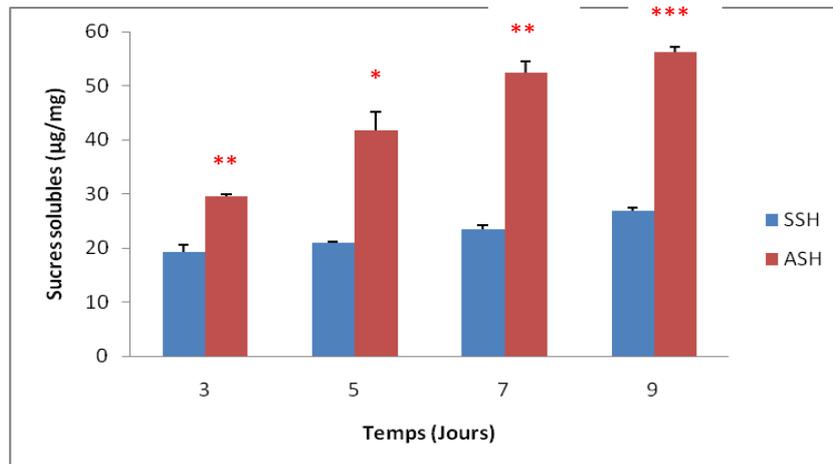


Figure 23. Effet du stress hydrique sur la teneur moyenne en sucres totaux au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Effet du stress hydrique sur les teneurs moyennes en sucres totaux au niveau des racines.

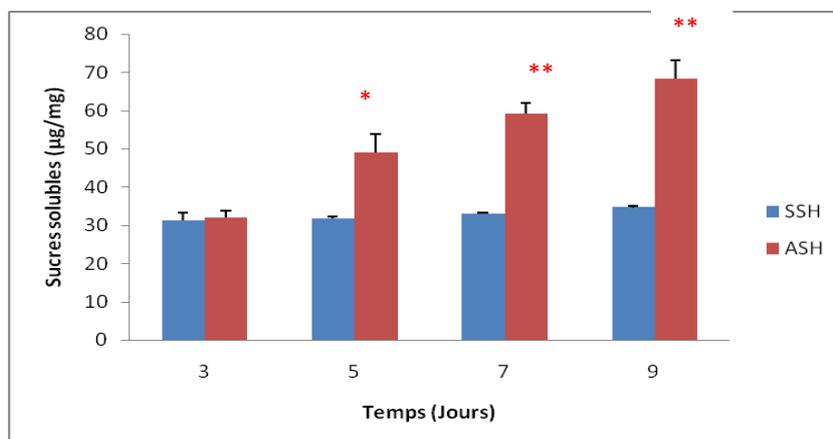


Figure 24. Effet du stress hydrique sur la teneur moyenne en sucres totaux au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Les figures 23 et 24 montrent aussi que les sucres totaux sont stables chez les témoins. Par contre, ils subissent une augmentation de la concentration en réponse au déficit hydrique au niveau des tiges et des racines. En effet, la concentration est plus de 50% chez les tiges les racines le 9^{ème} jour de stress.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiological, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Effet du stress hydrique sur les stomates.

La figure 25 représente les effets du stress hydrique sur les stomates.

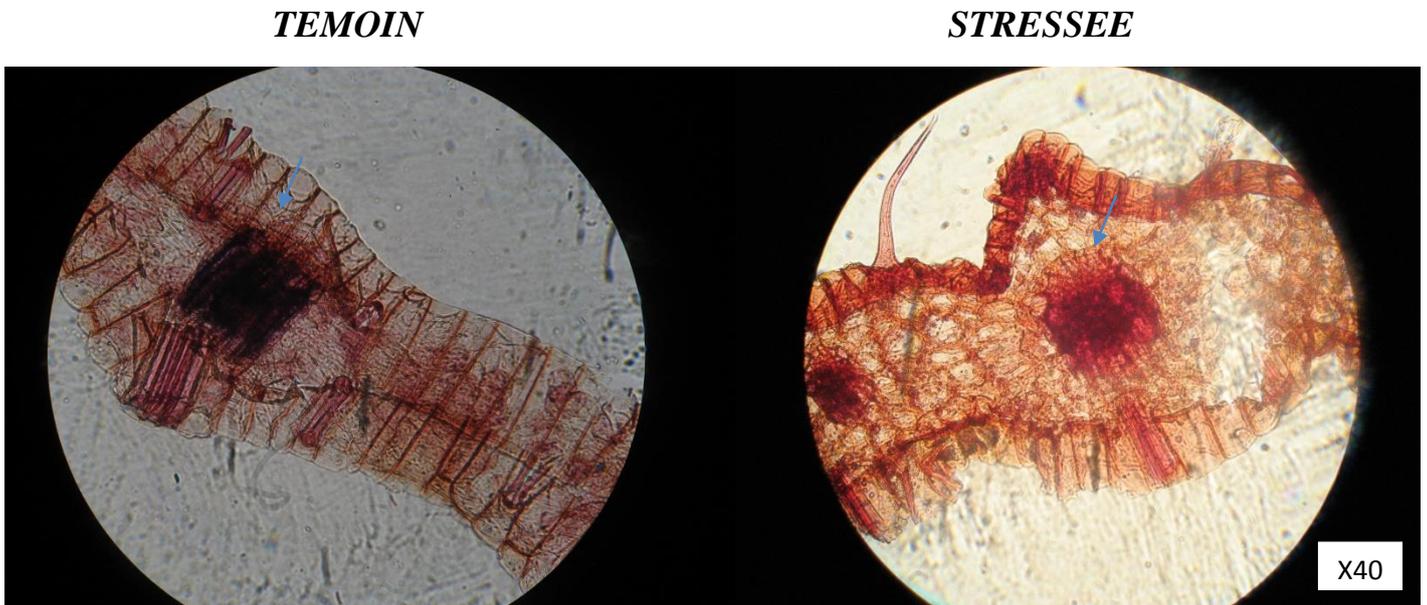


Figure 25. Etude caractéristique des stomates des feuilles de blé dur soumises à un stress hydrique. (Les fléchettes bleues représentent les stomates).

La figure ci-dessous montre que le déficit en eau entraîne une restriction des stomates des feuilles par rapport au témoin.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Discussion

Les résultats de l'étude de la réponse des plantes de blé dur de la variété GTA soumises à un stress hydrique montrent des modifications des paramètres morphologiques tels que la longueur moyenne des racines, nombre moyen des racines, longueur moyenne des tiges et le poids frais et sec des tiges et des racines.

Concernant la mesure de la longueur moyenne des racines principales, on constate que des racines deviennent plus longues en conditions hydriques limitées. Cette observation est en accord avec les résultats d'El Fakhri *et al.* (2010). Dans la littérature, l'aptitude à maintenir une longueur élevée des racines primaires sous stress hydrique est considérée comme une stratégie permettant une meilleure accessibilité à l'eau par la plante. Cependant, plusieurs auteurs accordent une attention particulière à la profondeur de l'enracinement (Lyunchk, 1993), permettant de chercher l'eau en profondeur lorsque sa présence est limitée dans les couches superficielles du sol (Brown, 1985 ; Clarke, 1992). Ceci serait vrai même si cette profondeur n'est atteinte que par une seule racine principale (Ali Dib, 1992).

Le stress limite le nombre moyen des racines et la longueur moyenne des tiges. Ainsi il affecte négativement le poids frais et sec des organes avec une réponse variable selon la durée du stress induit. Ce paramètre traduit une limitation de l'accessibilité de la plante aux réserves en eau et en éléments nutritifs du sol. Cette caractéristique est en accord avec les résultats obtenus par Simane *et al.* (1993) et Ali Dib *et al.* (1994) et en désaccord avec les travaux effectués par El Fakhri *et al.* (2010).

L'évolution de la turgescence relative en eau de la variété de blé dur montre que le stress hydrique entraîne une chute du pourcentage d'eau (RWC) présent au niveau des tiges et des racines. Cette chute devient de plus en plus nette au fur et à mesure que le niveau de stress s'accroît. Ce résultat est conforme avec les résultats obtenus par El Mourid (1988) et Casals (1996) qui ont également signalé que l'effet dépressif de la carence en eau sur l'état hydrique de la plante peut être irréversible, si la période de stress est prolongée.

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

Par ailleurs, l'arrêt de l'apport en eau entraîne une réduction de la surface foliaire des plantes sous stress hydrique (de 2,25 à 1,25 cm²) (en accord avec Wiegand *et al.*, 1983; Parry *et al.*, 2005 ; Lebon *et al.*, 2006), alors que la croissance foliaire se poursuit pour les plantes sous irrigation (de 2,30 à 3 cm²). Cette réduction de la surface foliaire des plantes sous stress hydrique diminue en fonction de la sévérité du stress. Selon Heuer et Nadler (1998), le manque d'eau affecte de façon significative la hauteur des plantes et la surface foliaire de la pomme de terre. De même, une étude menée par Penuelas *et al.* (1992) sur la culture de la fraise en serre montre que le déficit hydrique entraîne aussi une réduction de la surface foliaire. Ainsi, Chaves *et al.* (2000), Ferryra *et al.* (2004) et Lebon *et al.* (2006) montrent que le développement végétatif de la vigne cultivée sous conditions limitantes d'alimentation hydrique est fortement perturbé.

Le taux de chlorophylle indique qu'il y a des différences significatives dans la variation de la teneur moyenne en chlorophylle des plantes témoins et stressées. La teneur en chlorophylle chez les feuilles des plantes soumises au stress hydrique est au-dessous de celle des témoins. Nos résultats semblent concorder avec les travaux de Havaux (1988), Djekoun et Yekhleh (1996), qui montrent une réduction de la photosynthèse, vis-à-vis de la sécheresse. Cette réduction est liée, d'une part à la fermeture des stomates et (Johnson *et al.*, 1984) et d'autre part, à la réduction de l'activité photochimique du PSII (Farquhar et Sarhey, 1982). Tahri *et al.* (1997) enregistrent une diminution des teneurs en pigments chlorophylliens totaux (chl *a* et *b*) suite à un stress osmotique chez deux variétés de blé dur. (Hedegűs *et al.*, 2001).

Le déficit hydrique entraîne une inhibition de l'intensité respiratoire. Cet enregistrement est en accord avec Vartanian et Chauveau (1986). La chute enregistrée dans notre travail nous permet de suggérer que les mitochondries de la variété GTA dur ont été touchées par le déficit hydrique, et donc la respiration aussi a été affectée, plus l'intensité respiratoire est inhibée et plus la mitochondrie cesse de pomper l'ATP nécessaire à la détoxification. Selon Bensoltane, 2006, l'effet inhibiteur de la respiration des mousses et des lichens est expliqué par un découplage de la phosphorylation oxydative au niveau de la dernière étape de l'oxydation respiratoire, c'est à dire lors du transport des électrons vers la molécule d'oxygène. Il s'en

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

suit alors une inhibition de la respiration malgré un fonctionnement normal de l'ATPase membranaire (Djebar et Djebar, 2000).

Plusieurs auteurs ont montré que le stress entraîne une baisse ou une hausse des protéines totales (Rai *et al.*, 1983 ; Kumar, 1991). Dans notre travail, la variété a répondu aux conditions de stress hydrique par une hausse dans le niveau de protéines totales aussi bien au niveau des racines qu'au niveau des tiges, comparativement aux témoins. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la plante cherche à protéger son intégrité morphophysiologique, en réponse aux dommages et aux effets défavorables du déficit hydrique en élaborant des enzymes et des protéines dont le rôle est de neutraliser les molécules générées par ce stress (Gardés-Albert *et al.*, 2003).

Selon Baker *et al.* (1988) et David et Grongnet (2001), la stimulation des protéines est due à une activation d'un ensemble de gènes permettant la synthèse des protéines spécifiques associées aux stress qui assurent une protection de l'ensemble vital des protéines cellulaires et tiennent à maintenir les structures protéiques et membranaires de la cellule végétale (Baker *et al.*, 1988).

Certains auteurs, soulignent que la plante soumise à un stress abiotique, induit la production de protéines dites « protéines de stress » (Lund *et al.*, 1998 ; Hamilton et Heckathorn, 2001). Ces protéines peuvent s'associer à la protéine en cours d'élongation et stabilise les conformations intermédiaires, elles permettent la remise en forme de protéines partiellement dénaturées ou en modifiant temporairement la conformation des protéines pour faciliter leur pénétration dans les organites. (Guilloton et Quintard, 2003). C'est l'exemple de l'HSP70 (interviennent précocement lors de la synthèse protéique, permettant à la molécule d'acquérir sa forme native) et de la HSP.60 (agissent sur des protéines entièrement constituées, autorisant leur remise en forme, après dénaturation partielle ou leur changement de conformation).

La détermination de la teneur moyenne en proline de la variété GTA dur montre une augmentation significative chez les tiges et les racines isolées, comparativement aux témoins. Cette accumulation est plus importante que la sévérité du stress. Ce résultat est en conformité avec les recherches de plusieurs auteurs dont Monnevaux et Nemmar, 1986 ; Bellinger *et al.*,

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

1991 ; Gorham, 1993. Ainsi, cette accumulation, a été démontré chez de nombreuses variétés de blé et dans plusieurs types de stress (osmotiques, thermiques...) (Blum et Ebercon, 1976; Huang et Cavalieri, 1979; Hubac et Viera DA Silva , 1980; Bellinger *et al.*, 1989; Ober et Sharp, 1994).

L'augmentation de la concentration en proline, qui a été plus importante au niveau des racines stressées par rapport aux témoins, peut être due aussi bien à l'inhibition de l'oxydation des protéines qu'à la dégradation des protéines en leurs précurseurs (Morris *et al.*, 1969 ; Barnetts et Naylor, 1996). L'explication de l'accumulation de la molécule est confuse, certains auteurs dont Hanson *et al.* (1977), affirment que c'est une conséquence pathologique, d'autre comme Stewart et Lee (1974), suggèrent que la proline à de fortes concentrations agit comme soluté pour l'ajustement osmotique, et aussi pour servir de réservoir de composés azotés et de carbone pour une utilisation ultérieure dans la croissance.

L'application foliaire de l'IAA et GA₃ et leur interaction sur la croissance du blé, sous conditions de salinité induit une augmentation de la teneur en proline en fonction des concentrations de sel, (Gherroucha et Djekoun, 1997). D'autres auteurs suggèrent que les quantités accumulées pourraient être liées au niveau de tolérance des organismes aux stress. La proline accumulée pourrait jouer un rôle d'osmoticum (Stewart et Lee, 1974; Kauss, 1977). La proline pourrait également intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique ou encore constituer une réserve d'azote utilisée par la plante après la période du stress (Tal, 1979).

La corrélation positive entre la synthèse chlorophyllienne et celle de la proline nous permet de suggérer l'existence d'une liaison étroite entre ces voies. La chlorophylle et la proline sont deux métabolites en compétition pour un précurseur commun : le glutamate, qui peut être à l'origine de cette évolution (Bengston *et al.*, 1978; Reddy et veeranjanyulu, 1991). Sous stress abiotique, tel que la salinité ou la sécheresse, on observe une accumulation de la proline (Di Martino, 2005 ; Meksem, 2007).

Concernant les dosages des sucres totaux, les résultats obtenus au niveau des tiges et des racines de blé dur suite à un arrêt d'arrosage indiquent une augmentation nette de la teneur en sucres des séries stressées par rapport aux séries témoins et ceci augmente en fonction de

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysiologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

l'intensité du stress hydrique. Ce résultat est en accord avec ceux de certains chercheurs dont Ben Abdellah et Ben Salem (1993). En effet les sucres, même s'ils représentent des osmoticums beaucoup moins puissant, ils participent eux également au maintien de la balance de la force osmotique pour garder la turgescence et le volume cytotogique aussi élevés que possible (Bouzoubaa *et al.*, 2001). Ils permettent également une préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines (Darbyshire, 1974).

Les glucides sources d'énergie indispensable pour les organismes vivants sont utilisés de façon immédiate comme le glucose, ou sous forme de réserves comme l'amidon, ils possèdent aussi un rôle structural (matériau de renfort de la paroi des cellules végétales) comme la cellulose, la chitine ou l'acide hyaluronique. L'enrichissement en sucres, paraît protéger les membranes de la dessiccation. (Binet, 1989).

L'analyse des coupes histologiques effectuées sur des feuilles soumises au stress hydrique et des témoins montre que le stress induit une restriction des stomates. Les études de Radin et Ackerson (1981), Trejo et Davies (1991), Medrano *et al.* (2000) et Brodribb et Holbrook, 2003, montrent que la fermeture des stomates est parmi les premières réponses des plantes à la sécheresse. Elles assurent la réduction des pertes d'eau par transpiration (Chaves *et al.*, 2003). Le contrôle stomatique permet de maintenir l'état hydrique foliaire mais elle diminue la photosynthèse, et donc la productivité des plantes (Ridolfi *et al.*, 1996 ; Lawlor, 2002). Brodribb et Holbrook, 2003, ont montré que la conductance stomatique diminue de façon brutale quand le potentiel hydrique foliaire atteint une gamme relativement étroite de valeurs négatives et que cette plage de valeurs critiques varie entre les espèces.

Il a été suggéré que la fermeture des stomates en réponse à la sécheresse est initialement régulée par l'ABA. Ceci est confirmé lorsque les stomates se ferment en réponse à la déshydratation du sol malgré que le statut hydrique de la partie aérienne ne soit pas encore affecté (Bates et Hall, 1981). Ceci prouve l'existence d'un signal chimique transmis des racines déshydratées aux parties aériennes. Cette hypothèse est validée par l'augmentation du contenu en ABA endogène en réponse au stress hydrique et la capacité de l'ABA exogène à induire la fermeture stomatique (Ridolfi *et al.*, 1996). Après accumulation en grandes quantités dans les racines durant un stress hydrique, l'ABA atteint le xylème et circule ensuite

Chapitre 02. Caractérisation des réponses morphophysologiques, biochimiques et histologiques de résistance du blé dur au déficit hydrique.

jusqu'aux feuilles où il modifie les flux d'ions K^+ et Cl^- de la vacuole vers le cytoplasme des cellules de garde (Sauter *et al.*, 2001). Les stomates se ferment alors et la conductance stomatique baisse. L'ABA est également synthétisé dans les feuilles (Sauter *et al.*, 2001) lorsque leur potentiel hydrique n'assure plus la turgescence mais l'ABA présent dans la sève peut diffuser jusqu'aux stomates avant d'atteindre ce point critique. Le transport de l'ABA est modulé en fonction du pH du milieu cellulaire qui dépend des conditions physiologiques des plantes (stressées ou non stressées) (Wilkinson et Davies 2002 ; Chaves *et al.*, 2003).

En conditions normales, le pH de la solution xylémique qui est de l'ordre de 6 favorise le passage de l'ABA dans les cellules ce qui baisserait sa concentration dans le xylème. Durant la sécheresse le pH de la sève peut monter jusqu'à 7,2 et il aurait un captage moindre, une concentration supérieure dans le xylème et l'apoplasme ce qui favoriserait l'accès de l'ABA aux stomates (Sauter *et al.*, 2001 ; Wilkinson et Davies, 2002) .

Les résultats obtenus dans cette partie, montrent que les teneurs moyennes en protéines, prolines et sucres sont d'autant plus importante que le nombre moyen des racines et la longueur moyenne des tiges sont amoindris. Ainsi, le stress a affecté la respiration des racines et la teneur moyenne en chlorophylle, donc les mitochondries et les chloroplastes (principaux sources de ROS) sont altérés par le déficit hydrique. Ceci est expliqué par une production de quantités importantes de ROS dans les deux organes (Berova *et al.*, 2002). La génération des ROS pourrait expliquer une majeure partie des dégâts touchant les différentes cellules des tissus au cours des premières étapes de leur développement conduisant à un ralentissement de la croissance (Smiley *et al.*, 1996).

Introduction.

Les plantes prélèvent les éléments minéraux du sol pour produire les composés organiques. Il est établi que plusieurs éléments sont nécessaires pour le fonctionnement normal de la machine biochimique de la plante. Les éléments nutritifs doivent être présents sous une forme assimilable pour que les végétaux puissent les absorber.

Pour se développer, une plante a besoin d'eau, de lumière, d'oxygène, de carbone mais également d'éléments minéraux présents plus ou moins dans le sol. Pour pousser, les plantes ont besoin de plusieurs éléments nutritifs essentiels, en quantité variable, à différentes étapes de leur développement. Les éléments requis en quantité relativement importante (l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et le soufre) sont appelés macro-éléments, et les éléments requis en faible quantité sont appelés oligo-éléments ou micro-éléments. Bien que ces oligo-éléments soient utilisés en faible quantité par les plantes, ils ne sont pas moins indispensables que les macro-éléments. Les plantes ont notamment besoin de bore (B), de chlore (Cl), de cobalt (Co), de cuivre (Cu), de fer (Fe), de manganèse (Mn), de molybdène (Mo), de sélénium (Se), de sodium (Na) et de zinc (Zn). La disponibilité de ces éléments dans le sol dépend des caractéristiques du terrain et de l'environnement. À titre d'exemple, le zinc est un élément relativement immobile lorsqu'il se trouve dans la matière organique près de la surface du sol. Le temps froid et humide réduit sa disponibilité, au point où parfois il est source de carence.

L'azote.

L'azote est un élément essentiel pour la croissance des plantes, étant un élément constitutif des protéines, des acides aminés, de la chlorophylle, des acides nucléiques et d'une large gamme d'autres composés (Harper, 1994).

Les plantes absorbent principalement l'azote du sol sous la forme des ions minéraux nitrate et ammonium, toutefois elles peuvent aussi absorber de petites molécules aminées (acides aminés, urée) mais cela ne représente, à l'exception de plantes de certains écosystèmes tels les écosystèmes alpins ou ceux des toundras arctiques (Rehder et Schafer 1978; Kaye et Hart, 1997), qu'une faible part de la nutrition azotée des plantes (Chaillou et Lamaze, 1997). Les espèces de la famille des légumineuses peuvent aussi avoir accès à l'azote atmosphérique (N₂) grâce à l'établissement au niveau de leurs racines de symbioses avec des bactéries fixatrices

de l'azote atmosphérique (Trinchant *et al.*, 1997). Dans la plupart des sols agricoles des régions tempérées, où les conditions sont généralement favorables à l'oxydation par les organismes nitrifiants de l'ammonium en nitrate, le nitrate est la plus importante source d'azote pour les plantes (Salsac *et al.*, 1987).

L'absorption et l'assimilation de l'azote, donc du nitrate et de l'ammonium principalement, est hautement régulée en fonction de la vitesse de croissance des plantes et des différents facteurs environnementaux la modulant (éclairage, température, disponibilité des autres nutriments, stress biotiques et abiotiques), de leur statut azoté, de leur ontogénie. Les plantes absorbent le nitrate et l'ammonium dans le milieu par des protéines de transports localisées sur les membranes plasmiques des cellules épidermiques et corticales des racines (Larsson et Ingemarsson, 1989; Ourry *et al.*, 1997).

Le manque d'azote, en entravant la synthèse des protéines, des enzymes nécessaires à la formation, à la croissance et au fonctionnement des cellules va nécessairement aboutir à une réduction de la croissance des plantes se traduisant notamment par une réduction de la croissance foliaire. Il affecte entre autres, la répartition de la biomasse entre les différents organes, et va profondément modifier le métabolisme des plantes en altérant la balance entre les organes sources et les organes puits, et en affectant la capacité photosynthétique des plantes.

Lorsque l'azote manque dans le milieu, l'azote interne, préalablement accumulé, va pouvoir être recyclé pour assurer la croissance des organes et la formation des nouveaux tissus. Cette utilisation et remobilisation de l'azote interne, si elle peut permettre aux plantes lorsqu'elles ont constitué un "pool" d'azote de réserve de maintenir, pendant un certain temps, une croissance maximale, va se traduire par une modification de la répartition de l'azote entre les différentes parties de la plante et s'accompagne d'une diminution de leur teneur en azote.

Le bore.

Le bore est présent dans l'environnement, se trouve naturellement dans plus de 80 minéraux et constitue 0,001 % de la croûte terrestre (U.S. EPA, 1987). Le bore n'existe pas à l'état libre dans la nature.

Les concentrations les plus élevées de bore se trouvent dans les sédiments et les roches sédimentaires, plus précisément dans les sédiments marins riches en argile. Il a été démontré que le bore s'accumule dans les végétaux aquatiques (Schuler, 1987; Saiki *et al.*, 1993), ce qui pourrait être une indication de son rôle dans la nutrition des végétaux.

Le cuivre.

Le cuivre, un micronutriment essentiel aux plantes, est assimilable sous forme ionique (Cu^+ ou Cu^{2+}). Il est nécessaire au fonctionnement de nombreuses enzymes, dont la plas-tocyanine (PC) ou l'oxydase des cytochromes. Le cuivre intervient dans les réactions redox des enzymes et des protéines en passant de la valence I à II ou vice-versa (George 1996, Barker et Pilbeam, 2007).

Le cuivre étant peu mobile dans les plantes, les symptômes de déficience se manifestent dans les parties terminales de croissance en premier. Ces symptômes sont variables selon l'espèce et comprennent généralement une chlorose, des taches nécrotiques sur les feuilles, et des feuilles tordues et fanées (Brennan et Bolland 2003).

Les besoins des cultures en Cu sont modestes (25 à 150 g / ha), alors que le manque de Cu peut limiter fortement les rendements sous certaines conditions de sols et chez certaines cultures particulièrement sensibles (Loué, 1986). La carence en Cu entraîne un vieillissement précoce de la chlorophylle et un déclin du rendement des végétaux qui passe inaperçu (Katyal et Randhawa, 1986). Elle cause aussi un verdissement des feuilles où l'on observe un niveau plus élevé de protéines. Ces feuilles sèchent à la pointe et s'enroulent sur elles-mêmes (Wiese, 1977).

Sur les céréales, la déficience en Cu peut aussi causer une stérilité du grain de pollen. Les épis seront vides, ce qui entraîne des rendements très bas (Loué, 1986). En effet, la stérilité du grain peut faire baisser les rendements de près de 20% chez les céréales sans même présenter de symptômes observables (Jewell *et al.*, 1985). Ceci s'explique par le fait que les anthères des épis carencés en Cu présentent, à leur sommet, des hypertrophies anormales en bandes qui les rendent complètement stériles. Ces caractéristiques seraient causées par une accumulation d'auxines. On peut observer aussi le phénomène de verse chez les céréales carencées en Cu car le Cu intervient dans le processus de synthèse des lignines (Loué, 1986). En effet, dans les tissus déficients en Cu, la lignification est inhibée (Rahimi et Bussler, 1973).

Le manganèse

Le manganèse, absorbé par les plantes sous forme de Mn^{2+} , est impliqué dans la structure de protéines participant à la photosynthèse et à la respiration. Il est également nécessaire au fonctionnement de nombreuses enzymes. Dans la photosynthèse, le manganèse joue un rôle clé dans une enzyme du complexe d'oxydation de l'eau (cluster de manganèse). Pouvant passer de la valence II à la valence IV, le manganèse participe à de nombreuses réactions d'oxydoréduction dans les enzymes (George 1996).

Le Fer

Le fer est un oligoélément essentiel à la croissance des plantes supérieures. Il peut être absorbé sous forme cationique (Fe^{3+} ou, plus fréquemment, Fe^{2+} qui est plus soluble). Le fer exerce deux fonctions essentielles dans la plante : il fait partie du groupe catalytique de nombreuses enzymes participant à des réactions d'oxydoréduction, et est nécessaire à la synthèse de la Chl. Il intervient dans toutes les protéines fer-soufre ou hémiques ; à ce titre, il est présent dans plusieurs composants protéiques des réactions photosynthétiques, tels que les protéines de Rieske ou les ferrédoxines. Le rôle du fer dans la synthèse de la Chl n'est pas encore bien établi. Il n'est pas certain que les enzymes actives dans ce processus soient directement fer-dépendantes ; il est possible, en revanche, que le besoin d'un apport en fer soit plus général, intervenant par exemple dans la synthèse des protéines du chloroplaste. Dans tous les cas, la carence en fer provoque une perte de Chl et une dégénérescence des chloroplastes (Lu *et al.* 1995, Balakrishnan *et al.* 2000).

Le zinc

Le zinc est un métal de transition, caractérisé par une bonne conductivité électrique. En biologie, le zinc est généralement un cation divalent (Zn^{2+}) qui s'associe facilement avec l'oxygène et les éléments non métalliques tels que des acides aminés, des peptides, des protéines et des nucléotides, pour former des complexes avec quatre liaisons de coordinations en disposition tétraédrique. Le zinc est un élément essentiel pour les plantes (Sommer et Lipman, 1926) comme pour les animaux, dont l'homme (Jeejeebhoy, 2007). Environ 10% des protéines humaines sont potentiellement capables de lier le Zn^{2+} (Andreini *et al.*, 2006), il est le cofacteur le plus fréquemment rencontré dans les metalloprotéines (Hänsch et Mendel, 2009). Chez *Arabidopsis*, ce sont plus de 2300 protéines qui sont considérées comme étant

reliées au Zn^{2+} (Broadley *et al.*, 2007) et 4% des protéines prédites contiennent un motif de liaison au zinc, le zinc zipper (Kawagashira *et al.*, 2001). On estime que 12 à 50% du Zn^{2+} cellulaire est impliqué dans les mécanismes de transcription et de traduction (Finney et O'Halloran, 2003). Le "succès" du Zn^{2+} dans ses relations avec les biomolécules résulte de ses propriétés chimiques particulières. D'abord, le Zn est un acide de Lewis fort, il a donc de fortes affinités pour les bases faibles (e.g. ligands sulphides), comme pour les bases fortes (ligands amino, carboxylate, hydroxyl, etc). Ensuite le zinc intervient dans les systèmes biologiques sous une unique forme d'oxydation : Zn^{2+} , ce qui écarte tout risque de générer des radicaux libres. En tant qu'élément indispensable au fonctionnement de nombreuses protéines, le Zn^{2+} doit être présent partout dans la plante. Il doit donc être transporté depuis le sol jusqu'aux cellules qui en ont besoin. Il existe donc de nombreux transporteurs cellulaires du zinc qui participent à la tolérance et à son accumulation (van der Zaal *et al.*, 1999).

Le magnésium.

Le magnésium est un élément essentiel au développement des plantes supérieures. Dans la culture en solution nutritive, il est généralement fourni sous forme de sels de magnésium solubles dans l'eau tels que le sulfate de magnésium ($MgSO_4$). En solution, le magnésium forme des ions Mg^{2+} , forme sous laquelle il est absorbé par les cellules des plantes.

Le magnésium joue un rôle non seulement structurel mais aussi régulateur de plusieurs fonctions importantes. En tant qu'atome central, dans la porphyrine, de la molécule de Chlorophylle, il joue un rôle important dans la photosynthèse (Lu *et al.*, 1995). Il est également impliqué dans la formation des protéines (il est nécessaire à la stabilisation de la structure du ribosome), des sucres, des graisses et des vitamines. On lui attribue encore le rôle de cofacteur de plusieurs enzymes ; il est important dans les réactions enzymatiques avec l'ATP de par son rôle dans la liaison de la molécule d'ATP avec le site actif de l'enzyme (Hopkins, 1999).

Dans la nutrition des plantes, le magnésium joue un rôle important pour l'absorption d'autres éléments nutritifs (Fischer et Bremer, 1993). Par ailleurs, il est reconnu qu'une carence en magnésium persistante ralentit la formation de la chlorophylle, des sucres et des protéines.

Le chrome.

Le chrome est présent dans l'environnement de manière ubiquitaire. Le principal minéral de chrome est la chromite (FeCr_2O_4). La concentration moyenne en chrome dans les sols est de 50 mg.kg^{-1} (Pichard *et al.*, 2005a). Cette concentration varie selon le type de sol. Ainsi, les roches magmatiques ultrabasiques (serpentinites, péridotites) présentent des teneurs en chrome de l'ordre de 1500 à 3000 mg.kg^{-1} (Baize, 1997).

Le Cr est un élément non essentiel et toxique pour les plantes (Zayed et Terry, 2003 ; Shanker *et al.*, 2005). Son effet toxique dépend de son degré d'oxydation, Cr (III) ou Cr (VI). En effet, Kleiman et Cogliatti (1998) ont mis en évidence, lors de culture en hydroponie, que Cr (III) est toxique pour la navette (*Brassica napus*), le blé et le sarrasin uniquement à forte concentration, soit 26 mg.l^{-1} , tandis que Cr (VI) est toxique à des concentrations plus faibles, soit 0,52 mg.l^{-1} .

La toxicité de Cr (VI) est due à son pouvoir oxydant mais aussi à la formation de radicaux libres lors de sa réduction en Cr (III) dans les cellules (Chatterjee et Chatterjee, 2000 ; Shanker *et al.*, 2005). La toxicité de Cr (III), à forte concentration, est due essentiellement à sa capacité à se lier avec des composés organiques, ce qui conduit à une altération du métabolisme (inhibition de l'activité enzymatique). Cr (III) a également la capacité de générer des espèces possédant un oxygène actif, ce qui conduit alors à un stress oxydatif (Mei *et al.*, 2002). Cette phytotoxicité peut être à l'origine de dommages au niveau des racines, d'une diminution de la croissance, d'une chlorose.

Le phosphore.

Le phosphore (P) est un élément qui est largement distribué dans la nature. Il est considéré, avec l'azote (N) et le potassium (K), comme un constituant fondamental de la vie des plantes et des animaux. Le phosphore a un rôle dans une série de fonctions du métabolisme de la plante et il est l'un des éléments nutritifs essentiels nécessaires pour la croissance et le développement des végétaux. Il a des fonctions à caractère structural dans des macromolécules telles que les acides nucléiques et des fonctions de transfert d'énergie dans des voies métaboliques de biosynthèse et de dégradation. A la différence du nitrate et du sulfate, le phosphate n'est pas réduit dans les plantes mais reste sous sa forme oxydée la plus élevée (Marschner, 1993).

Le phosphore est absorbé principalement pendant la croissance végétative et, par la suite, la majeure partie du phosphore absorbé est transférée dans les fruits et les graines pendant les étapes de reproduction. Des plantes déficientes en phosphore montrent un retard de croissance (réduction de la croissance des cellules et des feuilles, de la respiration et de la photosynthèse), et souvent une couleur vert foncé (concentration plus élevée en chlorophylle) et une coloration rougeâtre (augmentation de la production d'anthocyanes). Il a été signalé que le niveau de l'approvisionnement en phosphore pendant les étapes reproductrices règle la partition des photosynthétats entre les feuilles-sources et les organes reproducteurs, ceci étant essentiel pour les légumineuses fixatrices d'azote (Marschner, 1993).

Le sodium.

Le sodium ne constitue pas un (macro) élément nutritif essentiel chez la plupart des plantes supérieures. A forte concentration, ce cation devient même toxique pour la plante. A des concentrations plus faibles, la plante peut l'utiliser avec profit en tant qu'osmoticum vacuolaire.

Selon Cheeseman (1988), la concentration de Na^+ dans le cytosol est maintenue à une valeur inférieure à celle de K^+ , dans les cellules animales comme dans les cellules végétales. Dans les cellules végétales, la concentration de Na^+ ne semble pas être soumise à une homéostasie aussi étroite à une homéostasie aussi étroite. Lorsque la plante se développe en présence de Na^+ , l'accumulation de Na^+ dans le cytoplasme au-delà d'un certain seuil devient toxique, mais ce seuil n'est clairement déterminé.

Le sodium a un rôle en tant qu'osmoticum. En effet, différentes études ont effectivement montré que des quantités modérées de Na^+ peuvent améliorer la croissance de nombreuses espèces végétales (Mengel et Kirkby, 1982 ; Flowers et Lauchli, 1983). Par exemple, un effet nutritif bénéfique de Na^+ a été décrit chez la betterave et la tomate (Woolley, 1957 ; Marschner, 1971 ; Besford, 1978).

Le potassium.

Le potassium présent à une concentration de 100 à 200 mM dans le cytosol, est le cation inorganique majoritaire du cytoplasme des cellules animales et végétales. Les raisons de son accumulation préférentielle par rapport à Na^+ tiennent probablement au fait que Na^+ est davantage « chaotropique » (du fait de sa plus petite taille et donc du champ électrique plus fort à sa surface) (Clarkson et Hanson, 1980).

Matériel et méthodes

Le matériel biologique utilisé dans ce chapitre est le blé dur de la famille des Poacées plus précisément le *Triticum durum Desf.* Les organes choisis pour réaliser cette partie sont les tiges et racines. Les échantillons proviennent de l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales (OAIC) d'El Hadjar, Annaba, Algérie. Nous avons utilisé la variété GTA dur.

Conduite des essais

Les essais sont menés au niveau du laboratoire du complexe Fertial d'Annaba. Les graines sont méticuleusement choisies avant leur utilisation. (Pas de cassures ni signes apparents de maladies).

Après 4 jours de germination, les germes de blé subissent un stress hydrique par arrêt d'arrosage et des échantillons de blé sont analysés au 3, 5, 7 et 9^{ème} jour après arrêt de l'arrosage. Une partie continue à être arrosée normalement et est considérée comme témoin.

La germination a lieu à une température de jour 21°C et de nuit 17-21°C avec un éclairage artificiel de 6 H à 22 H.

Paramètres mesurés

Dosage de l'azote.

Prendre une prise d'essai de 0.1 à 0.15 g d'échantillon de végétaux broyé et tamisé à 500 µm, puis la mettre dans du papier aluminium et bien envelopper. Ensuite, Injecter l'échantillon à analyser dans le four d'un analyseur élémentaire d'azote LECO : l'appareil détermine le taux d'azote contenu dans l'échantillon par infrarouge à l'aide d'un détecteur TCD (détecteur à conductibilité thermique). Finalement l'appareil affiche le taux d'azote contenu dans les végétaux.

Détermination des teneurs moyennes en B, Cu, Mn, Fe, Zn, Mg, P, Na, K et en Cr.

Peser 0,4 g de poudre végétal broyée à 500 µM. le végétal séché est broyé avec un broyeur pour réduire l'échantillon dans sa totalité jusqu'à une finesse inférieure à 500 µM.

Transférer dans un tube en téflon numéroté et ajouter 5 ml d' HNO_3 56 % 5 ml d' H_2O_2 30% à l'aide d'un distributeur. Fermer les tubes hermétiquement avec des bouchons à vis, les mettre dans un plateau, puis, les placer dans le four. A la fin du cycle de minéralisation, filtrer le contenu des tubes dans des fioles jaugées. la lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre torche plasma.

Résultats.

Teneur en azote au niveau des tiges.

La figure 26 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en azote au niveau des tiges.

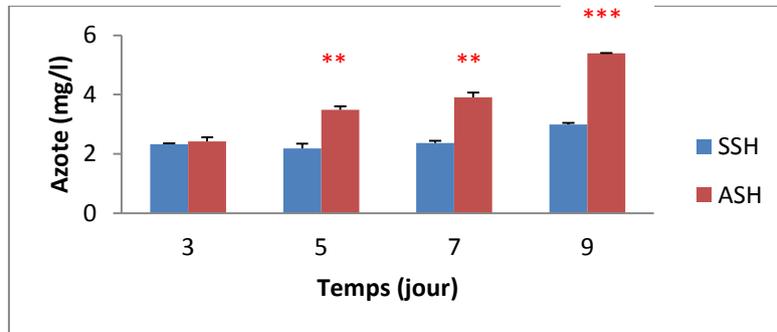


Figure26. Teneur en azote au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La figure ci-dessus montre que La restriction de l'alimentation en eau chez les tiges, entraîne une augmentation très hautement significative le 9^{ème} jour de stress. Cette augmentation est de 40% par rapport aux témoins.

Teneur en azote au niveau des racines.

La figure 27 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en azote au niveau des racines.

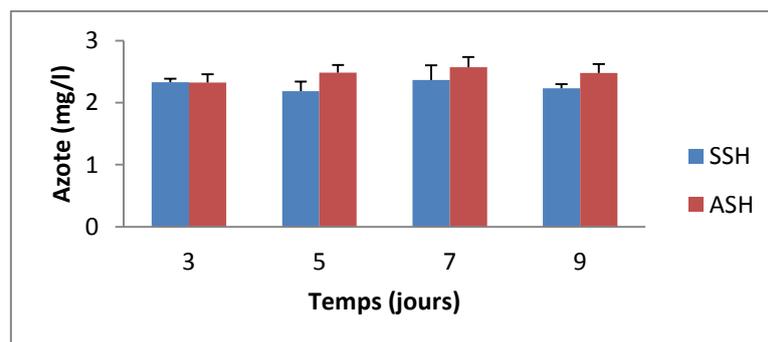


Figure27. Teneur en azote au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Sous condition de stress hydrique, la teneur en azote au niveau des racines augmenté chez la variété testée. Cette augmentation est non significative pour les 4 temps.

Teneur en bore au niveau des tiges.

La figure 28 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en bore au niveau des tiges.

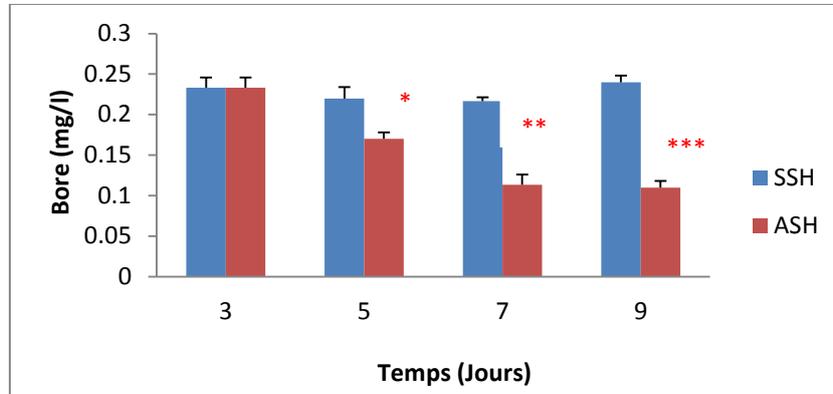


Figure28. Teneur en bore au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Chez les tiges, le déficit en eau provoque une baisse de la teneur en bore. Cette diminution est très hautement significative le 9^{ème} jour de stress. Elle dépasse les 50% pour le 7^{ème} est le 9^{ème} jour de stress.

Teneur en bore au niveau des racines.

La figure 29 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en bore au niveau des racines.

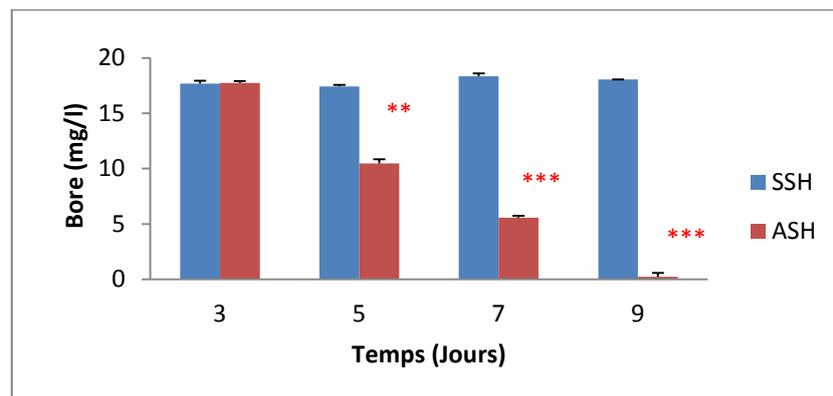


Figure29. Teneur en bore au niveau des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La détermination de la teneur en bore chez les racines sous stress hydrique montre une diminution très hautement significative à partir du 7^{ème} jour.

Teneur en cuivre au niveau des tiges.

La figure 30 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en cuivre au niveau des tiges.

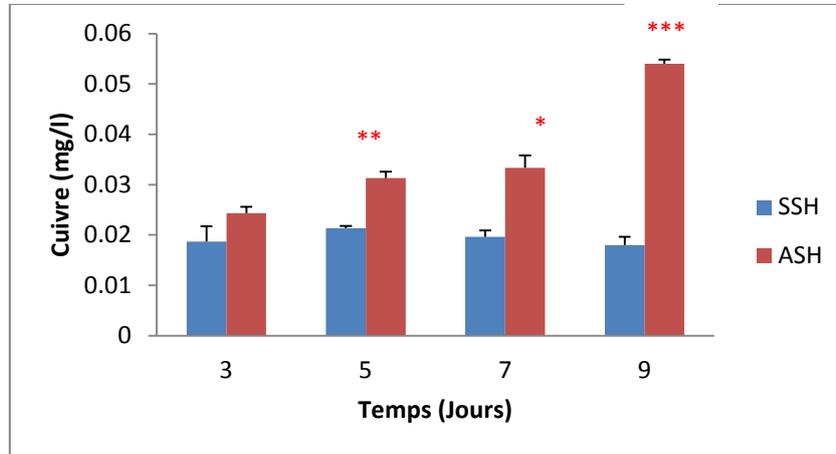


Figure30. Teneur en cuivre au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La figure 30 enregistre une augmentation très hautement significative le 9^{ème} jour de stress.

Teneur en cuivre au niveau des racines.

La figure 31 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en cuivre au niveau des racines.

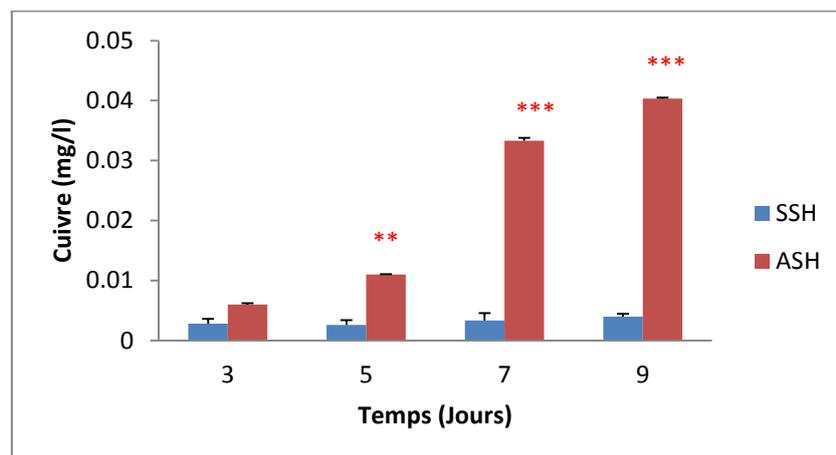


Figure31. Teneur en cuivre au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

L'analyse de la figure 31, nous permet de distinguer une augmentation très hautement significative le 9^{ème} jour chez les racines stressées. Cette augmentation est de 90% le 9^{ème} jour de stress par rapport aux témoins.

Teneur en fer au niveau des tiges.

La figure 32 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en fer au niveau des tiges.

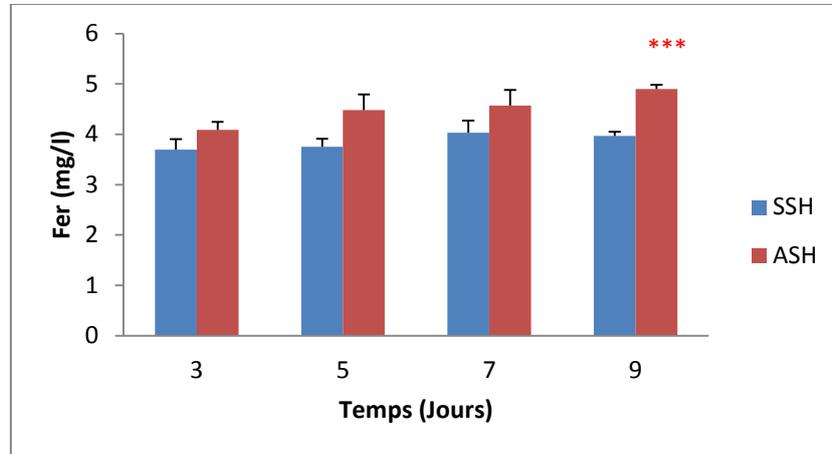


Figure32. Teneur en fer au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La figure 32 illustre une augmentation très hautement significative le 9^{ème} jour de stress.

Teneur en fer au niveau des racines.

La figure 33 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en fer au niveau des racines.

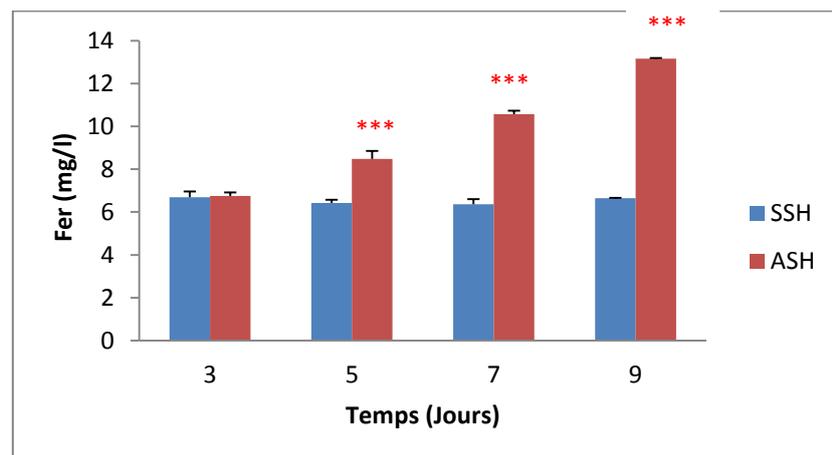


Figure33. Teneur en fer au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Les résultats de la figure ci-dessus, révèlent une augmentation très hautement significative du fer à partir du 5^{ème} jour chez les racines sous stress hydrique par rapport aux témoins. L'augmentation est de 50% le 9^{ème} pour les racines stressées.

Teneur en magnésium au niveau des tiges.

La figure 34 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en magnésium au niveau des tiges.

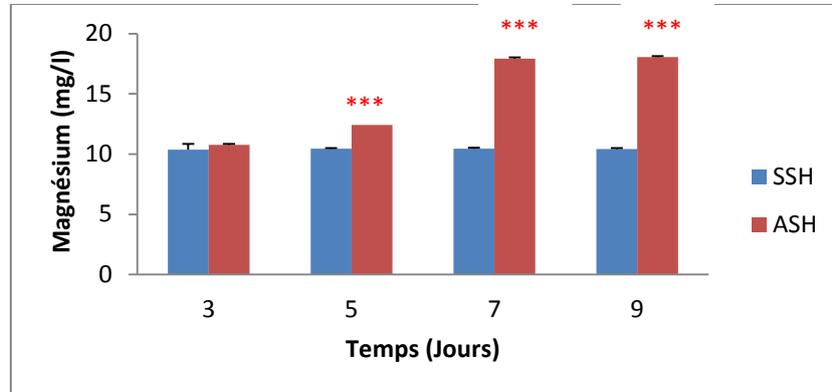


Figure34. Teneur en magnésium au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Une augmentation très hautement significative de la teneur en magnésium est enregistrée à partir du 5^{ème} jour chez les tiges sous stress hydrique. Cette augmentation dépasse les 40% à partir du 7^{ème} jour.

Teneur en magnésium au niveau des racines.

La figure 35 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en magnésium au niveau des racines.

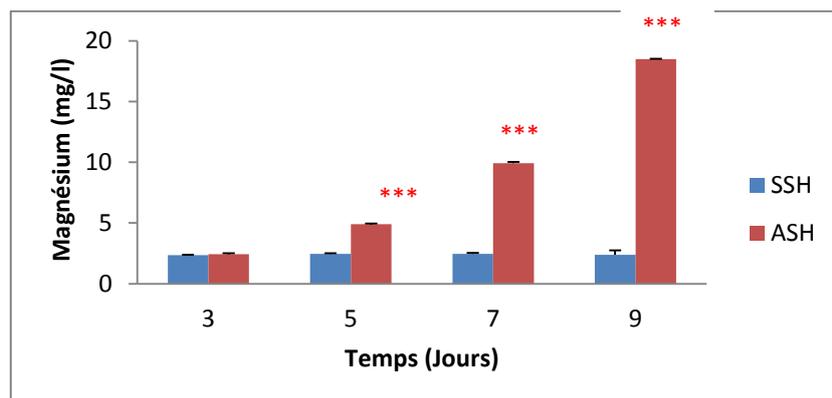


Figure35. Teneur en magnésium au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Sur la figure 35, on observe une augmentation du magnésium au niveau des racines stressées. Cette augmentation est très hautement significative à partir du 5^{ème} jour. Elle atteint 80% le 9^{ème} jour par rapport aux témoins.

Teneur en manganèse au niveau des tiges.

La figure 36 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en manganèse au niveau des tiges.

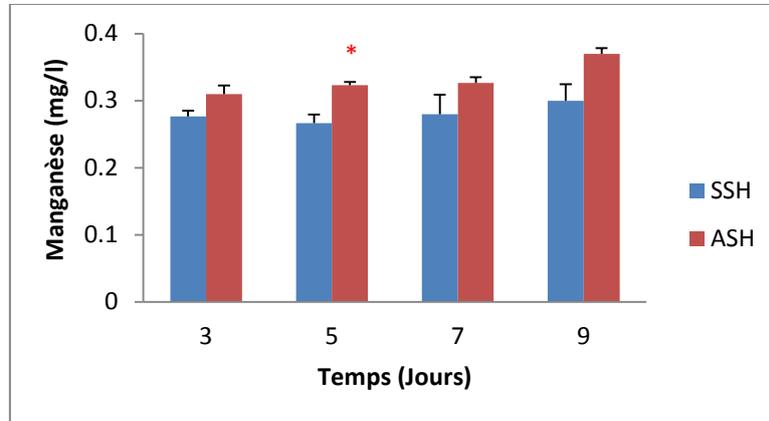


Figure36. Teneur en manganèse au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La figure ci-dessus illustre une augmentation non significative du manganèse au niveau des tiges soumises à un stress hydrique. L'augmentation dépasse les 10% à partir du 3^{ème} jour de stress.

Teneur en manganèse au niveau des racines.

La figure 37 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en manganèse au niveau des racines.

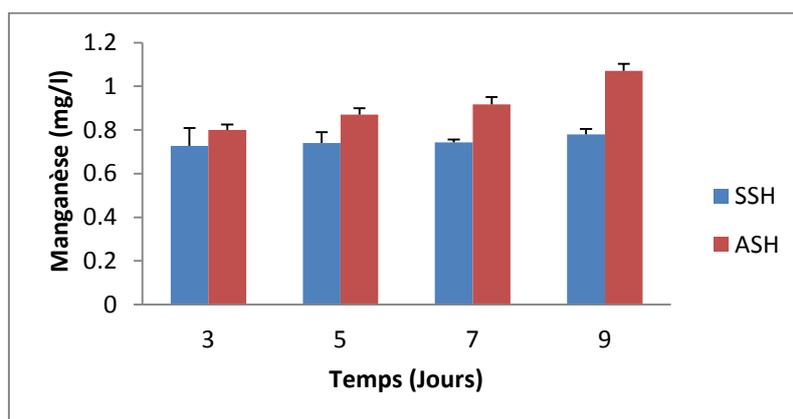


Figure37. Teneur en manganèse au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Le 9^{ème} jour, le stress hydrique induit une augmentation significative de la teneur en manganèse chez les racines stressées. Cette augmentation est de 20%.

Teneur en zinc au niveau des tiges.

La figure 38 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en zinc au niveau des tiges.

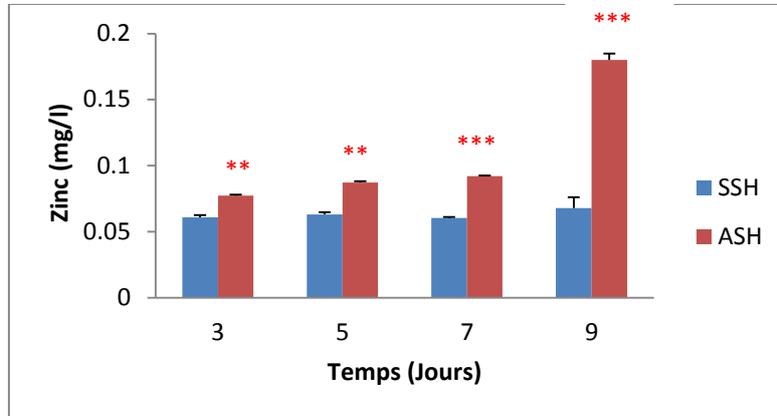


Figure38. Teneur en zinc au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La mesure du zinc au niveau des tiges soumises au stress hydrique, en comparant avec les témoins montre une augmentation très hautement significative au-delà du 7^{ème} jour. Cette augmentation est de 65% le 9^{ème} jour de stress.

Teneur en zinc au niveau des racines.

La figure 39 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en zinc au niveau des racines.

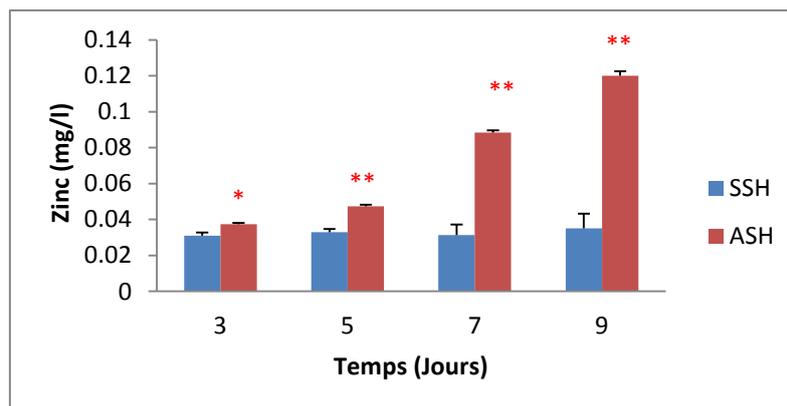


Figure39. Teneur en zinc au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

On enregistre une augmentation importante tout au long du stress induit, en effet, la teneur en zinc augmente d'une façon significative le 9^{ème} jour pour les échantillons stressés par rapport aux témoins. L'augmentation est de 60%.

Teneur en phosphore au niveau des tiges.

La figure 40 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en phosphore au niveau des tiges.

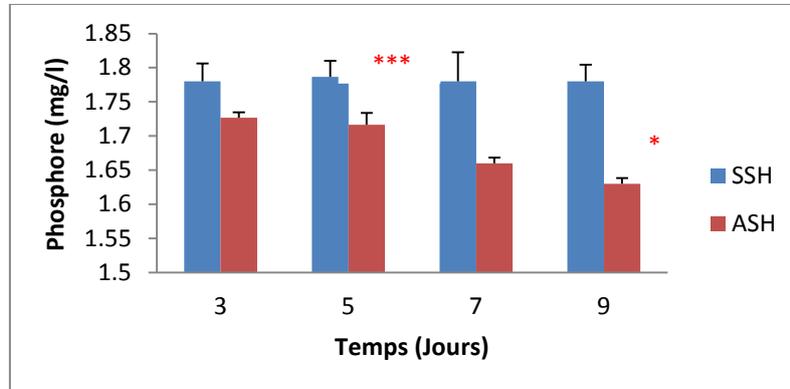


Figure40. Teneur en phosphore au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Les résultats indiqués dans le graphe ci-dessous montrent à partir du 3^{ème} jour une diminution importante entre les graines mises en stress hydrique et les témoins. Cette diminution dépasse les 50% le 9^{ème} jour de stress.

Teneur en phosphore au niveau des racines.

La figure 41 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en phosphore au niveau des racines.

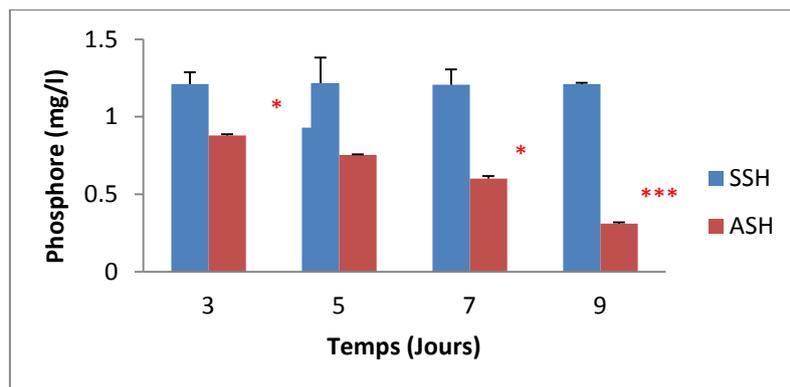


Figure41. Teneur en phosphore au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La figure 41 révèle que le déficit hydrique entraîne une chute du phosphore au niveau des racines. Cette chute devient de plus en plus nette au fur et à mesure que le niveau de stress s'accroît. Cette chute atteint les 70% le 9^{ème} jour de stress.

Teneur en sodium au niveau des tiges.

La figure 42 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en sodium au niveau des tiges.

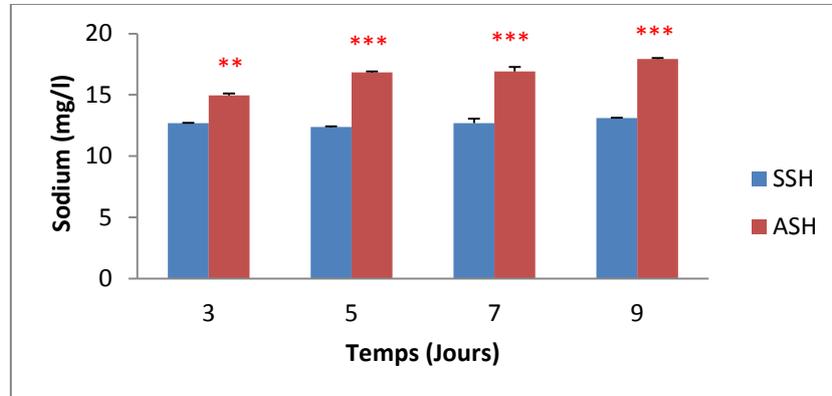


Figure 42. Teneur en sodium au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Le dosage du sodium au niveau des tiges montre que le stress hydrique entraîne l'accumulation de cette molécule. L'augmentation de la molécule est très hautement significative à partir du 5^{ème} jour. Elle est de 20% à partir du 5^{ème}.

Teneur en sodium au niveau des racines.

La figure 43 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en sodium au niveau des racines.

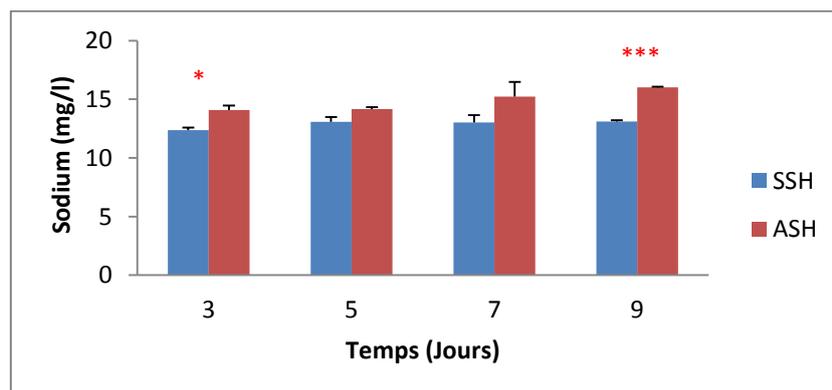


Figure 43. Teneur en sodium au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

L'évolution des teneurs moyennes en sodium, extraites à partir des racines montre qu'il y a une augmentation considérable du taux du sodium lors du stress hydrique. La quantité de Na augmente d'une manière très hautement significative le 9^{ème} jours par rapport au témoin.

Teneur en potassium au niveau des tiges.

La figure 44 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en potassium au niveau des tiges.

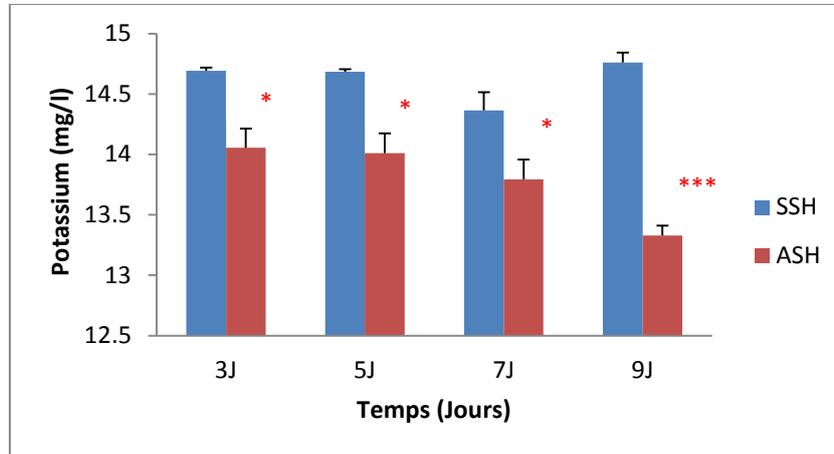


Figure44. Teneur en potassium au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La figure 44 montre une diminution très hautement significative du potassium au niveau des tiges stressées, comparativement aux témoins. Cette diminution est enregistrée le 9^{ème} jour.

Teneur en potassium au niveau des racines.

La figure 45 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en potassium au niveau des racines.

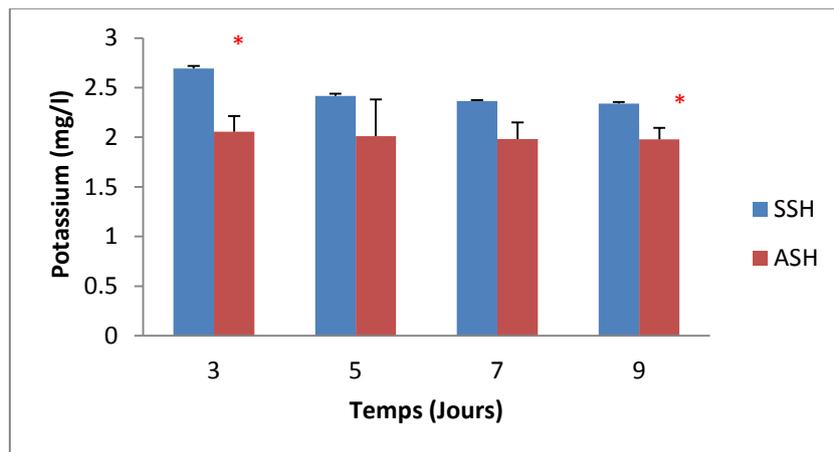


Figure45. Teneur en potassium au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Les résultats relatifs au potassium au niveau des racines soumises à un stress hydrique montrent une baisse considérable par rapport aux témoins.

Teneur en chrome au niveau des tiges.

La figure 46 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en chrome au niveau des tiges.

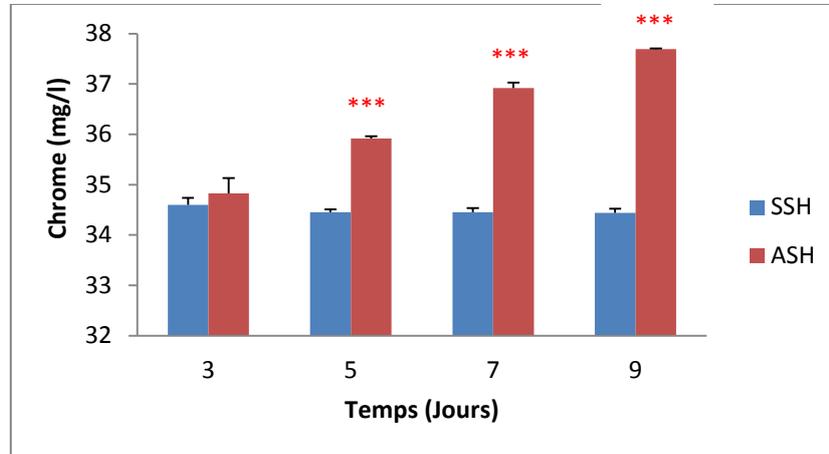


Figure46. Teneur en chrome au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

Le graphe ci-dessous illustre peu de différence entre les graines stressées et les témoins, le 3ème jours. Par contre la différence est considérable du 5ème jour jusqu' au 9ème jours.

Teneur en chrome au niveau des racines.

La figure 47 représente les effets du stress hydrique sur les teneurs moyennes en chrome au niveau des racines.

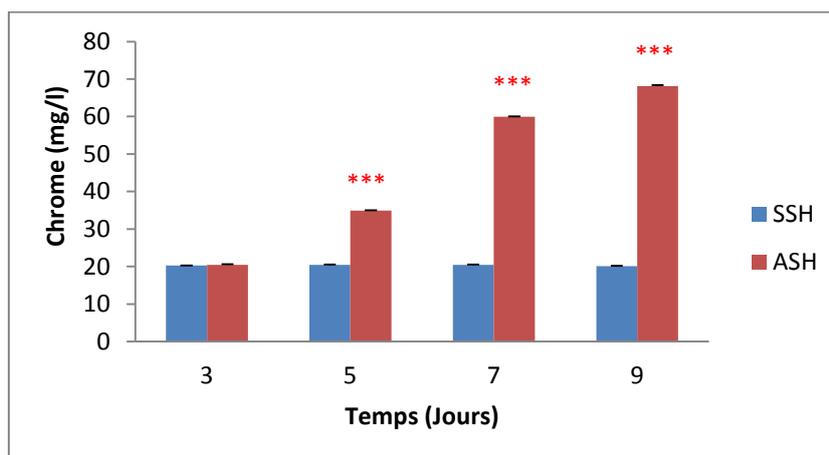


Figure47. Teneur en chrome au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

La figure 47 montre que le chrome subit une augmentation de la concentration en réponse au déficit hydrique au niveau des racines.

Discussion.

La teneur des tiges et des racines sèches en azote a augmenté sous l'effet du déficit hydrique. Chez le soja, il a été observé qu'un stress hydrique réduit le métabolisme azoté (Calmes *et al.*, 1985). Cette réduction n'induit pas forcément la baisse de la teneur en azote, car celle-ci dépend du rapport entre métabolismes azoté et carboné. La forte augmentation de la teneur en azote pourrait s'expliquer dans les tiges et les racines par une sensibilité aux stress du transfert et de la synthèse des glucides plus forte que celle des composés azotés (acides aminés, protéines, etc.). En revanche, la sécheresse a entraîné une baisse sur la teneur en phosphore des organes étudiés. Ces résultats indiquent que la masse et la composition biochimique de la plante sont affectées par le déficit hydrique mais pas de façon identique pour tous les composés.

Selon Ingestad (1979), le stress azoté augmente aussi généralement la partition des nutriments majeurs vers les racines. Ceci implique, en comparaison de plantes bien alimentées en azote, une augmentation de la proportion d'azote absorbé et accumulé dans les racines (Rufty *et al.*, 1990) et peut aussi impliquer une augmentation de la remobilisation d'azote provenant de la partie aérienne vers les racines (Cruz *et al.*, 2004).

La mise en réserve et la remobilisation de l'azote assure un recyclage interne de l'azote dans la plante, lui permettant d'une part de maintenir son métabolisme et sa croissance lorsque le milieu s'appauvrit en azote ou lorsque ses capacités à l'acquérir sont faibles, et d'autre part d'assurer la pérennité de la plante entre plusieurs périodes de croissance (Cyr et Bewley, 1989; Chapin *et al.*, 1990; Richard-Molard, 1999).

Le bore est un élément essentiel à la croissance des plantes. Cependant, les espèces végétales ne présentent pas la même tolérance à cet élément lors d'un stress. Nos résultats révèlent une baisse importante des teneurs moyenne en bore chez les tiges et les racines sous stress hydrique à partir du 3^{ème} jour par rapport aux témoins. La carence en bore semble l'une des carences en oligo-éléments des arbres forestiers les plus communes (Saur, 1990), elle est en relation probable avec le manque d'eau (Mirault et Regad, 1995). Toth (2001) signale la possibilité d'une carence en bore chez de jeunes cèdres buissonnants avec un dessèchement des cimes, mais souligne que des plantes situées dans des zones d'accumulation d'air froid présentent les mêmes symptômes.

La détermination de la teneur moyenne en cuivre chez les tiges et les racines soumises à un stress hydrique entraîne une augmentation importante à partir du 3^{ème} jour, cet enregistrement montre que le cuivre joue un rôle important dans la défense de la plante contre le stress. Le cuivre participe à la synthèse des protéines, la photosynthèse et à la respiration et à la non dégradation précoce de la chlorophylle : les plantes gardent plus longtemps un aspect vert et juvénile. Ainsi, il est nécessaire au bon fonctionnement de nombreuses enzymes, dont la plas-tocyanine(PC) ou l'oxydase des cytochromes et il intervient dans les réactions redox des enzymes et des protéines (George,1996 ; Barker et Pilbeam 2007).

Le manganèse joue un rôle important sur les processus d'oxydoréduction et dans le transport des électrons de la photosynthèse. Par ailleurs, le manganèse agit comme un activateur de nombreuses enzymes, (plus de 35 enzymes différentes). Ainsi, il participe à l'activation de plusieurs enzymes impliquées dans des réactions d'oxydation, carboxylation, métabolisme des glucides, les réactions de phosphore et le cycle de l'acide citrique. Parmi ces enzymes, proteinmanganese dans le photosystème II et la superoxyde (Uehara *et al*, 1974 ; Jackson *et al*, 1978 ; Mukhopadhyay et Sharma, 1991 ; Millaleo *et al*, 2010).

Les fonctions biochimiques du Manganèse (Mn^{2+}) sont semblables à celles du magnésium (Mg^{2+})(Burnell, 1988 ; Marschner, 1995). A partir des multiples fonctions du manganèse, on peut conclure que la raison de son augmentation au niveau des tiges et des racines stressées, est de protéger la plante contre le stress induit.

Concernant le magnésium, le stress a entraîné une augmentation en sa teneur. Cet élément est souvent négligé, pourtant, il participe à un certain nombre de fonctions clés de la plante. Selon Cakmak et Yazici, 2010, parmi les réactions et les processus métaboliques spécifiques influencés par le magnésium figurent notamment dans la photophosphorylation (formation d'ATP dans les chloroplastes, par exemple), la fixation photosynthétique du dioxyde de carbone (CO_2), la synthèse des protéines, la formation de la chlorophylle, le chargement du phloème, la répartition et l'utilisation des photoassimilats, la génération d'espèces réactives de l'oxygène, et la photooxydation dans les tissus de la feuille. Par conséquent, de nombreux processus physiologiques et biochimiques essentiels de la plante sont affectés de manière négative en cas de carence en magnésium, d'où une baisse de la croissance et du rendement. Dans la plupart des cas, le magnésium participe aux processus métaboliques en activant un grand nombre d'enzymes. Une des principales enzymes activées par le magnésium est la

ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) carboxylase, qui est une des enzymes clés du processus de la photosynthèse et aussi l'enzyme la plus abondante sur terre.

D'un autre côté, les résultats révèlent une augmentation de la teneur moyenne en fer chez le blé dur soumis au déficit hydrique. Selon INRA, le fer est un cofacteur essentiel dans les processus biologiques faisant intervenir des transferts d'électrons: photosynthèse, respiration, synthèse de l'ADN et assimilation de l'azote et du soufre par exemple. Il existe une fenêtre optimale de la concentration en fer pour un développement et une croissance optimaux. En présence de stress, le fer libre peut conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène, hautement toxiques pour la cellule. L'homéostasie du fer doit être donc finement régulée, afin d'éviter la carence, préjudiciable pour le métabolisme, et l'excès, générateur de ROS. En cas d'excès, le fer est stocké dans la vacuole et dans l'apoplasme, et la synthèse de protéines de stockage de fer, les ferritines, est induite. Les ferritines sont des protéines ubiquistes qui forment une sphère creuse capable de stocker du fer sous une forme non toxique et remobilisable pour les besoins du métabolisme.

Concernant la teneur moyenne en zinc, l'analyse des échantillons révèle une forte accumulation de cette molécule chez les tiges et les racines stressées. Selon Chaouiet *al.*(1997), En cas d'excès, le zinc induit un stress de type oxydant, et donc l'activation des enzymes du cycle Asada-Foyer-Halliwell liées notamment à l'ascorbate et au glutathion et qui régulent le statut redox de la cellule (Foyer et Noctor, 2005; Halliwell, 2006). Le stress a causé une accumulation de cet ion dans la plante.

En ce qui concerne le phosphore, le stress hydrique a entraîné une baisse importante à partir du 3^{ème} jour chez les organes stressés. Selon Broadley *et al.*(2007), une teneur élevée en Zn conduit à une réduction de la synthèse de chlorophylle et une dégradation des chloroplastes, et à des interférences qui limitent l'absorption d'éléments tels que le Phosphore. La variété étudiée présente une diversité du comportement vis-à-vis de la contrainte hydrique ainsi que des différences de sensibilité entre les organes d'absorption et les organes photosynthétiques (tiges et racines), ce qui confirme les résultats trouvés par Brugnoli et Björkman (1992) et Bernstein *et al.*(1993). Osonubi *et al.*(1988), ont montré que la sécheresse du sol augmente et que le potentiel hydrique des feuilles diminue ; la concentration en certains ions indispensables tel que le K^+ , diminue alors que d'autres ions spécifiques comme le Na^+ s'accumulent dans le cytoplasme ou dans l'apoplasme provoquant une toxicité ionique qui interfère avec les fonctions métaboliques de la plante (Levitt, 1980).

L'accumulation des ions Na^+ dans la plante limite l'absorption des cations indispensables tels que K^+ et Ca^{2+} . La toxicité de Na^+ dans le cytosol résulterait de son caractère « chaotropique », par comparaison avec K^+ (Clarkson et Hanson, 1980). Elle impliquerait aussi probablement sa capacité à entrer en compétition avec K^+ dans le processus de fixation sur des protéines importantes. Plus de 50 enzymes nécessitent K^+ pour être actives, et Na^+ n'assurerait pas la même fonction (Bhandal et Malik, 1988). Par conséquent, une concentration élevée de Na^+ dans le cytoplasme inhiberait l'activité de nombreuses enzymes et protéines, entraînant des dysfonctionnements de la cellule. Il y aurait une compétition entre Na^+ et Ca^{2+} pour les mêmes sites de fixation apoplasmique. L'interaction entre les ions Na^+ et Ca^{2+} influe sur la croissance des racines des céréales (Greenway et Munns, 1980). Ce déséquilibre nutritionnel est une cause possible des réductions de croissance en présence de stress lorsque des ions essentiels comme K^+ , Ca^{2+} deviennent limitants (Soltani, 1988).

Introduction.

Le stress oxydatif chez les plantes.

La vie est apparue dans un monde anaérobie. Initialement donc, aucune pression sélective n'a poussé les organismes vivants à mettre en place des systèmes enzymatiques insensibles à l'oxygène. Peu à peu, la concentration de dioxygène a augmenté dans l'atmosphère et O₂ est apparu comme un véritable poison pour les cellules végétales. Un grand nombre d'enzymes s'est révélé d'excellents réducteurs pour former des espèces partiellement réduites de l'oxygène, très toxiques est à l'origine de dommages cellulaires majeurs. Les plantes ont alors acquis une tolérance à l'oxygène en se débarrassant de leurs voies métaboliques les plus sensibles et en développant des mécanismes de défense contre ces espèces réduites de l'oxygène. Elles ont aussi réussi à utiliser l'O₂ comme source d'énergie via le processus de respiration. Aujourd'hui, du fait de l'importance qu'a pris ce processus de respiration, l'O₂ est devenu absolument indispensable pour la vie des végétaux.

Cependant, l'O₂ a conservé une part importante de sa toxicité cellulaire. La présence des systèmes de détoxification contre ces espèces partiellement réduites de l'oxygène (superoxyde dismutases, catalases, gaïacol peroxydase et ascorbate peroxydase) est donc primordiale pour la viabilité des cellules végétales. Une insuffisance au niveau de ces systèmes de détoxification peut être à l'origine de la perturbation de la croissance et de l'homéostasie cellulaire chez la plante, souvent associées à des processus de dégénérescence cellulaire.

Le stress oxydatif chez les plantes fait l'objet de très nombreuses revues bibliographiques (Bartosz, 1997; Bolwell et Wojtaszek, 1997; Van Breusegem *et al.*, 2001; Potters *et al.*, 2002; Schutzendubel et Polle, 2002; Blokhina *et al.*, 2003; Apel et Hirt, 2004; Foyer et Noctor, 2005a; Pitzschke *et al.*, 2006; Wormuth *et al.*, 2007 ; Sbartai *et al.*, 2012) et de plusieurs livres (Inze and Montagu, 2001; Smirnoff *et al.*, 2005). Ainsi, le but de cette partie bibliographique n'est pas de faire un point totalement exhaustif sur ce vaste sujet, mais de réaliser un aperçu des différents processus prooxydants et antioxydants se déroulant dans les cellules végétales, permettant de comprendre les mécanismes conduisant à la génération d'un stress oxydatif sous l'effet d'un stress hydrique.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre de la balance des espèces prooxydantes et des systèmes de défense dits antioxydants avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule. Pour expliquer ce phénomène, il faut décrire les facteurs favorisant la production d'espèces prooxydantes et ceux diminuant l'efficacité des antioxydants. De nombreuses voies sont possibles pour la production des radicaux libres mais nous nous limiterons dans cette partie à détailler la chaîne respiratoire mitochondriale et la photosynthèse.

Les Espèces Réactives de l'Oxygène

L'oxygène (ou dioxygène, O_2) est un gaz indispensable à la vie, apparu sur la Terre il y a plus de 2 500 millions d'années, simultanément au développement de la photosynthèse par les algues bleues. A l'exception de certains organismes anaérobies et aérotolérants, l'oxygène est nécessaire à tous les animaux, plantes et bactéries pour produire de l'énergie par l'intermédiaire de chaînes de transport d'électrons telles que celle existant dans les mitochondries des cellules eucaryotes. Au cours de l'évolution, l'adaptation des espèces vivantes à l'oxygène s'est traduite par l'apparition d'enzymes facilitant non seulement sa consommation, mais également la détoxification de ses métabolites réduits que sont le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ces espèces sont appelées espèces réactives de l'oxygène (ROS) car elles sont beaucoup plus toxiques que ne l'est l'oxygène lui-même.

Les ROS sont souvent associées aux radicaux libres. Le terme de radical libre renvoie à n'importe quelle espèce capable d'une existence indépendante (d'où le terme de libre) contenant un ou plusieurs électrons non appariés (Halliwell, 2006). Un électron non apparié est un électron qui occupe seul, une orbitale atomique ou moléculaire. L'exemple le plus simple de radical libre est l'hydrogène qui possède un seul électron non apparié sur sa couche orbitale externe. Ainsi, si les radicaux libres ne sont pas forcément associés à des espèces dérivant de l'oxygène, la notion de réactivité n'est pas forcément relative aux radicaux. Les ROS désignent à la fois des espèces radicalaires de l'oxygène (O_2 , $O_2^{\cdot -}$) et des espèces non radicalaires (O_2^{2-} , 1O_2). Ainsi, tous les radicaux oxygénés sont des ROS, mais tous les ROS ne sont pas des radicaux.

Les différents types de ROS

Il existe des radicaux primaires, qui ont un rôle physiologique particulier et des radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...). (Favier *et al.*, 2003 ; Gardès *et al.*, 2003).

Les ROS primaires

Différents types de ROS, plus réactifs que l'O₂, peuvent être formés dans les organismes vivants. Certaines, directement dérivées de la molécule de dioxygène, sont appelées ROS primaires. Dans un premier temps, un apport énergétique réorganise les électrons de la molécule de dioxygène pour former une des deux formes du dioxygène singulet (Foote *et al.*, 1985) (figure 48).

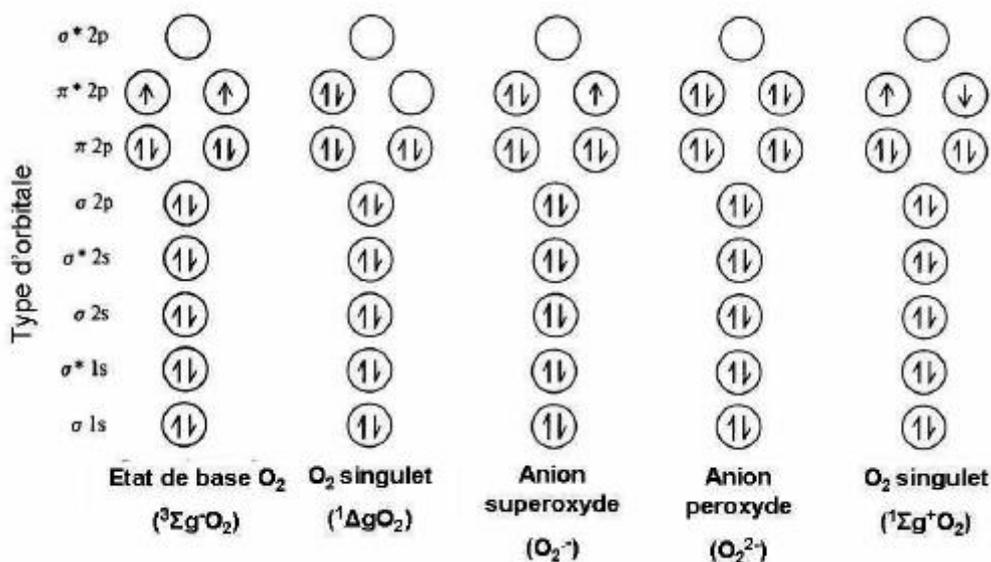


Figure 48. Structure électronique de la molécule de dioxygène et de quelques dérivés (Halliwell, 2006).

Cependant, l'état singulet ¹Σ_g⁺O₂ est très instable et se transforme rapidement en ¹Δ_gO₂ (Figure 48). Cette dernière forme singulet qui peut se retrouver dans les tissus biologiques, est plus communément écrite sous la forme ¹O₂. Le passage à la forme singulet enlève la contrainte de restriction de spin, et ¹O₂ peut réagir directement avec les composants

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

cellulaires. La réactivité du dioxygène singlet étant très importante, sa concentration cellulaire peut être considérée comme négligeable (Foyer et Noctor, 2005b).

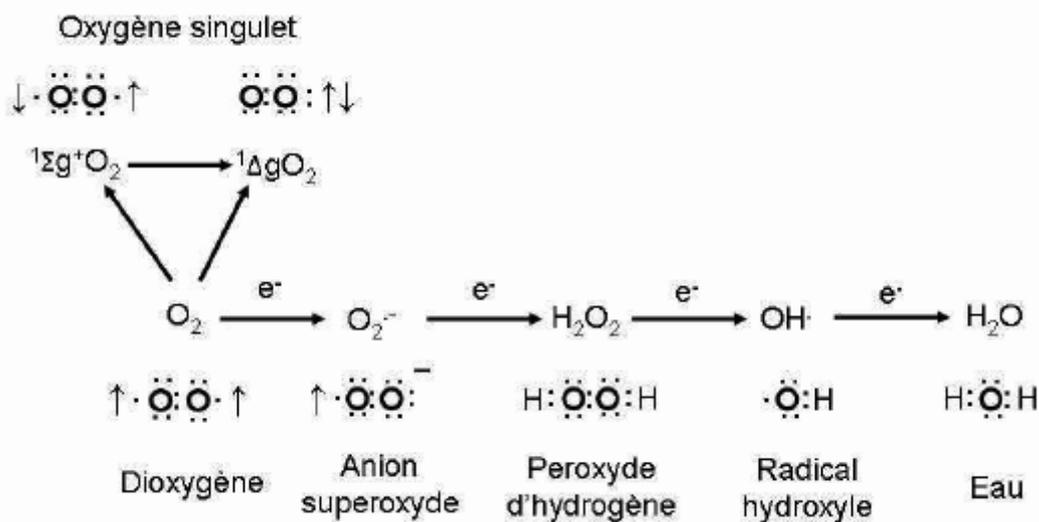


Figure 49. Transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique.

Au cours de divers processus physiologiques, un électron peut également être transféré au dioxygène, ce qui conduit à la formation de l'anion radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Figure 48 et Figure 49). Le potentiel redox du couple $\text{O}_2^{\cdot -} / \text{H}_2\text{O}_2$ est de + 0,94 V (Foyer et Noctor, 2005b). Sa réactivité est limitée et spécifique à certaines molécules biologiques comme les ènes et diènes, certains acides aminés comme le tryptophane, l'histidine ou la méthionine ou les lipides, avec qui il peut former des hydroperoxydes (Van Breusegem *et al.*, 2001). L'anion superoxyde possède une demi-vie courte, d'environ 2 à 4 μs , et ne peut pas réellement diffuser dans la cellule (Van Breusegem *et al.*, 2001). Sa concentration cellulaire est inférieure à 1 nM (Foyer et Noctor, 2005b). L'addition d'un nouvel électron au radical superoxyde permet de former l'ion peroxyde (O_2^{2-}) avec un affaiblissement de la liaison O-O. Dans les systèmes biologiques, les réactions ne s'enchaînent pas de la même manière, et la réduction de l' O_2 par deux électrons ou la réduction d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ conduit à la formation d' H_2O_2 plutôt que d' O_2^{2-} (Figure 49). Le potentiel redox du couple $\text{H}_2\text{O}_2 / \cdot\text{OH}$ est de + 0,54 V (Foyer et Noctor, 2005b). La réactivité du peroxyde d'hydrogène est faible et due essentiellement à sa capacité à oxyder les groupements thiols (-SH). Cette molécule relativement stable possède une durée de vie d'environ 1 ms, permettant une diffusion sur une certaine distance à partir du

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

site de production (Van Breusegem *et al.*, 2001). La concentration moyenne intracellulaire en H_2O_2 est de l'ordre de $0,5 \mu\text{M}$ (Mittler, 2002) mais peut varier de $0,1$ à $100 \mu\text{M}$ (Foyer et Noctor, 2005b). L'addition de deux nouveaux électrons élimine la liaison O-O et conduit à la formation de deux ions oxydes (O_2^-). De la même manière, dans les systèmes biologiques, la réduction de l' O_2 par quatre électrons ou celle de l' H_2O_2 par deux électrons conduit à la formation d'eau (Figure 49). Compte-tenu de leurs relatives faibles réactivités, la toxicité de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène est essentiellement due à leur capacité à générer une autre ROS, le radical hydroxyle (Figure 49). Toutefois, cette génération est catalysée par la présence de métaux de transition comme le cuivre ou le fer. Dans un premier temps, O_2^- réduit un ion métallique qui va, par la suite, pouvoir être oxydé par H_2O_2 , via la réaction de Fenton (Figure 50). La somme de ces deux réactions, appelée réaction d'Haber Weiss, aboutit à la formation d' $\bullet\text{OH}$.

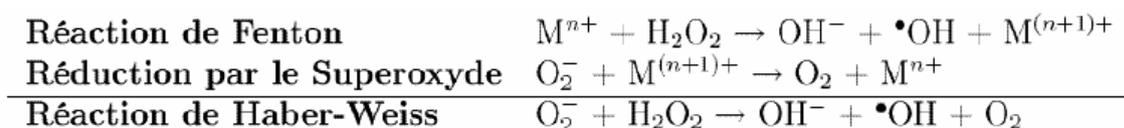


Figure 50. Réaction d'Haber-Weiss conduisant à la formation du radical hydroxyle.

M : Correspond à un métal de transition (essentiellement le cuivre et le fer).

Si les auteurs ne s'accordent pas sur le temps de demi-vie de ce radical hydroxyle ($<1 \mu\text{s}$ à $<1 \text{ns}$), tous s'entendent sur son extrême réactivité et son très fort pouvoir oxydant ($E^\circ \text{OH}/\text{H}_2\text{O} = + 2,20\text{V}$). Il interagit fortement et très rapidement avec toutes les molécules biologiques. Ainsi, sa concentration cellulaire est considérée comme négligeable (Foyer et Noctor, 2005b).

Les ROS secondaires

Les ROS secondaires correspondent aux ROS formées par réactions entre les ROS primaires et les composés biochimiques de la cellule. Le Tableau 2 présente quelques ROS secondaires. Contrairement aux ROS primaires, produites de façon régulière et en quantité importante par les cellules végétales, les ROS secondaires sont seulement formées dans des conditions particulières. Mis à part certains peroxydes organiques, très peu d'études se sont intéressées à

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

ces ROS, et leur importance biologique est discutable. Les Espèces Réactives de l'Azote (ERA) sont également présentées dans le tableau (02).

Ces espèces particulières, possédant à la fois des capacités oxydantes et nitrifiantes, devraient plutôt être dénommées Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote.

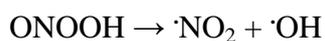
Tableau 2. Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (ERA) radicalaires ou non (selon Halliwell, 2006).

| Espèces radicalaires | Espèces non radicalaires |
|--|---|
| <p>ERO :</p> <p>Carbonate, $\text{CO}_3^{\cdot -}$</p> <p>Peroxyl, RO_2^{\cdot}</p> <p>Alkoxyl, RO^{\cdot}</p> <p>Radical dioxyde de carbone, $\text{CO}_2^{\cdot -}$</p> | <p>ERO :</p> <p>Acide hypobromeux, HOBr</p> <p>Acide hypochloreux, HOCl</p> <p>Peroxydes organiques, ROOH</p> <p>Peroxynitrite, ONOO⁻</p> <p>Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^{\cdot}$</p> <p>Acide peroxy nitreux, ONOOH</p> <p>Peroxomonocarbonate, $\text{HCOOCO}_2^{\cdot -}$</p> |
| <p>ERA :</p> <p>Oxyde nitrique, NO</p> <p>Dioxyde nitrique, $\cdot\text{NO}_2$</p> <p>Radical nitrate, $\cdot\text{NO}_3$</p> | <p>ERA :</p> <p>Acide nitrique, HNO_2</p> <p>Cation et anion nitrosyle, NO^+ et $\text{NO}^{\cdot -}$</p> <p>Tétraoxyde et trioxyde d'azote, N_2O_4 et N_2O_3</p> <p>Peroxynitrite, ONOO⁻</p> <p>Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^{\cdot}$</p> <p>Acide peroxy nitreux, ONOOH</p> <p>Cation nitronium, NO_2^+</p> <p>Chlorure de nitrile, NO_2Cl</p> |

Ces dix dernières années, le rôle physiologique de l'oxyde nitrique (NO) a été particulièrement étudié chez les plantes (Crawford et Guo, 2005; Delledonne, 2005; Shapiro et Gerald, 2005; Yamasaki et Cohen, 2006; Arasimowicz and Floryszak-Wieczorek, 2007). Il apparaît que le NO joue un rôle essentiel en tant que molécule de signalisation. L'oxyde nitrique peut également interagir avec $\text{O}_2^{\cdot -}$ pour former du peroxy nitrite (Beckman

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

et Koppenol, 1996) : $\cdot\text{NO} + \text{O}_2 \cdot^- \rightarrow \text{ONOOA}$ un pH physiologique, le peroxy-nitrite se protone rapidement pour former de l'acide peroxy-nitreux. Ce puissant agent nitrifiant et oxydant peut altérer directement de nombreuses molécules biologiques. Il peut également générer des dommages indirects en subissant une fission homolytique produisant deux puissants agents oxydants, le dioxyde nitrique et le radical hydroxyle (Beckman et Koppenol, 1996) :



Ainsi, les voies de production des ROS et d'ERA primaires sont fortement interconnectées. C'est pour cette raison qu'une partie des ERA est considérée comme des ROS par certains auteurs (Tableau 02). Néanmoins, la quantité d' $\cdot\text{OH}$ provenant de cette voie, ainsi que la quantité d'ERA produite, est faible dans les tissus végétaux. En effet, la quantité de $\cdot\text{NO}$ générée est de l'ordre de quelques $\text{nmol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Vanin *et al.*, 2004), alors que la quantité d' $\text{O}_2 \cdot^-$ produite est de l'ordre de plusieurs centaines de $\mu\text{M.s}^{-1}$ (Mittler, 2002) ; la teneur moyenne des cellules végétales en H_2O_2 est de l'ordre de plusieurs micromolaires (Foyer et Noctor, 2005b). Pour cette raison, la suite de cette partie bibliographique sera uniquement consacrée aux ROS primaires.

Cibles des ROS

Les ROS sont des molécules très réactives et certaines d'entre elles, telles que le H_2O_2 , peuvent même diffuser à travers les membranes (Bérubé *et al.*, 2000). Alors, les ROS peuvent causer de graves dommages à des composantes importantes de la cellule. Les cibles des ROS sont principalement les protéines, les lipides membranaires ainsi que l'ADN (Perez martinez *et al.*, 2000). La figure 50 illustre la formation de quelques-uns des principaux ROS ainsi que les dommages qu'ils sont susceptibles de créer. Dans cette figure, les ROS identifiés comme causant les dommages sont l' $\cdot\text{OH}$ et l' $\cdot\text{ONOO}$ ", car ils sont les plus réactifs (Rosselli *et al.*, 1996 ; Ekerhovd *et al.*, 1999)

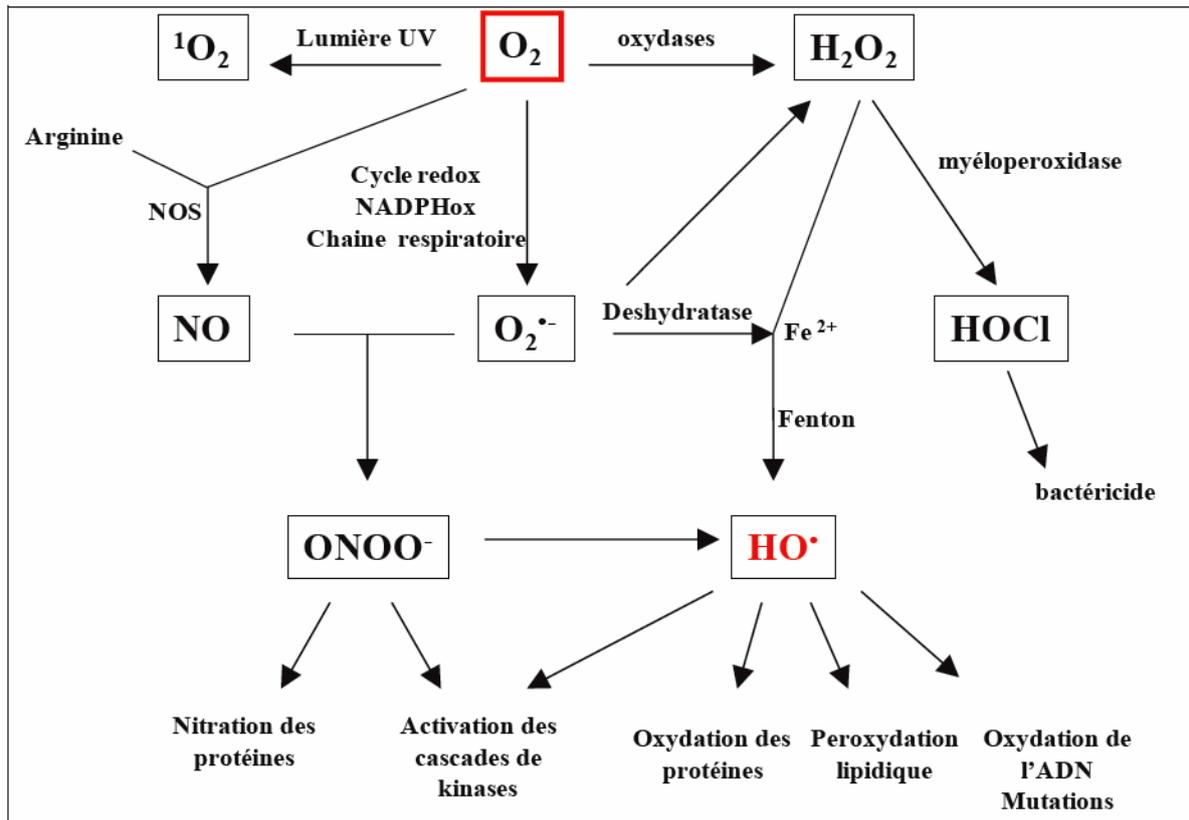


Figure 51. Espèces réactives de l'oxygène et dommages cellulaires.

Réactivité vis-à-vis des protéines

Les ROS peuvent attaquer différents éléments des protéines comme leurs groupements sulfhydriles (SH) (Lapointe et Bilodeau, 2003 ; Lapointe *et al.*, 2005). Les tyrosines sont également des composantes des protéines qui peuvent être attaquées par les ROS, dont le peroxyde d'hydrogène. Il en résulte alors la formation de la nitrotyrosine (Kang *et al.*, 2005). De plus, lorsqu'une protéine est attaquée par une ROS, il y a fréquemment formation de dérivés carbonyles, c'est pourquoi ces derniers sont souvent utilisés comme indicateurs de l'action des ROS sur les protéines (Emond *et al.*, 2004). La formation de ponts disulfures additionnels, des changements dans l'activité enzymatique et des problèmes lors du transport membranaire sont quelques unes des dysfonctions causées par l'oxydation des protéines (Yun *et al.*, 1997 ; Jablonka *et al.*, 2000 ; Lapointe *et al.*, 2005). Cependant, l'oxydation des acides aminés des protéines est généralement induite par le radical hydroxyle mais peut aussi l'être par H_2O_2 . Ces modifications peuvent intervenir sur la chaîne carbonée principale (Berlett et Stadtman,

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

1997) ou des chaînes latérales (Uchida et coll, 1990), et peuvent entraîner la perte de la structure et/ou de la fonction d'une protéine.

Réactivité vis-à-vis des lipides

Les ROS peuvent également s'attaquer aux lipides et plus particulièrement aux acides gras polyinsaturés des phospholipides des membranes. Les conséquences de la peroxydation lipidique sont nombreuses. Parmi celles-ci, on retrouve une réorganisation ainsi qu'une agglomération des phospholipides, une fluidité des membranes abaissées et cela peut même entraîner la disparition des compartiments cellulaires (Perez martinez *et al.*, 2000).

Réactivité vis-à-vis de l'ADN

Les ROS peuvent attaquer les diverses composantes de l'ADN telles que les désoxyriboses et les bases azotées. Des problèmes de transcriptions et de réplifications peuvent être générés. Cela peut alors mener à des changements dans l'expression des gènes et à des mutations. Il est aussi possible que les ROS causent des cassures simples ou doubles brins (Ekerhovd *et al.*, 1999 ; Perez martinez *et al.*, 2000, Burnett *et al.*, 2002).

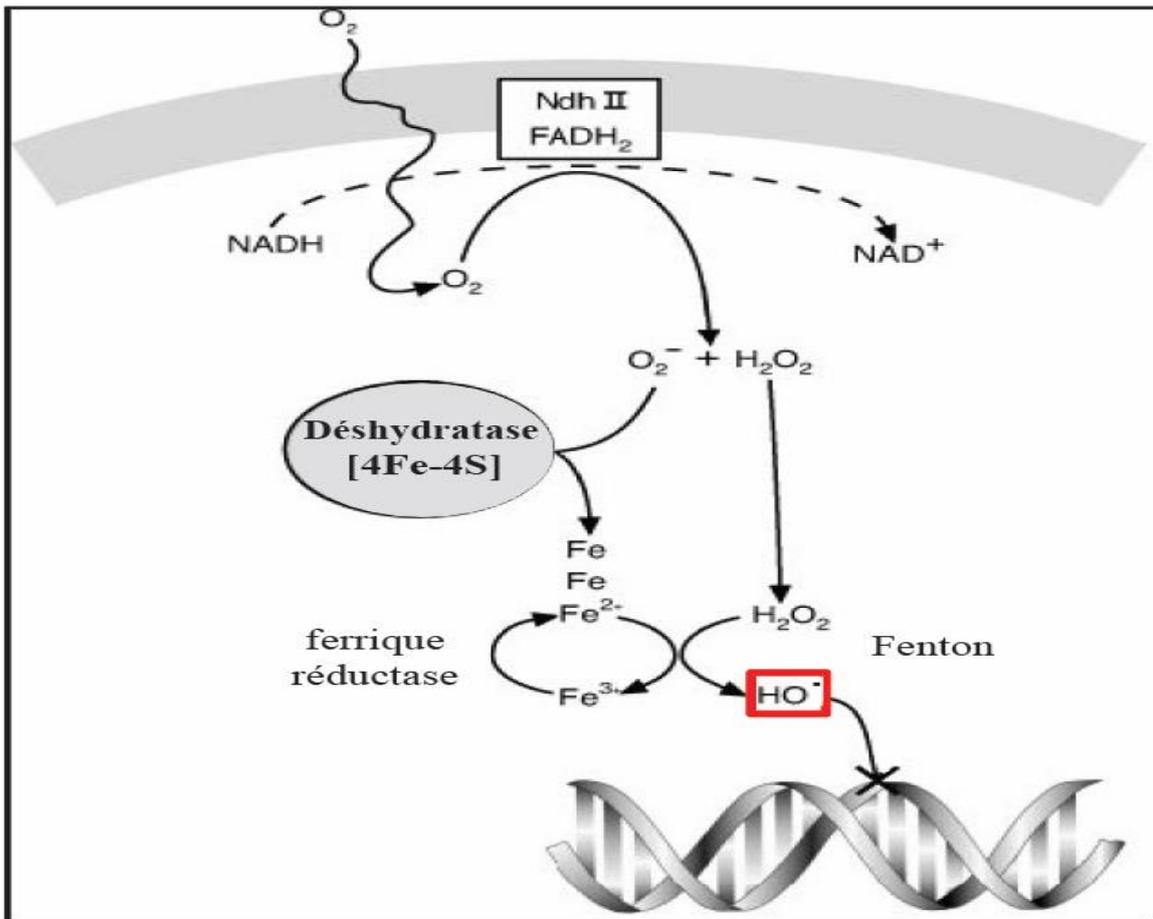


Figure 52 : Dommages de l'ADN causé par stress oxydatif : O₂⁻ oxyde les centres [4Fe-4S] des déshydratases, relâchant du fer libre dans le cytosol. Ce fer libre catalyse la réaction de Fenton, générant le radical hydroxyle qui attaque l'ADN.

Principales sources de ROS

Chez les plantes, il existe de nombreuses sources cellulaires de ROS, localisées à divers endroits de la cellule. Les trois sources principales sont les chaînes de transport d'électrons (CTE) des chloroplastes et mitochondries, certaines enzymes comme les peroxydases et oxydases et enfin, les molécules photosensibilisatrices comme la chlorophylle (Dat *et al.*, 2000; Blokhina *et al.*, 2003).

La chaîne respiratoire mitochondriale

Les mitochondries sont essentielles dans les processus énergétiques cellulaires. Elles sont limitées par deux membranes de propriétés très différentes. Leur membrane interne renferme les éléments de la chaîne de transport des électrons qui assure la phosphorylation oxydative.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Au cours de la respiration, la libération d'énergie lors de l'oxydation complète de composés fournis essentiellement par le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) est couplée à la conversion de l'ADP et Pi en ATP (Siedow et Umbach, 1995). Le TCA est lui-même principalement alimenté, par le fonctionnement de la glycolyse dans le cytoplasme, mais aussi par la formation d'oxaloacétate lors de la carboxylation du phosphoénol pyruvate ou le transfert de malate en provenance du chloroplaste, par exemple. Le TCA produit très majoritairement le CO₂ dégagé lors de la respiration (Siedow et Umbach, 1995). Le transfert des électrons du NAD(P)H sur l'oxygène (figure 52) s'effectue par l'intermédiaire de transporteurs d'électrons organisés en quatre complexes (Trumpower et Gennis, 1994) : Le complexe I (**NADH : ubiquinone oxydoréductase**) est une NADH déshydrogénase qui oxyde le NADH. Au NADH généré lors du déroulement du cycle de Krebs s'ajoute chez les plantes le NADH produit par l'oxydation de la glycine dans la matrice. Le complexe I réduit un pool d'ubiquinone se trouvant dans la membrane interne. Le complexe II (**succinate : ubiquinone oxydo-réductase**) catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et transfère les électrons qui en résultent également à l'ubiquinone. L'ubiquinone réduite par le complexe I et II est oxydée par le complexe III (**ubiquinone : cytochrome c oxydoreductase**) qui transfère les électrons vers une molécule de cytochrome c. Le complexe IV (**cytochrome c oxydase**) qui constitue le complexe terminal de la série oxyde le cytochrome c réduit et transfère les électrons sur l'oxygène (Siedow et Umbach, 1995).

Ce transfert d'électrons est couplé au passage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV. Le gradient électrochimique transmembranaire qui en résulte est utilisé par l'ATP synthase pour la production d'ATP. Cette voie de transfert jusqu'au dioxygène via la **cytochrome oxydase** (COX) se retrouve chez tous les eucaryotes (Anthony *et al.*, 2002). Outre le complexe I, les mitochondries des plantes et d'autres organismes possèdent des NAD(P)H déshydrogénases localisées sur la face interne et externe de la membrane interne (Douce et Neuburger, 1989). Les NAD(P)H déshydrogénases internes oxydent le NADH de la matrice mitochondriale tandis que le NAD(P)H déshydrogénase externe peut oxyder le NADH et le NADPH du cytosol (Moller et Ramsusson, 1998 ; Rasmusson *et al.*, 2004).

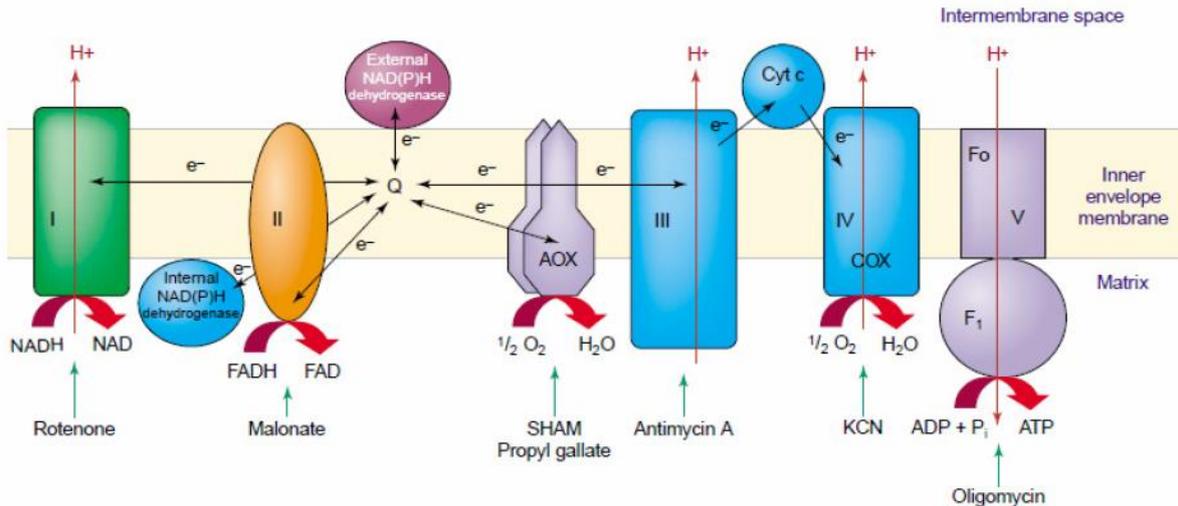


Figure 53 : Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons, des sites de pompage des protons et des inhibiteurs de chaque complexe (Raghavendra et Padmasree, 2003). Complexe **I** : NADH ubiquinone oxydoréductase; **II** : succinate ubiquinone oxydoréductase; **III** : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase; **IV**: cytochrome c oxydoréductase. SHAM : acide salicylhydroxamique.

Outre le complexe I, les mitochondries des plantes et d'autres organismes possèdent des NAD(P)H déshydrogénases localisées sur la face interne et externe de la membrane interne (Douce et Neuburger, 1989). Les NAD(P)H déshydrogénase internes oxydent le NADH de la matrice mitochondriale tandis que le NAD(P)H déshydrogénase externe peut oxyder le NADH et le NADPH du cytosol (Moller et Ramsusson, 1998 ; Rasmusson *et al.*, 2004).

De plus, il existe une oxydase terminale supplémentaire, l'**alternative oxydase** (AOX), qui court-circuite le cytochrome c oxydase, ce qui constitue la voie alterne de la respiration (voie AOX). L'activité de l'alternative oxydase est insensible aux inhibiteurs de la COX tels l'antimycine A et le cyanure.

La réduction de l'oxygène par l'AOX n'est pas couplée à la formation d'un gradient électrochimique et l'énergie est perdue sous forme de chaleur (Lambers, 1982). L'alternative oxydase est généralement considérée comme essentielle dans la modulation du niveau énergétique cellulaire. Lorsque le cycle de Krebs produit trop rapidement de NADH et de FADH₂ par rapport à la capacité d'oxydation de la chaîne respiratoire, l'AOX serait activée et évitant ainsi le blocage des réactions respiratoires en permettant aux processus d'oxydation des substrats par la glycolyse et le cycle de Krebs de continuer à fonctionner (Vanlerberghe et McIntosh, 1997). Enfin, l'activité AOX peut limiter la production mitochondriale de ROS, en maintenant la chaîne mitochondriale de transport d'électrons relativement oxydée (Vanlerberghe et McIntosh, 1997 ; Moller, 2001). Compte tenu de son rôle dans l'ajustement

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

du métabolisme respiratoire chez les plantes, toute condition métabolique qui conduit à une accumulation d'ubiquinone réduit, de NADPH mitochondrial ou de pyruvate peut avoir le potentiel d'augmenter le flux d'électrons vers la voie alternative. Ces conditions peuvent éventuellement être induites lors de l'existence d'un déséquilibre entre les deux extrémités du métabolisme respiratoire : le catabolisme de carbone et le transfert des électrons (Vanlerberghe et McIntosh, 1997). La partition entre la voie conduisant à la COX et celle conduisant à l'AOX est régulée suivant les besoins métaboliques de la cellule et les conditions environnementales.

La photosynthèse

Lors de la photosynthèse, l'énergie solaire est utilisée pour produire des composés organiques, à partir du CO₂ atmosphérique. Le mécanisme se décompose en deux types de réactions : des réactions primaires pendant lesquelles l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique et pouvoir réducteur sous forme d'ATP et de NADPH, et des réactions secondaires pendant lesquelles l'ATP et le NADPH sont utilisés pour la synthèse des carbohydrates au niveau du cycle de Calvin. Les réactions primaires fournissent aussi l'énergie pour activer l'équipement enzymatique nécessaire à la fixation du dioxyde de carbone.

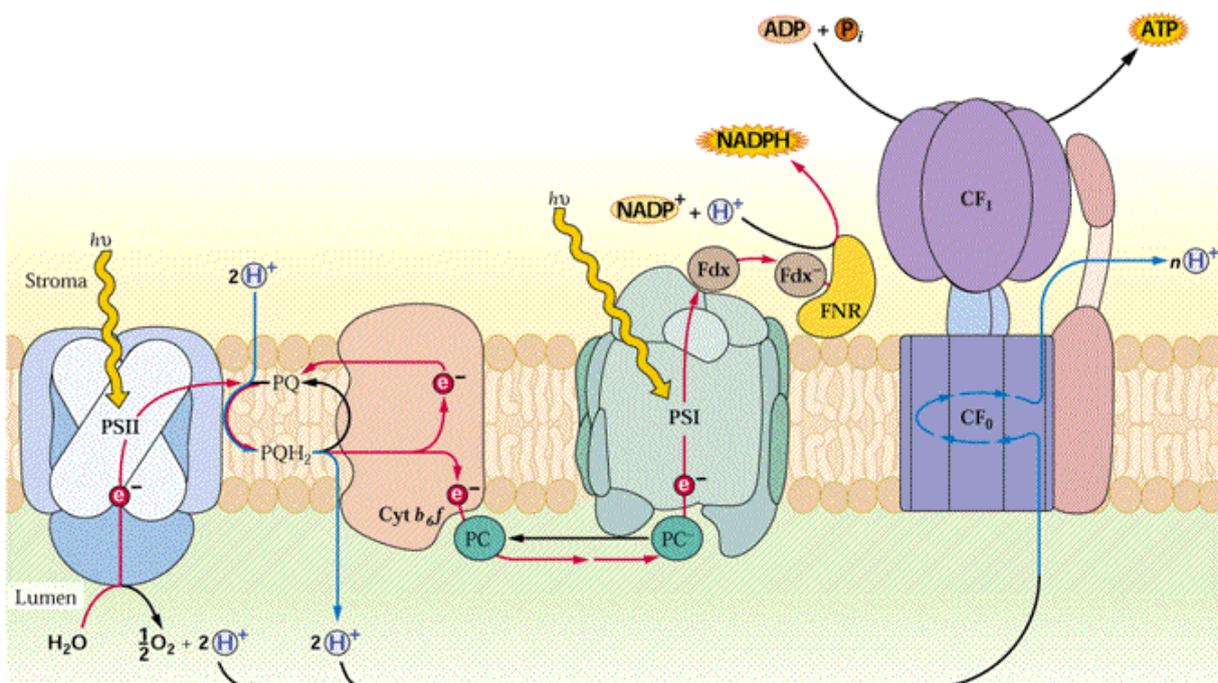


Figure 54. Chaîne chloroplastique de transfert d'électron localisée dans les membranes thylacoïdiennes: l'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique (ATP et NADPH) qui sera utilisé par le Cycle de Calvin. (Buchan *et al.*, 2002).

Les réactions primaires de la photosynthèse

L'énergie lumineuse est captée au niveau de deux grands complexes plurimoléculaires appelés photosystème I (PSI) et photosystème II (PSII) localisés dans la membrane des thylacoïdes. Les photosystèmes sont constitués d'un centre réactionnel et d'une antenne collectrice (ou LHC light harvesting complexe). Les centres réactionnels du PSI et PSII sont désignés respectivement par les termes de P700 (deux chlorophylles *a* dont le maximum d'absorption se situe à 700 nm) et P680 (4 chlorophylles *a* dont le maximum d'absorption se situe à 680 nm). Chez les plantes, les chlorophylles du LHC piègent la lumière et transfèrent son énergie d'excitation aux centres réactionnels de l'un des deux photosystèmes. L'excitation provoquée par les photons dans les antennes est transmise avec une grande efficacité de chlorophylles en chlorophylles, par résonance, jusqu'au centre réactionnel (figure 55) (Allen et Williams, 1998).

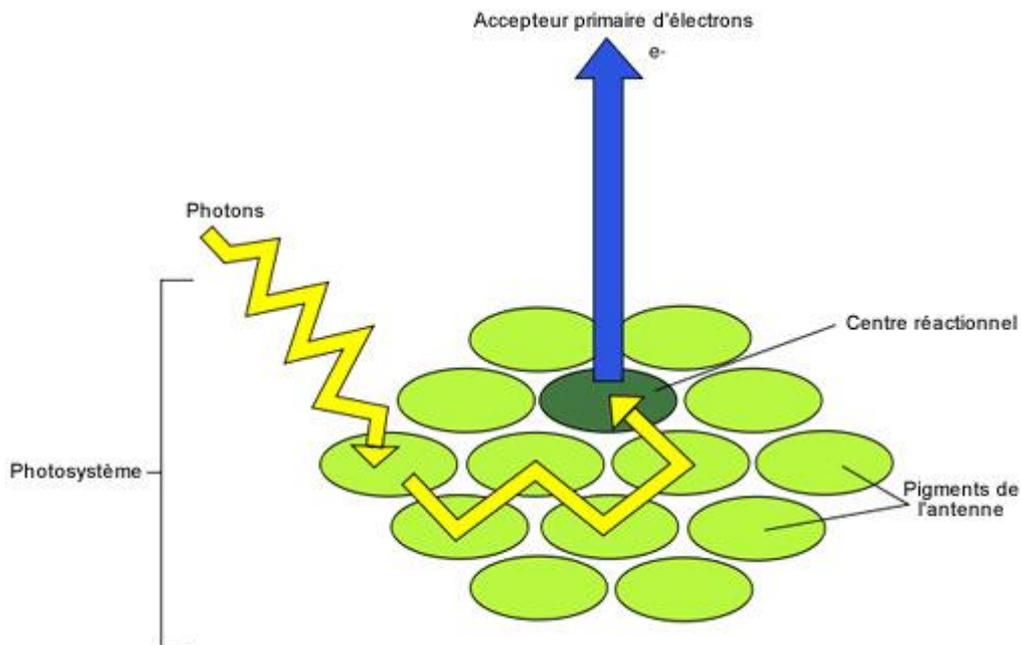


Figure 55. Transfert d'énergie par résonance des pigments assimilateurs au centre réactionnel (d'après Taiz et Zeiger, 2002) : un photosystème comprend une antenne et un centre réactionnel. Les molécules de pigments de l'antenne absorbent les photons incidents et transfèrent l'énergie d'excitation au centre réactionnel où se déroule la réaction photochimique d'oxydoréduction.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

L'énergie lumineuse absorbée par l'appareil photosynthétique n'est pas totalement transformée en énergie chimique. Une partie est perdue sous forme de chaleur et de fluorescence (Butler, 1978). Suite à l'absorption d'un photon, la chlorophylle excitée passe à son état singulet ($^1\text{Chl}^*$). Elle retourne à son état fondamental via plusieurs voies de dissipation de l'énergie qu'elle contient (Muller *et al.*, 2001) (figure 56) :

- Elle peut être réémise sous forme de fluorescence chlorophyllienne
- Elle peut être transmise aux centres réactionnels et ensuite utilisée pour la photochimie
- Elle peut être dissipée sous forme de chaleur
- la chlorophylle peut aussi passer de son état singulet excité à l'état triplet ($^3\text{Chl}^*$). $^3\text{Chl}^*$ peut transférer son énergie à l'oxygène pour générer l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2^*$), qui est un oxygène réactif extrêmement nuisible à l'appareil photosynthétique (Appel et Hirt, 2004). Les processus de la photochimie, de la fluorescence chlorophyllienne et de la perte sous forme de chaleur sont en concurrence pour l'énergie absorbée. Si le taux d'un processus augmente les taux des deux autres diminueront (Baker, 2008).

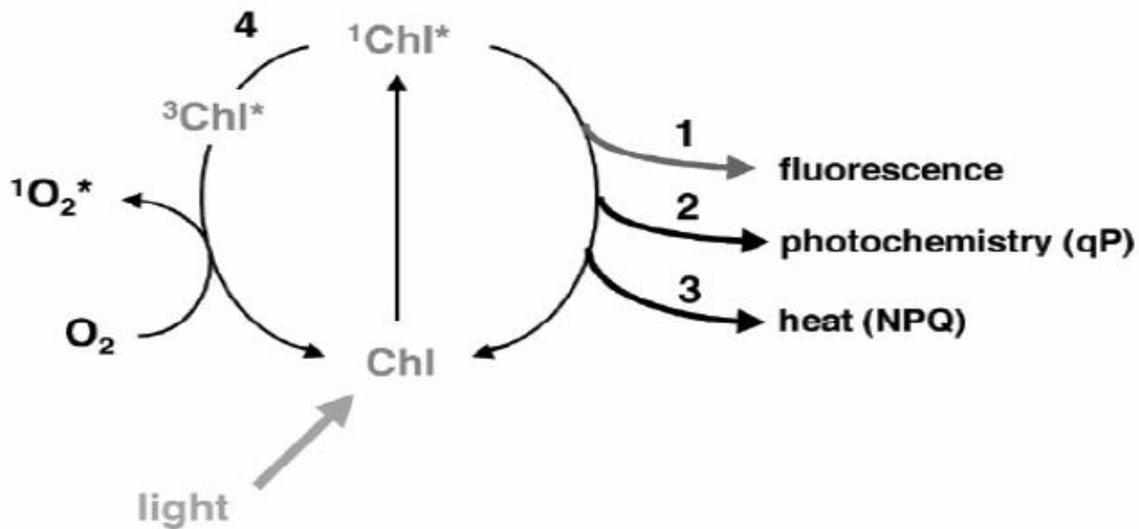


Figure 56. Les destins possibles de chlorophylle excitée (Muller *et al.*, 2001). Lorsque Chl absorbe la lumière, elle passe de son état fondamentale à son état excité singulet $^1\text{Chl}^*$. À partir de cet état, il y a plusieurs voies pour dissiper l'énergie d'excitation. Elle peut être réémise sous forme de fluorescence (1). Cette excitation peut être utilisée pour activer les réactions photosynthétiques (2) ou dissiper sous forme de chaleur (3), ces deux mécanismes réduisent la quantité de fluorescence. Ils se réfèrent comme qP et NPQ de la fluorescence chlorophyllienne.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

En plus de ce transfert linéaire des électrons, il existe un **transport cyclique d'électrons** (figure 57) : Les électrons sont transmis à la ferrédoxine. La ferrédoxine, plutôt que réduire le NADP⁺, cède les électrons à la plastoquinone (PQ) via le cytochrome *b6f*. Le NADPH peut aussi réduire le pool de plastoquinones via une NAD(P)H déshydrogénase de la membrane thylacoïdienne. Les électrons reviennent finalement au PSI en passant par le complexe du cytochrome et la plastocyanine. Le transport cyclique d'électrons permet la synthèse d'ATP sans production de NADPH : photophosphorylation cyclique (Finazzi *et al.*, 2006).

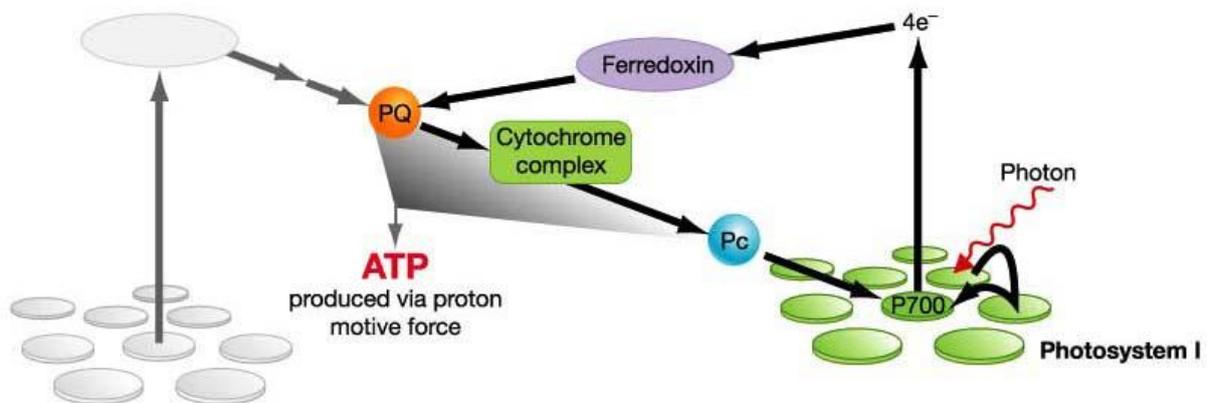


Figure 57. Transport cyclique d'électrons. Ce transport ne produit pas de NADPH mais l'énergie peut être utilisée pour produire de l'ATP.

Les vitesses relatives des transports linéaires et cycliques sont influencées par le rapport des concentrations de NADPH et de NADP⁺. Quand le rapport NADPH / NADP⁺ est élevé, le NADP⁺ peut limiter le transport linéaire. Sous ces conditions, le transport cyclique des électrons peut augmenter. Le flux d'électrons cyclique est un mécanisme utilisé par les plantes pour produire une acidification du lumen (et donc une dissipation thermique de l'énergie captée par les antennes collectrices du PSII) dans des conditions de stress (Heber et Walker, 1992 ; Burrows *et al.*, 1998).

Les réactions secondaires de la photosynthèse: fixation du CO₂

L'ATP et le NADPH sont utilisées au niveau du cycle de Calvin (figure 58) pour la réduction du CO₂ et de l'O₂ atmosphérique. Le CO₂ et l'O₂ sont fixés sur le même accepteur organique, le RuBP.

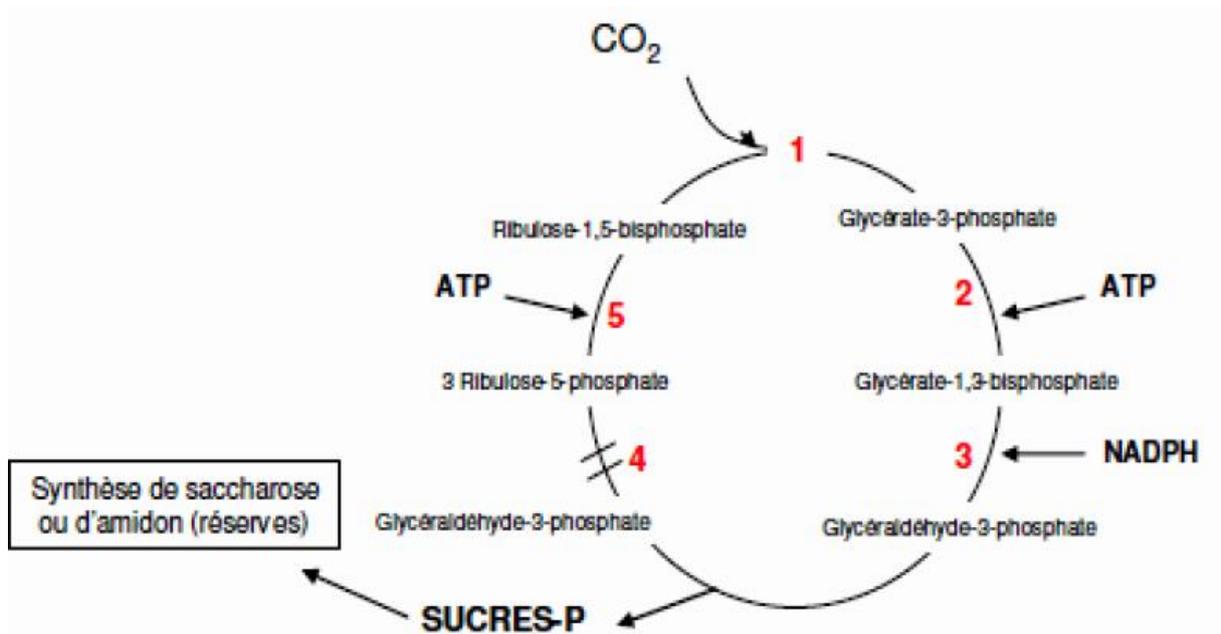


Figure 58. Cycle de Calvin-Benson-Bassham simplifié (ead.univ-angers.fr) : L'énergie chimique (ATP et pouvoir réducteur sous la forme de NADPH) produit par la chaîne chloroplastique de transfert des électrons est utilisée dans le cycle de Calvin- Benson-Bassham (cycle CBB). Les principales enzymes impliquées dans ce cycle sont: **1**: Rubisco ; **2**: Phosphoglycérate kinase ; **3**: Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase ; **4**: recyclage du ribulose-1,5-bisphosphate via la voie des pentoses phosphate ; **5**: phosphoribulokinase.

Effets délétères du stress oxydant

Parmi les ROS, les principaux composés formés sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (OH), l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et l'oxygène singulet (1O_2). Ces ROS possèdent un fort pouvoir oxydant et vont réagir avec la plupart des molécules biologiques, entraînant d'importantes modifications de leurs propriétés physico-chimiques aux conséquences néfastes pour l'intégrité de la cellule. De plus, certaines molécules non chargées sont également capables de diffuser à travers les parois végétales et pourront ainsi causer de multiples dégâts comme l'oxydation des bases de l'ADN, ou encore l'oxydation de protéines notamment au niveau des cystéines et des méthionines. En effet, ce sont les deux acides aminés les plus sensibles et puisqu'ils sont assez souvent impliqués dans la fixation de métaux ou dans les propriétés catalytiques de nombreuses enzymes et protéines, leur oxydation peut entraîner une perte d'activité de ces protéines. Les lipides membranaires (phosphatidylcholine, acides gras, esters de cholestérol...) sont également sujets à

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

modification, le plus souvent à une peroxydation, ce qui provoquera éventuellement des modifications de la fluidité membranaire.

Les antioxydants

Peut être considérée comme antioxydante une molécule qui, étant présente en une faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Whiteman, 2004). Ainsi, elle permet de limiter la production des ROS lors de leurs processus métaboliques. L'ensemble de ces voies est résumé dans la figure 59.

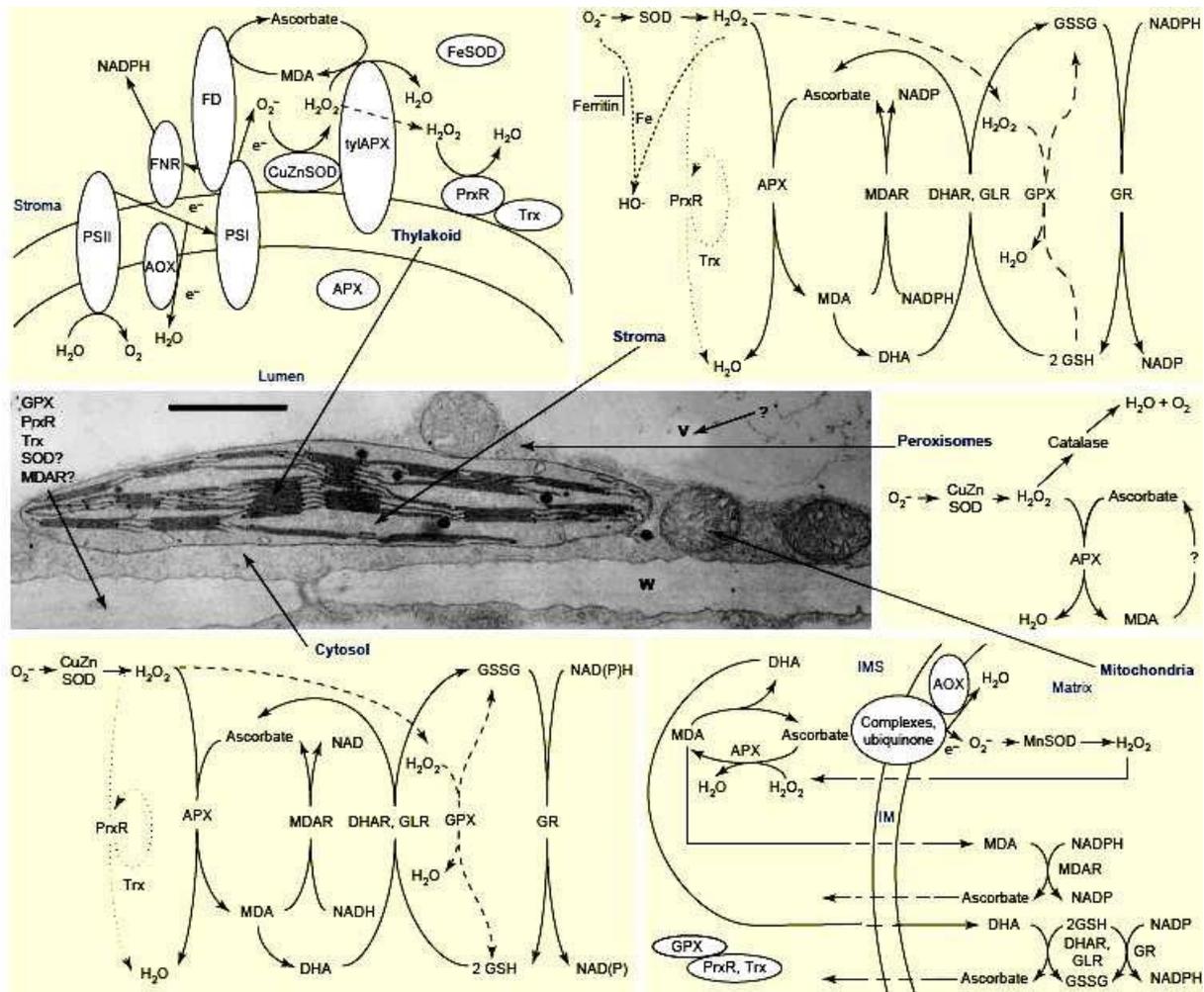


Figure 59. Localisation des différentes voies enzymatiques de détoxication des ROS au niveau d'une cellule végétale (Mittler *et al.*, 2004).

Les catalases (CAT)

Les quantités d' H_2O_2 formées par le métabolisme, pouvant devenir préjudiciables pour la cellule, doivent absolument être régulées par des enzymes de détoxification. Parmi celles-ci, les catalases ont été découvertes il y a plus d'un siècle, le terme catalase ayant été utilisé pour la première fois par Loew en 1900. Ce sont des enzymes dont le rôle est de catalyser la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et O_2 ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) (Antoniuk *et al.*, 2000). Ces enzymes sont réputées comme étant parmi les plus actives avec un turn-over exceptionnellement élevé (autour de $20\,000\text{ s}^{-1}$). Il existe trois classes de catalases. Les deux premières contiennent un hème : les catalases typiques et les catalase-peroxydases. Ces catalases typiques présentent une structure généralement tétramérique, possèdent une masse moléculaire comprise entre 200 et 400 kDa et contiennent un hème par monomère. Elles sont retrouvées chez les eubactéries, archaebactéries, protistes, champignons, plantes et animaux et forment le groupe le plus important (Zamocky et Koller, 1999). Il est possible quelquefois de retrouver du NADPH lié à chaque sous-unité, ce produit ne fonctionne pas comme cofacteur dans un monomère entre quatre hélices (Antoniuk *et al.*, 2000).

Les ascorbates peroxydases (APX)

Ce sont des peroxydases à hème également, qui réduisent majoritairement H_2O_2 (Raven *et al.*, 2004). Comme leur nom l'indique, ces enzymes utilisent l'ascorbate pour leur régénération. Elles dépendent donc principalement du cycle ascorbate-glutathion. Ces enzymes sont relativement bien connues, notamment leur mécanisme d'action. Selon l'état d'oxydation du fer au niveau de l'hème, la structure du site actif est modifiée, régulant ainsi l'activité de cette peroxydase (Badyal *et al.*, 2008). La première étape est la formation d'un intermédiaire oxydé par 2 électrons qui sera ensuite réduit par un substrat de nature organique généralement. Cette première étape est sujette à un mécanisme acido-basique, une histidine conservée au niveau du site actif étant le catalyseur acido-basique du clivage de la molécule d' H_2O_2 (Hiner *et al.*, 2002). Les plantes possèdent plusieurs isoformes d'ApX réparties dans différents compartiments subcellulaires, notamment le chloroplaste et le cytosol. Dans le chloroplaste, on trouve des isoformes dans le stroma et d'autres accrochées aux thylacoïdes. Bien que très similaires, ces deux types d'ApX diffèrent par la présence d'une extension C terminale pour l'ancrage dans les membranes thylacoïdales.

Les glutathions peroxydases (GPX).

L'évolution de l'activité gaïacol peroxydase suit exactement celle de la glutathion peroxydase (Meksem, 2007). Les GPX végétales ne possèdent plus de groupement prosthétique sélénium-cystéine dans leur site catalytique, mais seulement un résidu cystéine (Navrot *et al.*, 2006). Bien que les GPX possèdent encore la capacité d'utiliser le GSH pour réduire l' H_2O_2 , des peroxydes lipidiques ou des hydroperoxydes organiques (Ursini *et al.*, 1995; Mullineaux *et al.*, 1998), elles utilisent de façon préférentielle et plus efficiente les thioredoxines comme substrat (Navrot *et al.*, 2006). Certaines GPX végétales sont même incapables d'utiliser le GSH.

Matériel et méthodes

Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans ce travail est le blé dur de la famille des Poacées plus précisément le *Triticum durum Desf.* Les organes choisis pour réaliser cette étude sont les tiges et les racines. Les échantillons proviennent de l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales (OAIC) d'El Hadjar, Annaba, Algérie. Nous avons utilisé la variété GTA dur.

Conduite de l'essai

Les essais sont menés au niveau du laboratoire de Toxicologie Cellulaire de l'Université Badji Mokhtar Annaba et au laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire des Plantes de l'Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. Après 4 jours de germination, les germes de blé subissent un stress hydrique par arrêt d'arrosage et des échantillons de blé sont analysés au 3, 5, 7 et 9^{ème} jour après arrêt de l'arrosage. Une partie continue à être arrosée normalement et est considérée comme témoin.

La germination a lieu à une température de jour 21°C et de nuit 17-21°C avec un éclairage artificiel de 6 H à 22 H.

Mesure de l'activité enzymatique

Extraction enzymatique.

La méthode adaptée afin d'obtenir l'extrait enzymatique des racines et des tiges de blé dur soumises à un stress hydrique, est celle de Loggni *et al.* (1999). L'extrait sera utilisé sur la mesure de l'activité Catalase (CAT), Guaiacol – Peroxydase (GPX) et Ascorbate – Peroxydase (APX). Après neuf jours de traitement, les tiges et les racines fraîches (1g) sont broyées à froid à l'aide d'un mortier dans un tampon phosphate (50 ml Na K, pH = 7,2) à raison de 1ml du tampon pour 1 g de racines ou de tiges. L'homogénat est ensuite filtrée à l'aide toile adéquate avant de procéder à une centrifugation à froid à 12000x g pendant 20 min (centrifugeuse Sigma 3-16 K). Le surnageant obtenu sera utilisé comme extrait pour la détermination des différents extraits enzymatiques.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Quantification des mesures spectrophotométriques.

La formule suivante est utilisée afin de quantifier les différentes mesures spectrophotométriques, suite aux dosages enzymatiques de la CAT, GPX, et APX (Servais, 2004).

$$\text{Act.} = \frac{\Delta A \cdot V_1}{\Sigma \Delta t L \cdot V_{e-p}}$$

Act : Activité enzymatique en mol /min / μ g de protéine.

ΔA : différence moyenne de l'absorbance

Σ : Coefficient d'extinction linéique molaire en $M^{-1} \text{ cm}^{-1} \cdot L$.

V_t = Volume total du mélange réactionnel en ml.

V_e = Volume de l'extrait enzymatique en ml.

T = teneur en protéines.

t = temps de culture en min.

Dosage de l'activité Catalase (CAT).

Le dosage spectrophotométrique de l'activité Catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de Boscoloa *et al.* (2003). La décroissance de la DO est enregistrée pendant 3 mn (spectrophotomètre GeneSys 8) pour une longueur d'onde de 240 nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $e = 39400 M^{-1} \text{ cm}^{-1} L$. Pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel contient 100 μ l de l'extrait enzymatique brute, 50 μ l de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3 % et 2,8 ml de tampon NaK (50 mM Na K, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'adition d'eau oxygénée. L'activité Catalase est exprimée en nmol/min/mg de prot.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Dosage de l'activité Guaiacol-Peroxydase (GPX).

L'activité guaiacol – peroxydase (GPX) est déterminée spectrophotométriquement (spectrophotomètre Jenway- 6300) à 470 nm suivant la méthode de Hiner *et al.* (2002). Le coefficient d'extinction linéique molaire est $\Sigma = 2470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel contient : 100 μl d'extrait enzymatique, 50 μl d' H_2O_2 à 0,3 % et 2,850 ml de tampon Na K – guaiacol (50 mM Na K, 8 mM de guaiacol pH 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'ajout du peroxyde d'hydrogène. L'activité GPX est exprimée en nmol/min /mg de prot.

Dosage de l'activité Ascorbate -Peroxydase (APX).

Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate peroxydase est réalisé suivant la méthode Manivannan (2007). Le volume réactionnel final de 3 ml contient : 100 μl d'extrait enzymatique, 50 μl H_2O_2 à 0,3 % et 2850 μl de tampon NaK. Ascorbate (50 mM NaK, 0,5 mM Ascorbate, pH = 7,2) L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture est effectuée à une longueur d'onde de 290 nm (spectrophotomètre GeneSys 8) pendant 1 min et ce pour un coefficient d'extinction linéaire molaire $\Sigma = 2,8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$. L'activité APX est exprimée en nmol /min / mg Prot.

Mesure de l'activité malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation des lipides est estimée par l'évolution de la teneur en malondialdéhyde (MDA) déterminée selon la méthode décrite par Draper et Hadley (1990). L'homogénéisation du tissu végétal dans l'acide trichloroacétique (TCA) 5% à raison de 10 ml pour 1g de tissu végétal est suivie d'une centrifugation pendant 15 min à 1200g. le surnageant est ajouté à un volume égal d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,5% dans le TCA 20%. Le mélange est incubé à 100°C pendant 25min. L'absorbance du surnageant, obtenu après centrifugation à 10000g pendant 5min, est lue à 532 nm. La densité optique est ensuite corrigée par la soustraction de l'absorbance non spécifique à 600 nm. La concentration de MDA est calculée en utilisant son coefficient d'extinction **155mM-1cm-1**

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

$$X = \frac{\Delta DO}{155} \times \frac{V_t}{V_s} \text{ / mg de protéines}$$

X : micromole de substrat hydrolysé par mg de protéines ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines)

ΔDO : différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

155 : coefficient d'extinction molaire du TBA ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V_t : volume total dans la cuve : 1.ml.

V_s : volume du surnageant utilisé dans le dosage : 0,5 ml

mg de proteines : qualité de proteines exprimée en mg.

Mesure de la production du peroxyde d'hydrogène H_2O_2

Les échantillons sont incubés dans 250 μl de solution tampon de phosphate de potassium (20mM, pH :6) contenant 5 μM de scopoletine (sigma) et 1U/ml (concentration finale) peroxydase du raifort (horseradish peroxydase) a 25°C dans l'obscurité en utilisant un agitateur comme décrit par Schopfer *et al.*, (2001). La production de H_2O_2 est évaluée par la diminution de la fluorescence (excitation 346nm, émission 455 nm) du milieu d'incubation et a été transformé en une concentration molaire de H_2O_2 en utilisant une courbe d'étalonnage linéaire. Les résultats correspondent à la moyenne des trois répétitions et sont exprimées en mg de poids frais des tiges et des racines.

Localisation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

La production intercellulaire des ROS est visualisée en utilisant la DCFH-DA (sonde moléculaire) (Oracz *et al.*, 2009) avec un microscope à fluorescence. Les organes sont incubés dans un tampon de 20mM de phosphate de potassium (pH=6) contenant 50 μM DCFH-DA pendant 60 min à 20° dans l'obscurité. Les échantillons sont rincés 3 fois dans la solution tampon. Les images sont prises (excitation : 480 nm , émission : 525 nm) avec un microscope à fluorescence en utilisant un objectif numérique *05. Pour comparer la densité de

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

DCFH-DA, les échantillons des différentes conditions d'expérimentations sont fixés au même moment et analysés sous le microscope à fluorescence en utilisant les mêmes paramètres expérimentaux.

Localisation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$).

Les échantillons sont incubés dans 6 tétrazolium nitrobleu mM (NBT) dans 10 mM de tampon Tris-HCl (pH 7,4) à température ambiante pendant 30 min. Anion superoxyde est visualisée sous forme de dépôts de bleu foncé composés de formazan insolubles (Beyer et Fridovich, 1987).

Résultats

Mesure de l'activité Catalase au niveau des tiges et des racines.

Les figures 60 et 61 représentent les effets du stress hydrique sur l'activité Catalase au niveau des tiges et des racines.

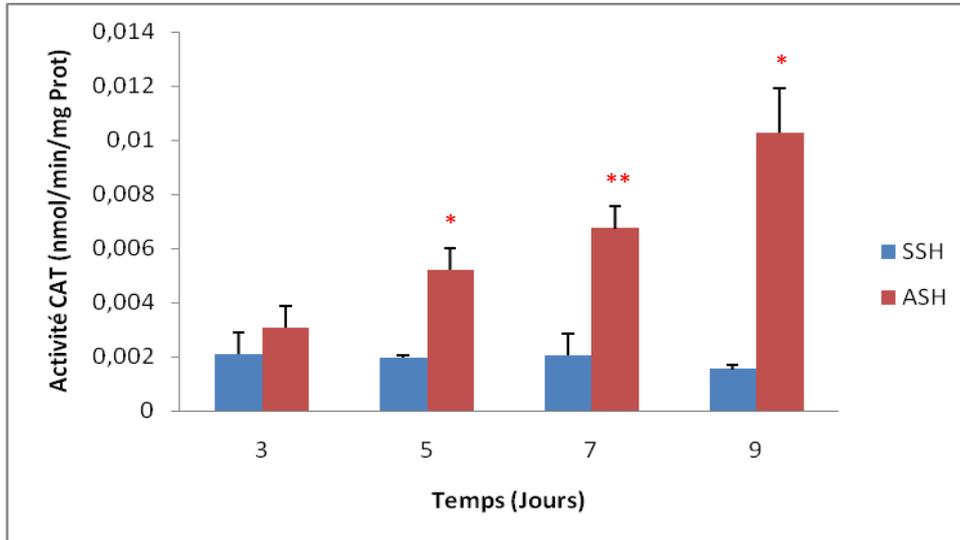


Figure 60. Effet du stress hydrique sur l'activité catalase au niveau des tiges.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

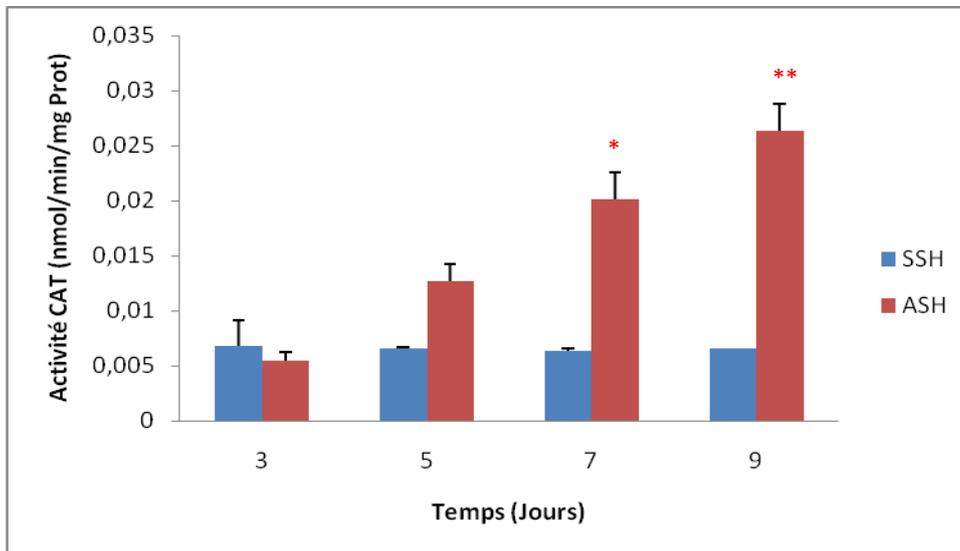


Figure 61. Effet du stress hydrique sur l'activité catalase au niveau des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

L'évolution des activités catalase, chez les tiges soumises à un stress hydrique (figure 60), met en évidence une corrélation positive entre la sévérité du stress hydrique et l'activité enzymatique à partir du 3^{ème} jour. Par contre chez les racines l'augmentation est nette à partir du 5^{ème} jour (figure 61). Elle est plus de 60% chez les deux organes à partir du 7^{ème} jour.

Mesure de l'activité Gaïacol-Peroxydase au niveau des tiges et des racines.

Les figures 62 et 63 représentent les effets du stress hydrique sur l'activité Gaïacol Peroxydase au niveau des tiges et des racines.

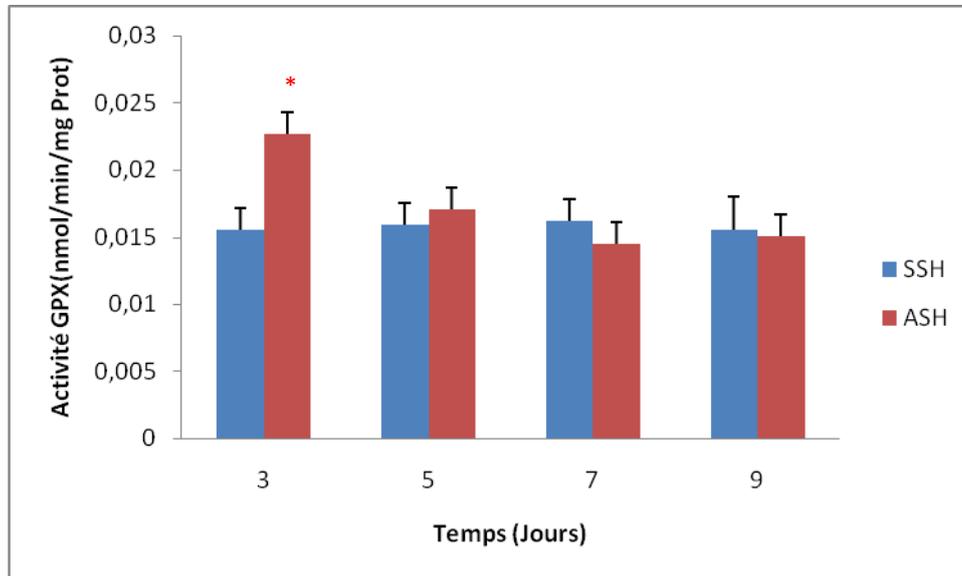


Figure 62. Effet su stress hydrique sur l'activité gaïacol-peroxydase au niveau des tiges.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

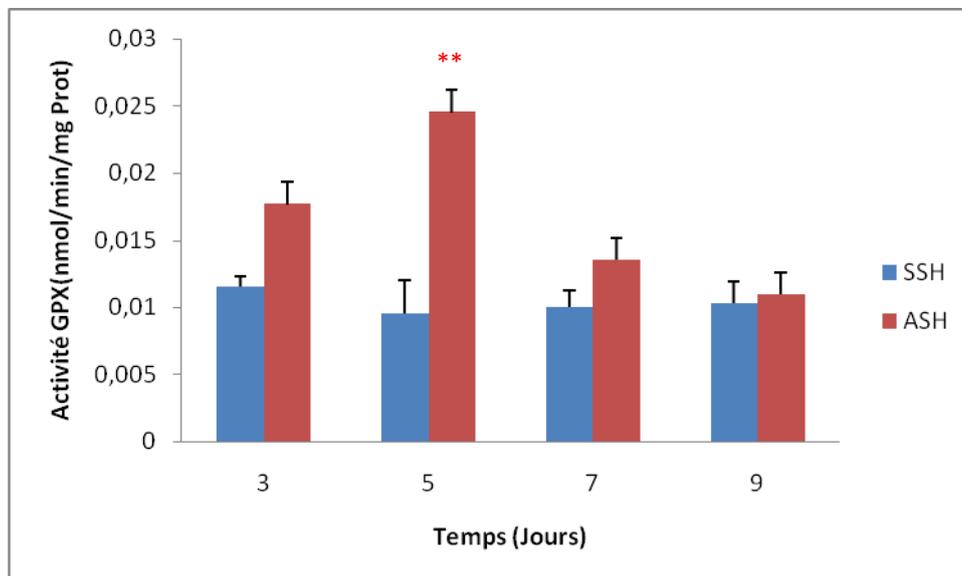


Figure 63. Effet su stress hydrique sur l'activité gaïacol-peroxydase au niveau des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

Les figures 62 et 63 représentent l'évolution des teneurs moyenne en gaïacol-peroxydase extraites à partir des tiges et des racines isolées du blé dur. Les figures ci-dessous révèlent une augmentation considérable chez les stressées par rapport aux témoins

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Mesure de l'activité Ascorbate-Peroxydase au niveau des tiges et des racines.

Les mesures des activités Ascorbate-Peroxydases des tiges et des racines isolées soumises à un stress hydrique sont rapportées dans les figures 64 et 65.

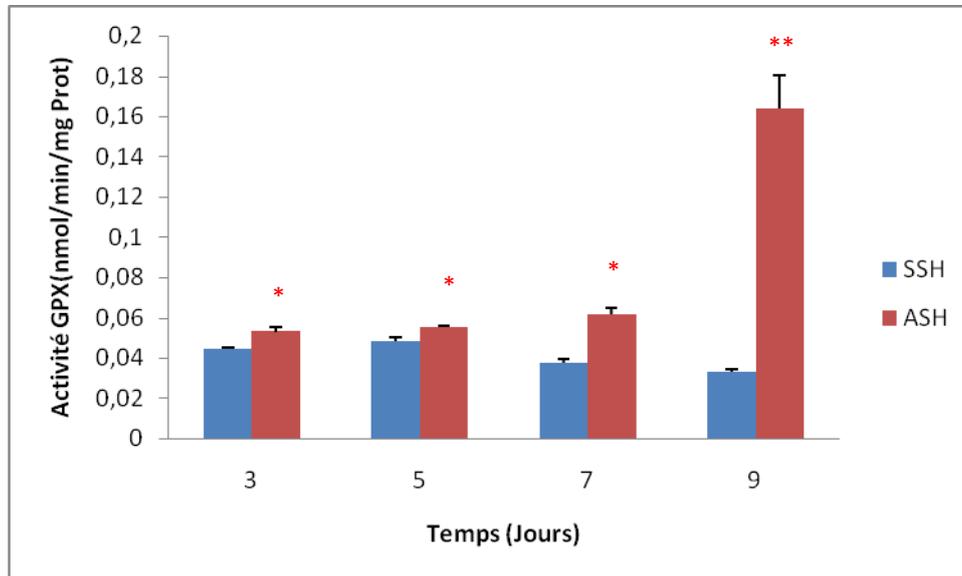


Figure 64. Effet su stress hydrique sur l'activité Ascorbate-Peroxydase au niveau des tiges.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

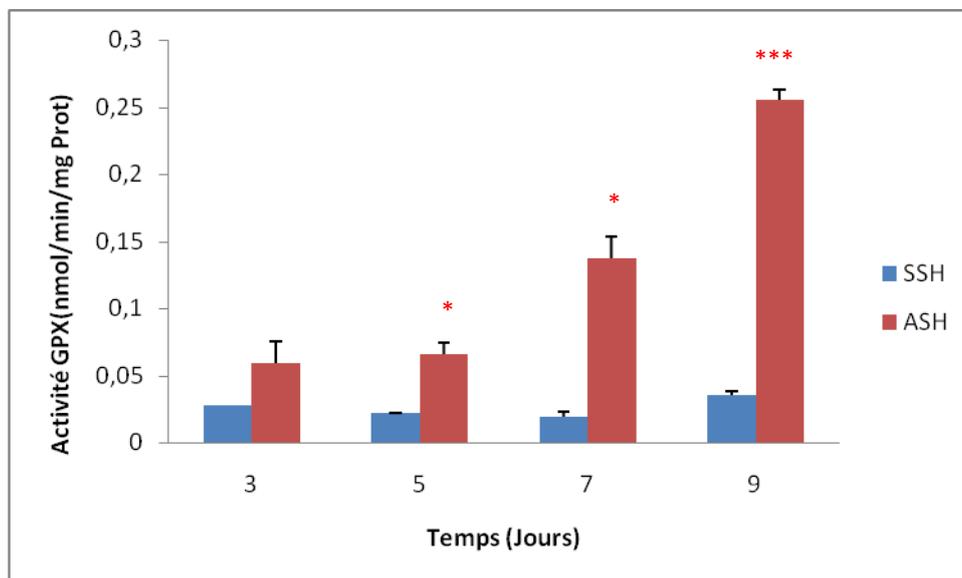


Figure 65. Effet su stress hydrique sur l'activité Ascorbate-Peroxydase au niveau des racines.
SSH : Sans Stress Hydrique ; ASH : Avec Stress Hydrique.

On constate que l'activité APX augmente de façon importante chez les tiges et les racines. Cette augmentation dépasse les 80% le 9ème jour de stress par rapport aux témoins.

Mesure de l'activité malondialdéhyde (MDA) au niveau des tiges et des racines

Les résultats obtenus relativement aux variations de l'activité malondialdéhyde (MDA) des tiges et des racines isolées du blé dur, soumises à un stress hydrique sont représentés sur les figures 66 et 67.

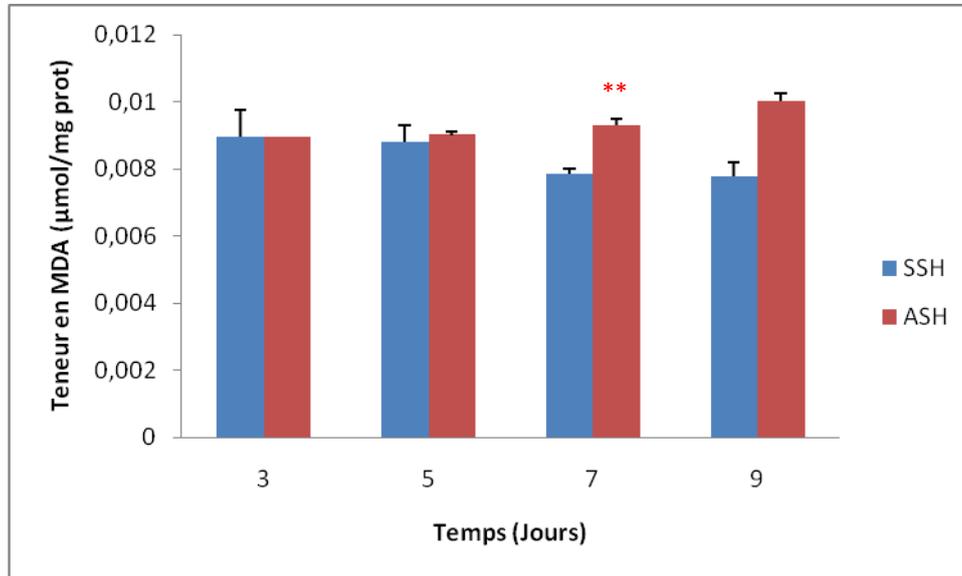


Figure 66. Effet du stress hydrique sur les teneurs en malondialdéhyde (MDA) au niveau des tiges. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

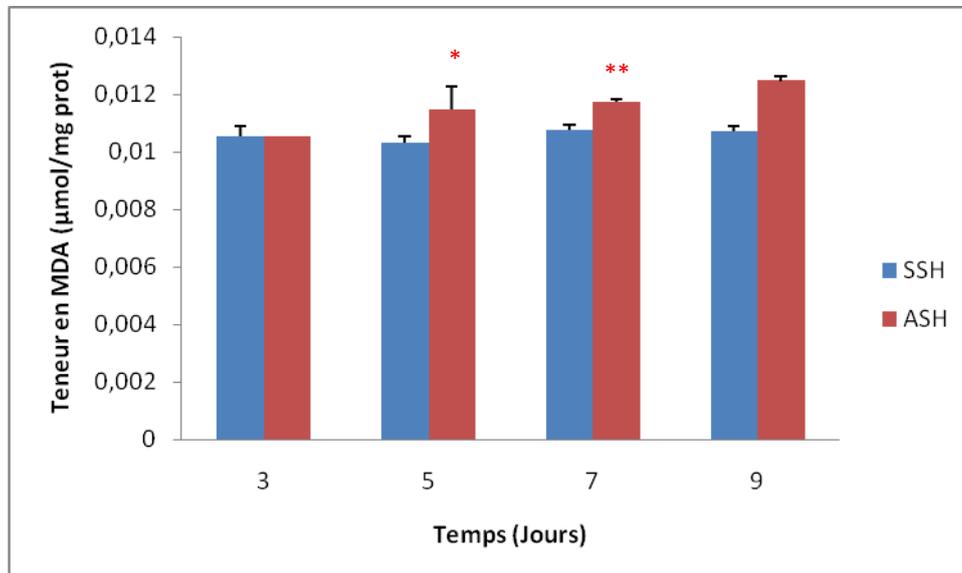


Figure 67. Effet du stress hydrique sur les teneurs en malondialdéhyde (MDA) au niveau des racines. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

On constate que le déficit en eau entraîne une stimulation de l'activité malondialdéhyde à partir du 7^{ème} jour chez les tiges, par contre l'augmentation de l'activité est remarquable à partir du 5^{ème} jour chez les racines.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Mesure du Peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2) produit au niveau des tiges et des racines.

Les résultats obtenus relativement aux teneurs moyennes en H_2O_2 au niveau des tiges et des racines isolées du blé dur, soumises à un stress hydrique sont représentés sur les figures 68 et 69.

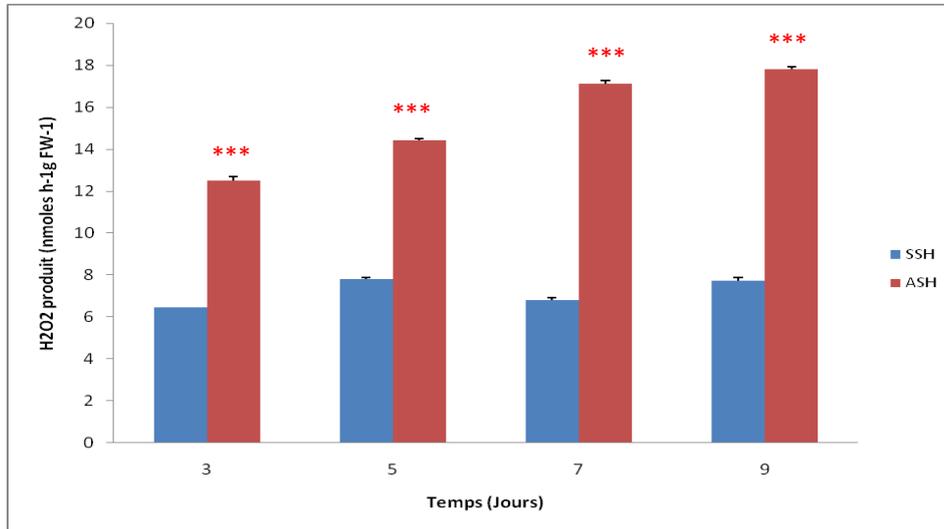


Figure 68. Teneur moyenne en peroxyde d'hydrogène produit au niveau des tiges du blé dur. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

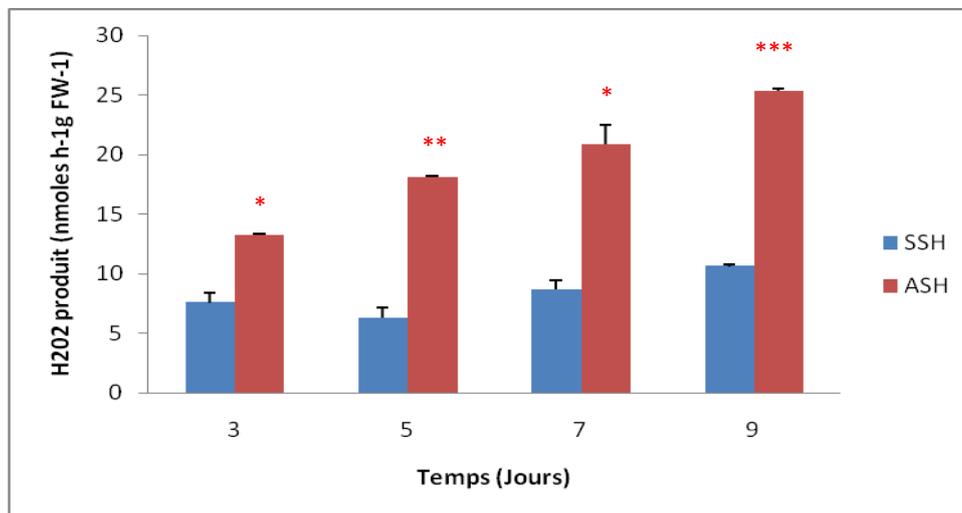


Figure 69. Teneur moyenne en peroxyde d'hydrogène produit au niveau des racines du blé dur. **SSH** : Sans Stress Hydrique ; **ASH** : Avec Stress Hydrique.

L'évolution de la teneur moyenne H_2O_2 au niveau des tiges (figure 68) révèle une production du Peroxyde d'Hydrogène à partir du 3^{ème} jour qui tend à augmenter au fur et à mesure que le niveau de stress s'intensifie. Par contre chez les racines (figure 69) la production du Peroxyde d'Hydrogène est enregistrée à partir du 5^{ème} jour et qui est plus importante que chez les tiges.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Localisation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde au niveau des tiges et des racines.

Les figures 70, 71 et 72 représentent la localisation du peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde au niveau des tiges et des racines.

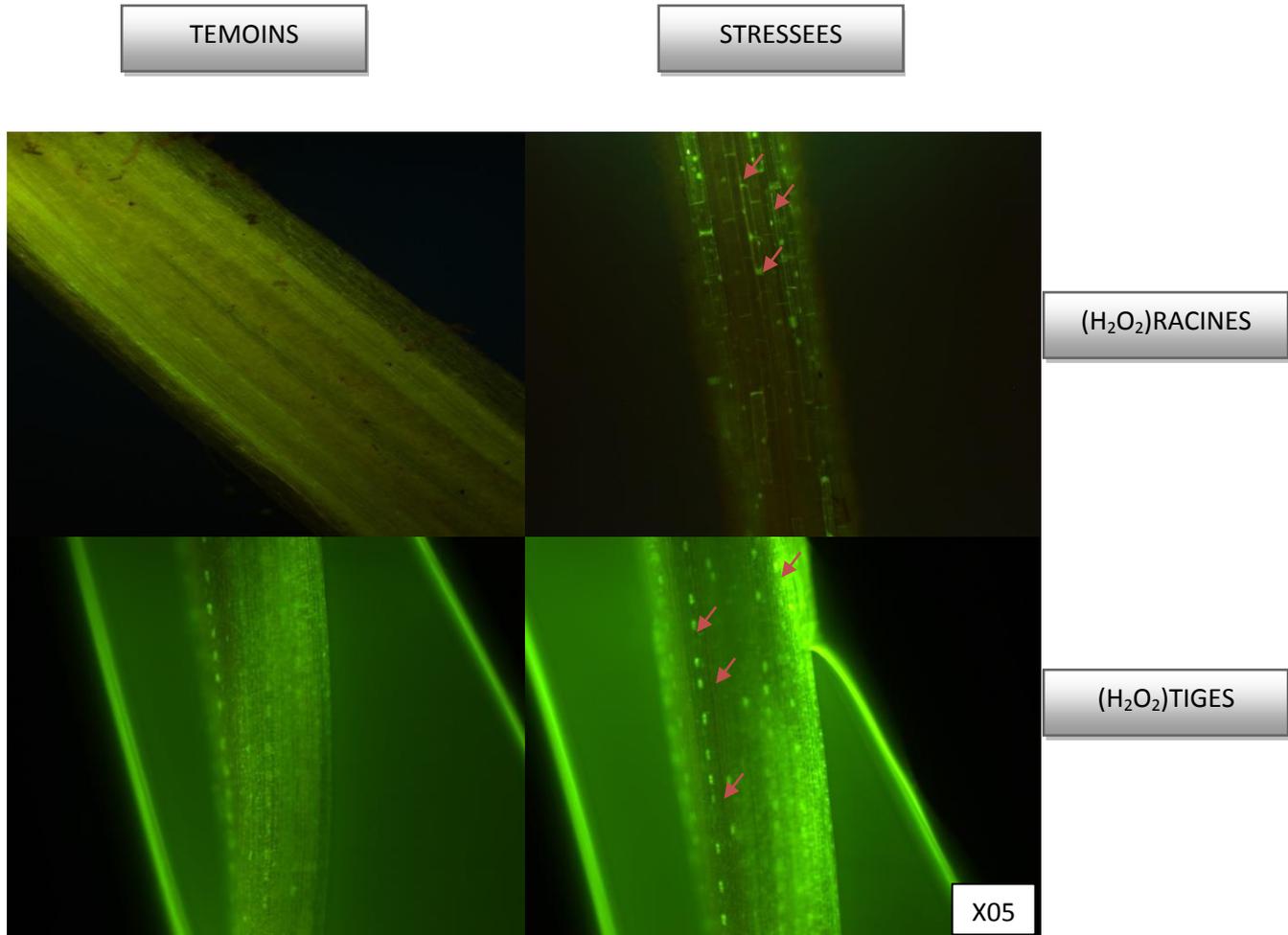


Figure 70. La mise en évidence du peroxyde d'hydrogène au niveau des tiges et des racines.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

La figure 71 illustre la localisation de l'anion superoxyde au niveau des racines (fléchettes bleues).

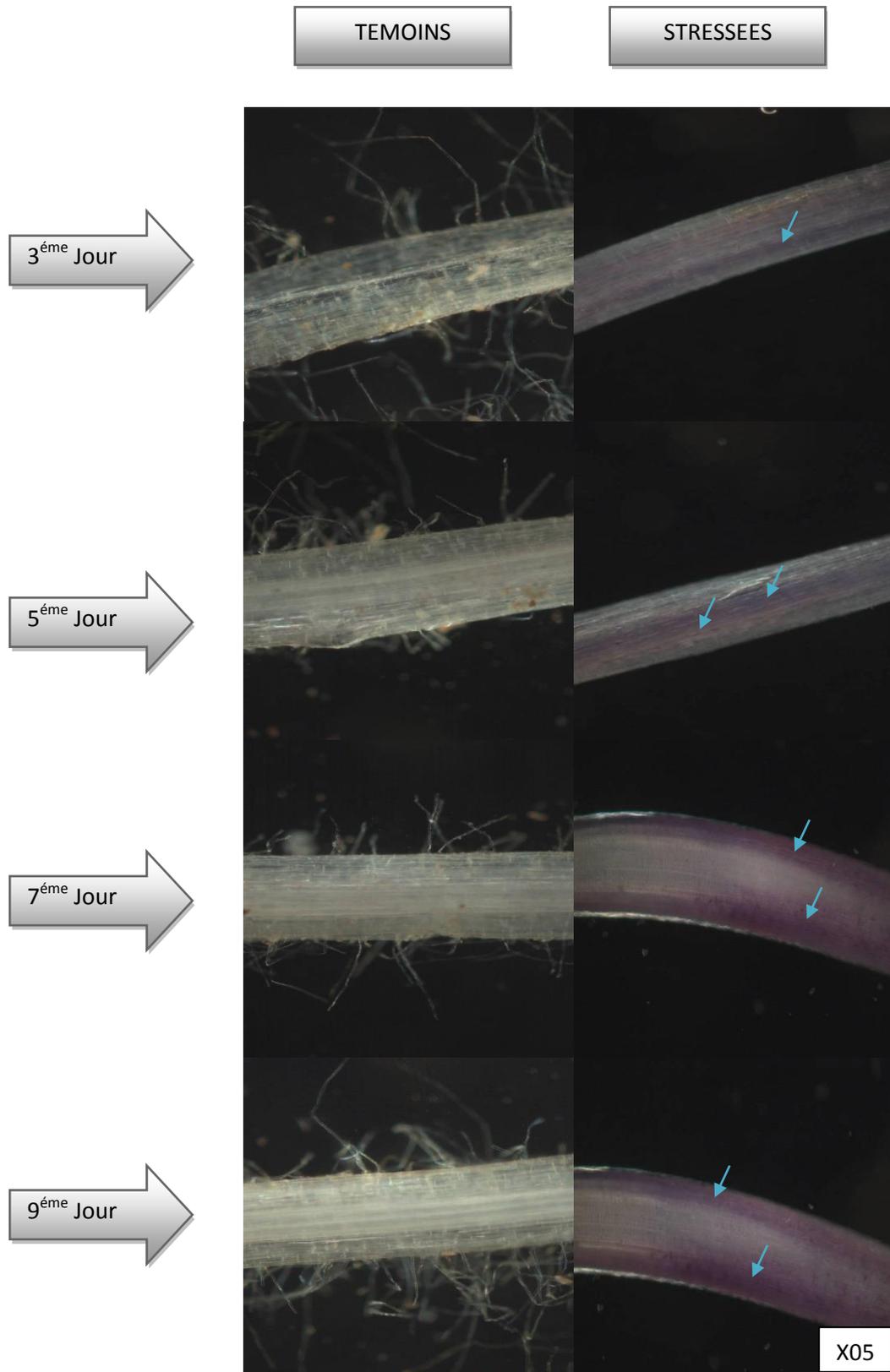


Figure 71. Localisation de l'anion superoxyde au niveau des racines.

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

La figure 72 illustre la localisation de l'anion superoxyde au niveau des tiges (fléchettes bleues).

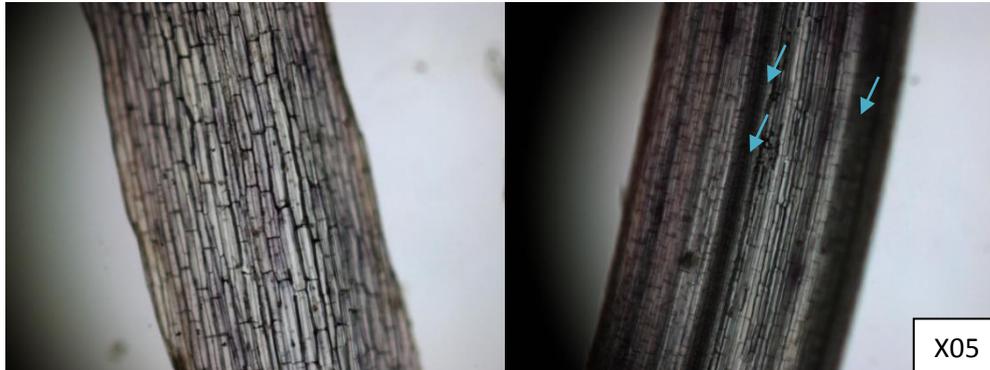


Figure 72. La mise en évidence de l'anion superoxyde au niveau des tiges observé chez les témoins et les stressées.

Les fléchettes rouges : Représentent les granules du peroxyde d'hydrogène.
Les fléchettes bleues (couleur foncée) : représentent l'anion superoxyde.

Les figures 70, 71, 72 confirment la présence de H_2O_2 (fléchettes rouges) au niveau des tiges et des racines des graines soumises au stress, visible sous forme de deux granules fluorescents par cellule (l'observation est peu nombreuses chez les cellules racinaires parce qu'elles sont très vacuolées). Chez les témoins, nous n'avons observé aucune trace de H_2O_2 ni d' O_2 .

Discussion

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence que l'une des conséquences du stress hydrique chez les tiges et les racines de blé dur, est l'apparition d'un stress oxydatif, c'est-à-dire l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Appel et Hirt, 2004), proportionnelle à l'intensité du stress induit.

Le dosage des enzymes intervenant dans la détoxification à savoir la catalase, l'ascrobate – peroxydase et la gaïacol-peroxydase montre que le déficit en eau a tendance à stimuler ces enzymes. La stimulation de l'activité catalase, montre que cette enzyme joue son principal rôle en réduisant la teneur moyenne en H₂O₂ néfaste pour l'intégrité cellulaire (Willekens *et al.*, 1997 ; Blokhina *et al.*, 2003 ; Flexas *et al.*, 2006; Meksem,2007).

Concernant le dosage de l'activité Ascrobate –peroxydase, nous pouvons dire que cette enzyme est spécialisée dans la transformation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau en présence d'un substrat spécifique : l'ascorbate. Shigoeka *et al.* (2002) mettent en évidence une relation étroite entre l'augmentation de l'activité de cette enzyme et l'intensité du stress chez la cellule. Nos résultats, mettent en évidence une augmentation importante de cette enzyme lors du stress induit. Il en est de même pour l'activité gaïacol peroxydase dont l'évolution suit exactement celle de la GPX. Il faut cependant souligner que l'activité enzymatique est plus élevée chez les racines stressées que chez les tiges. Nous pouvons dire que face à cette agression, la cellule synthétise des enzymes antioxydantes capables de piéger les ROS produites.

L'augmentation de la teneur moyenne en MDA au niveau des racines et des tiges confirme que les ROS produites à proximité des Chaines de Transport d'Electrons (CTE) ont généré une peroxydation lipidique, (Zeriri *et al.*, 2012), induisant une diminution accrue de l'efficacité de la CTE et une perte plus importante d'électrons. La résultante est une augmentation de la génération des ROS diminuant d'autant plus l'efficacité de la CTE. Ainsi, lors de stress importants, la génération initiale des ROS peut conduire à un cycle délétère de production de ces espèces toxiques pour l'organisme. (Loeb *et al.*, 2005).

Les mitochondries constituent une source importante des ROS chez les plantes (cellules non chlorophylliennes), (Bailly, 2004). Néanmoins, chez ces dernières, la part de la production des ROS due aux mitochondries, est variable en fonction de l'organe considéré (tiges ou racines) et des conditions du milieu (sécheresse) (Foyer et Noctor, 2003).

Chapitre 04. ROS et Systèmes antioxydants.

Selon, Foyer et Noctor, 2003; Edreva, 2005; Asada, 2006, les chloroplastes constituent les sources principales des ROS chez les cellules chlorophylliennes (cas des tiges). Cependant, les cellules chlorophylliennes au niveau des tiges, du fait de leur production d' O_2 au cours du processus photosynthétique, sont particulièrement exposées à la génération des ROS. Ce processus est à l'origine de la formation directe d' 1O_2 et d' $O_2^{\cdot-}$ et indirecte d' H_2O_2 (par dismutation de l' $O_2^{\cdot-}$). Il y a encore peu de temps, le photosystème I (PSI) était considéré comme la source principale des ROS chloroplastiques. Dans des conditions physiologiques normales, le flux d'électrons du PSI est dirigé vers le NADP qui est réduit en NADPH par la ferrédoxine NADP réductase (FNR). Lors d'un stress, la chaîne d'électrons peut se saturer. Une partie du flux d'électrons peut être alors dérivée par la ferrédoxine vers l'oxygène (Figure 73). En plus de la ferrédoxine, d'autres accepteurs d'électrons du PSI possèdent un potentiel redox suffisamment négatif pour réduire le dioxygène en anion superoxyde (Mehler, 1951; Asada *et al.*, 1974). Egalement, il est apparu que le PSII était également un site de génération d' $O_2^{\cdot-}$ (Cleland et Grace, 1999; Dat *et al.*, 2000). Les quinones A et B du PSII seraient impliquées dans la perte d'électrons conduisant à la réduction de l' O_2 (Figure 73). Certains auteurs ont même suggéré que la production chloroplastique d'anions superoxydes serait majoritairement le fait de cette perte d'électrons du PSII, en particulier au niveau des quinones B (Zhang *et al.*, 2003). La chlorophylle a (Chl a) du PSII possède également la capacité de transmettre directement un électron à l'oxygène, en cas de saturation de la chaîne de transport des électrons (CTE) (Hippeli *et al.*, 1999). Une fois les anions superoxydes sont produits dans le stroma, ils sont rapidement pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD), responsable de leur dismutation en H_2O_2 (Foyer *et al.*, 1994; Edreva, 2005).

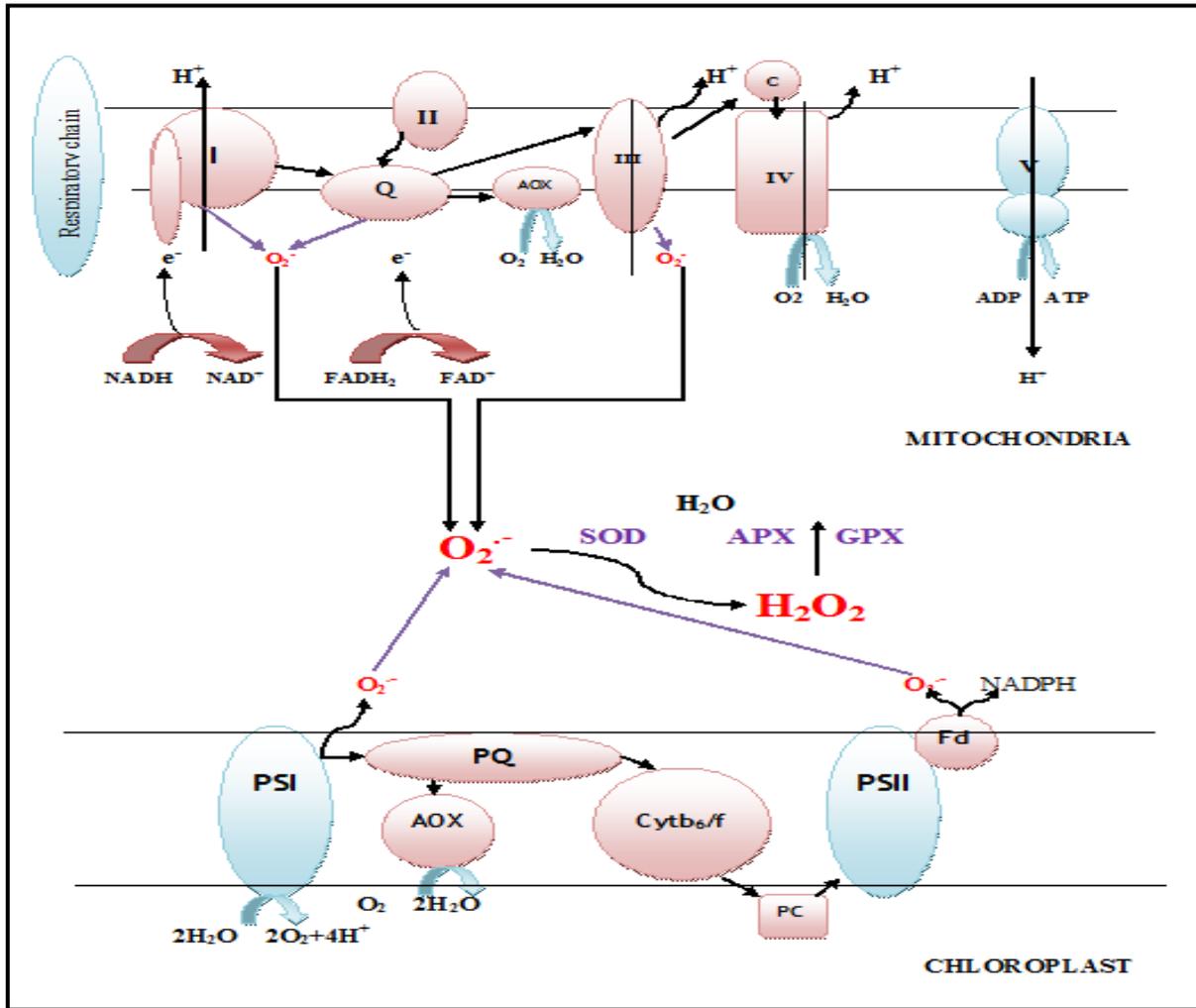
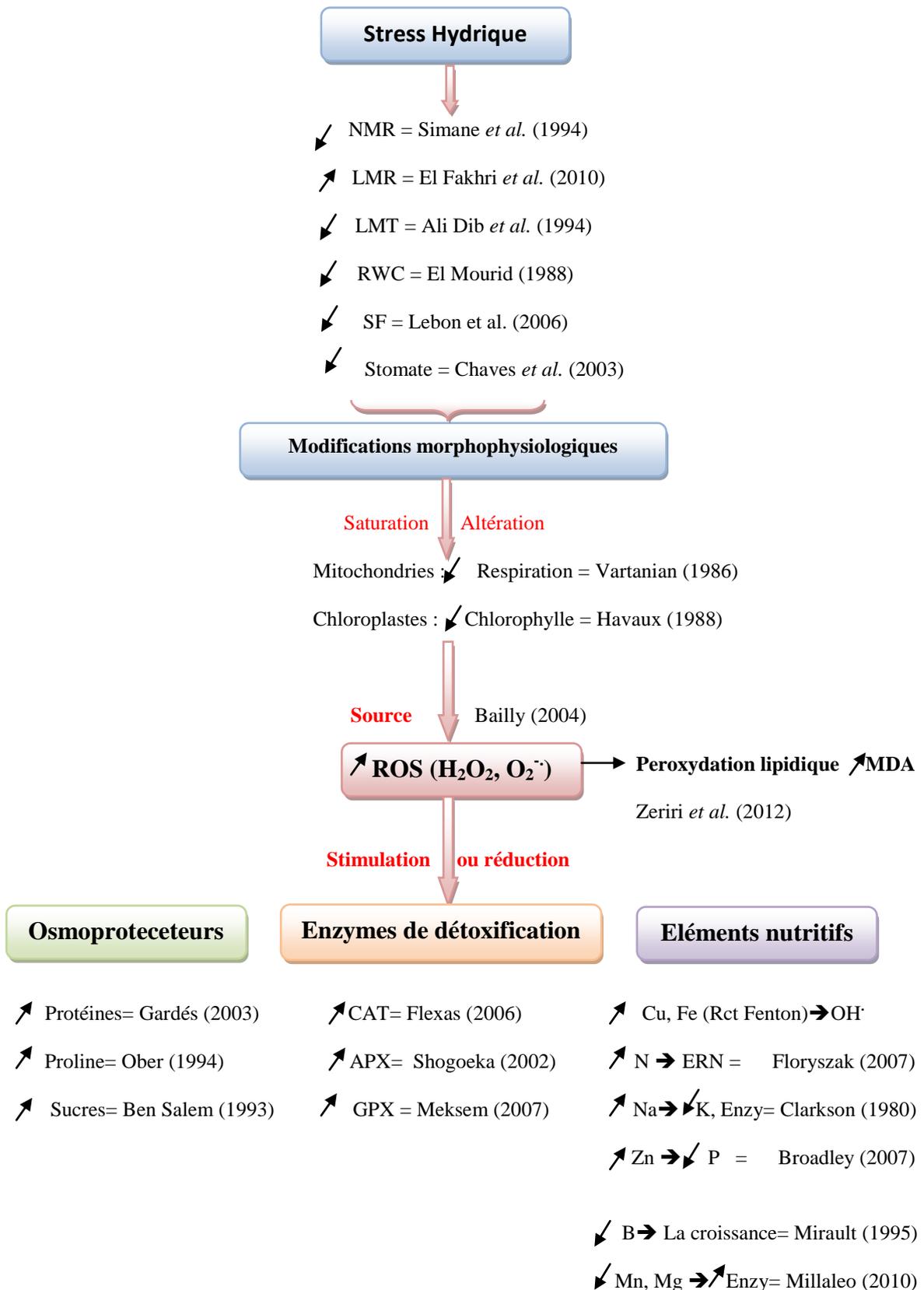


Figure 73. Représentation de la formation de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène au niveau de la mitochondrie et le chloroplaste du blé dur « *Triticum durum Desf* »

Les flèches violettes représentent les « fuites » d'électrons vers l'O₂ permettant de former des anions superoxydes. Complexe I: NADH déshydrogénase, complexe II: succinate déshydrogénase, complexe III: cytochrome bc1, complexe IV: cytochrome c oxydase, complexe V: ATPase, Q: pool d'ubiquinone, AOX: oxydase alternative, c: cytochrome c, Ext1 and Ext2: NAD(P)H déshydrogénases externes, APX : Ascorbate Peroxydase, GPX : Gaiacol Peroxydase, SOD : Superoxyde Dismutase, Cytb₆/f : Cytochrome b₆/f, Fd : ferrédoxine, PC : plastocyanine, PQ :plastoquinone, Q : quinones.

Au niveau des cellules racinaires, la source des ROS est seulement au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

En conclusion des résultats obtenus, il apparaît que :



Références bibliographiques.

A.

Ait Kaki, Y., 1993. Contribution à l'étude des mécanismes morpho physiologiques de tolérance au stress hydrique sur 05 variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.). Mémoire. Magistère. Univ. Annaba. 130 pages.

Ali Dib, T., Monneveux, P., Araus, J., 1992. *Agronomie*. 12. 381-393.

Ali Dib, T., Monneveux, P., Acevedo, E. et Nachit, M.M., 1994. Evaluation of proline analysis and chlorophyll fluorescence quenching measurements as drought tolerance indicators in durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*). *Euphytica*, 79 : 65-73.

Allen, J. P. and Williams, J. C., 1998. Photosynthetic reaction centers. *FEBS Letters*. 438: 5-9.

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A., 2006. Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *Journal of Proteome Research* 5, 196-201.

Anonyme, 2011. *Produit agroalimentaire*. 6.111-116

Anthony, L. M., Mary, S. A., Paul, G. C. and Charles, A., 2002. Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends in Plant Science*. 7 : 478-481.

Antouniuk, S., Vieira, R., Bagatin, A.C., 1999. A Ecoencefalografia Neonatal na Classificação e Seguimento das Hemorragias Peri-Intraventriculares. *Rev Bras Ultra-sonog*, 6(1):17-22.

Apel, K. and Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373-399.

Arasimowicz, M. and Floryszak-Wieczorek, J., 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* 172(5): 876-887.

Arnon, D.I., 1949. Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24. 1-25.

Asada, K., 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology*. 141(2), 391-396.

Asada, K., Kiso, K. and Yoshikawa, K., 1974. Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination. *Journal of Biological Chemistry*. 249(7), 2175-2181.

Astier, J., 2011. Identification et étude du rôle des protéines cibles du monoxyde d'azote (NO) dans les réponses de défense chez le tabac. 237 pages.

B.

Badyal, S.K., Metcalfe, C.L., Basran, J., Efimov, I., Moody, P.C., and Raven, E.L., 2008. Iron oxidation state modulates active site structure in a heme peroxidase. *Biochemistry*, 47(15), 4403-4409.

Bailly, C., 2004; Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *SeedSci. Res.*14, 93-107

Baize D., 1997. Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France), INRA Editions, Paris, 408 pages

Baker, J., Steel, C.H. and Dure, I.L., 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.*, 11: 277-291.

Baker., N. R., 2008. Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008. 59:89–113

Balakrishnan, K., Rajendran, C. and Kulandaivelu, G.,2000. Differential responses of iron, magnesium, and zinc deficiency on pigment composition, nutrient content, and photosynthetic activity in tropical fruit crops. *Photosynthetica*38: 477-479

Baldy, C., 1993a. Progrès récents concernant l'étude du système racinaire du blé (*Triticum*sp). *Ann. Agron. (Paris)*. 241-276.

Baldy, C., 1993b. Effet du climat sur la croissance et le stress hydrique des blés en méditerranée occidentale. In : Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne, diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier. Ed INRA. 83-99.

Barker, A.V. et Pilbeam, D.J.,2007.Handbook of Plant Nutrition. CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, FL. 11-18.

Bartels, D. et Nelson, D., 1994. Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant Cell Environ* 17: 659-667.

Barnetts, N.M. et Naylor, A.W., 1966. Amino acids and protein metabolism in bermuda during water stress. *Plant Physiol.* 41. 1222 -1230.

Bartosz, G.,1997. Oxidative stress in plants. *ActaPhysiologiaePlantarum* 19(1): 47-64.

Bassiri Rad, H., Tremmel, D.C., Virginia R.A., Reynolds, J.F., de Soyza, A.G., Brunell, M.H.,1999.Short-term patterns in water and nitrogen acquisition by two desert shrubs following a simulated summer rain. *Plant Ecology*, 145: 27-36

Bates, L. M. and Hall, A. E.,1981.,Stomatal closure with soil water depletion not associated with changes in Bulk leaf water status. *Oecologia.*50: 52-60.

Beckman, J.S. and Koppenol, W.H., 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, theEkerhovd, E., Brannstrom, M., Weijdegard, B., Norstrom, A., 1999. Localization of

nitric oxide synthase and effects of nitric oxide donors on the human Fallopian tube. *Mol Hum Reprod* 5:1040-1047

Belaid, D., 1996. Aspects de la céréaliculture algérienne. INES. D'Agronomie. Batna. 187 pages.

Bellinger Y., Bensaoud, A. et Larher, F., 1989. Physiology breeding of winter cereals for stress environments Colloque, N°3, Montpellier, France. 126 page.

Bellinger, Y., Bensaoud, A. et Larher, F., 1991. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance.

Berova, M., Ziatev, Z., Stoeva, N., 2002. Effect of paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulg. J. Plant Physiol.* (28): 75-84.

Bernstein, N., Läuchli, A., et Silk, W.K., 1993. Kinematics and dynamics of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) leaf development at various Na/Ca salinities. I. Elongation and growth. *J. Plant Physiol*, 103. 1107-1114.

Ben Abdallah, N. et Ben salem, M., 1993. Paramètres morphophysologiques de sélection pour la résistance à la sécheresse des céréales. INRA. Montpellier. 266 pages.

Bengston, C., Klockare, B., Klockare, R., Larsson, S. and Sundquist, C., 1978. The after effect of water stress on chlorophyll formation during greening and the level of abscisic acid and proline in dark grown wheat seedlings. *Plant Physiol.* 43. 205- 212.

Bensoltane, S., Evaluation de la toxicité du nitrate d'ammonium (NH₄NO₃) sur différents modèles biologiques : Mammifères, Végétaux, et Protistes ciliés. Thèse de doctorat d'état en Ecotoxicologie Animale. Université Badji Mokhtar Annaba. 160 pages.

Berlett, B. S. et Stadtman, E. R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress, *The Journal of biological chemistry* 272, 20313-20316. Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91(2): 179-194.

Bérubé, R., Malenfant, J., Gauvin, D., Biais, M., Gagnon, E., Dumas, R., Racine, M.C., Bourque, J., Bélanger, A., 2000. Quantitation of androgenic and estrogenic steroids in rat and monkey serum using gas chromatography and negative chemical ionization mass spectrometry. Proc 48th ASMS Conférence on Mass Spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA. 605 pages.

Besford, R.T., 1978. Effect of replacing nutrient potassium by sodium in uptake and distribution of sodium in tomato plants. *Plant Soil.* 50: 399-409.

Beyer, W.F. and Fridovich, I., 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 161. 559-566.

Bhandal, I.S. et Malik, C.P., 1988. Potassium estimation, uptake, and its role in the physiology and metabolism of flowering plants. *International Rev. Cytol.* 110: 205-254.

Binet, P., 1989. Métabolisme et adaptation des végétaux supérieurs aux contraintes hydriques, thermiques et salines. *Bull. Ecol.T.20.1* : 41-49.

Bohnert, H.J., Nelson, D.E. et Jensen, R.G., 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.

Bolwell, G.P. and Wojtaszek, P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51(6): 347-366.

Boscoloa, P., Menossib, M. and Renato Jorgea, A., 2003. Aluminium-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*, **62**, 181-189.

Boussard, J.M., Chabane, M., 2011. La problématique des céréales en Algérie Défis, enjeux et perspectives. Communication dans le cadre de la 5^{ème} Journée de recherche en sciences sociales à AgroSup Dijon. 16 pages.

Bouzoubaa, Z., El Mourid, M., Karrou, M., et El Gharous, M., 2001. Manuel d'analyse chimique et biochimique des plantes. INRA. Maroc.

Boyer, J.S., 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.

Bozzini, A., 1988. Origin, distribution, and production of durum wheat in the world. Dans Fabriani, G. et C. Lintas (éd). *Durum: Chemistry and Technology*. AACCC (Minnesota), États-Unis. 1-16

Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V., 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* **91**, 179-194.

Blum, A., 1988. Plant breeding for stress environments. BOCA Reaction, Florida. Ed C.R.C. press inc. 223 pages.

Blum, A., Ebercon, A., 1976. Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Sci.*, 16, 428-431.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principal of protein -dye binding. *Analytical Biochemistry*, (7): 248-254.

Brennan, R.F. et Bolland, M.D.A., 2003. Comparing copper requirements of faba bean, chickpea, and lentil with spring wheat. *J Plant Nutr* 26: 883-899.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., and Lux, A., 2007. Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677-702.

Brodribb, T. J and Holbrook, N. M. ,2003. Stomatal Closure during Leaf Dehydration, Correlation with Other Leaf Physiological Traits. *Plant Physiology* .132: 2166-2173.

Brown, S.C., Gregory, P.J., Wahbi, A., Srivastava, J.P., Porceddu, E., Acevedo, E., Varma, S., 1985. Drought tolerance in winter cereals. Proceedings of the international workshop, Capri, Italy. 27-31.

Brugnoli, E., et Björkman, O., 1992. Growth of cotton under continuous salinity stress : Influence on allocation pattern, stomatal and nonstomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *J. Planta*, 187. 335-347.

Buchanan, B.B., Gruissen, W. and Jones, R.L., 2002. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. *American Soc. of Plant Physiologists*, Rockville, Maryland USA. 1367 pages.

Burnell, J.N., 1988. The biochemistry of manganese in plants. In: R.D. Graham, R.J. Hannam, N.C. Uren, eds. *Manganese in soils and plants*: dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 125-13.

Burnett, W.C., Chanton, J., Christoff, J., Kontar, E., Krupa, S., Lambert, M., 2002. Assessing methodologies for measuring groundwater discharge to the ocean. *EOS* 2002; 83:117-23.

Burrows, P. A., Sazanov, L. A., Svab, Z., Maliga, P. and Nixon, P. J. 1998. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.* **17**. 8699-8706.

Butler, W. L., 1978. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **29**:345-78.

C.

Cakmak, I., et Yazici, M., 2010. Magnésium: Composante oubliée de la production agricole *Physiol. Plant.* 133:692-704.

Calmes, J., Viala, G., Gelf, N., Blanchet, R., 1985. Influence d'un déficit hydrique sur trois variétés de soja : effet sur la protéogénèse des graines. *Agronomie.* 5 .169-76.

Casals, M.L., 1996. Introduction des mécanismes de résistance à la sécheresse dans un modèle dynamique de croissance et de développement du blé dur. Thèse de Doctorat de l'INRA Paris Grignon. 93 pages.

Catello, D.M., Pizzuto, R., Pallota, M.L., Aurelio, S., and Passarella, S., 2005. Mitochondrial transport in proline catabolism in plants : the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Article Planta.* 0932-0935.

Chabi, H., Derouiche, M., Kafi, M. et Khilassi, E., 1992. Estimation du taux d'utilisation du potentiel de production des terres à blé dur dans le Nord de la wilaya de sétif. Thèse. Ing. INA. El Harrach. 317 pages.

Chaillou, S., Lamaze, T., 1997. *Assimilation de l'azote chez les plantes*. Jean-Francois Morot-Gaudry (ed). p. 67–83.

Chaker, A., 2003. Étude de l'effet des stress thermiques (chaleur et froid) sur quelques paramètres physiologiques et biochimiques du blé dur (*Triticum durum* Desf). 78 pages.

Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H., and El Ferjani, E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127, 139-147.

Chapin, F.S., Schulze, E.D., Mooney, H.A.,1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual review of ecology and systematics* 21 : 423-447.

Chapman S.C., Edmeades G.O., 1999. Selection improves drought tolerance in tropical maize populations. II. Direct and correlated changes among secondary traits. *Crop Science*, 39 1315-1324.

Chatterjee J., Chatterjee C., 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper inChaillou, S., Lamaze, T.,1997. Nutrition ammoniacale des plantes. In "*Assimilation del'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire*", J.F. Morot-Gaudry (Ed), Inra editions. 67-83.

Chaves, M.M., Flexas, J. et Pinheiro, C., 2008. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to oeil. *Ann Bot (Lond)* 1-14.

Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Pereira, J. S., 2003. Understanding plant responses todrought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*. 30: 239-264.

Chaves, M.M., Osório, M.L., Osório, J., Pereira, J.S., 2000. Non stomatal limitation of photosynthesis under high temperature and water deficits in *Lupinus albus*. *Photosynthetica*27: 521–528.

Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T. and C. Pinheiro, 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89:907-916.

Cheesman, J.M., 1988. Mechanism of salinity tolerance in plants. *Plant Physiol*. 87: 547-550.

Chikhi, A. C., 1992. Situation de la céréaliculture et perspectives de l'irrigation de complément du blé au niveau de la Mitidja. Thèse Ing. INA. El Harrach. 317 pages.

Clarke, J.M. and McCaig, J.N., 1982. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop. Sci.* 22, 503 pages.

Clarke, J.M., Depauw, R.M., Townley, T.E., Smith, J., 1992. *Crop Science* . 32. 723-728.

Clarke, J.M., Norvell, W.A., Clarke, F.R. et Buckley, T.W., 2002. Concentration of cadmium and other elements in the grain of near-isogenic durum lines. *Can. J. Plant Sci./Revue canadienne de phytotechnie*, 82:27-33.

Clarkson, D.T. et Hanson, J.B., 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol.* 31: 239-298.

Cleland, R.E. and Grace, S.C., 1999. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. *FEBS Letters*. 457(3), 348-352.

Clement, G. et Prats, J., 1970. Les céréales. Collection d'enseignement agricole. 2ème Ed. 351 pages.

Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J., Farquhar, G.D., 2004. Breeding for high water-use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 55, 2447-2460.

Cornic, G., Fresneau, C., 2002. Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. *Annals of Botany*, 89, n°sp., 887-894.

Crawford, N.M. and Guo, F.Q., 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in Plant Science* 10(4): 195-200. bad, and ugly. *Am J Physiol Cell Physiol* 271(5): C1424-1437.

Cruz, J.L., Mosquim, P.R., Pelacani, C.R., Araujo, W.L., DaMatta, F.M., 2004. Effects of nitrate nutrition on nitrogen metabolism in cassava. *Biologia Plantarum* 48 : 67-72.

Cyr, D.R., Bewley, J.D., 1989. Carbon and nitrogen reserves of leafy spurge (*Euphorbia esula*) roots as related to overwintering strategy. *Physiologia Plantarum* 77 : 67-72.

D.

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

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Breusegem, F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life*. 14 pages;

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

Delledonne, M., 2005. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8(4): 390-396.

Djebar, M-R. and Djebar, H., 2002. Bioénergétique. Mitochondries végétales. Synthèse, Publication de l'Université Annaba – Algérie. 23 – 25.

Djekoun, A. Et Ykhlef, N., 1996. Déficit hydrique, effets stomatiques et non stomatiques et activité photosynthétique chez quelques génotypes de blé tetraploides. Dans : 3^{ème} Réunion du réseau SEWANA, de blé dur, IAV Hassan II, 6-7 décembre 1996.

Douce, R., and Neuburger, M., 1989. The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant MOI. Biol.* 40 : 371-414.

Draper, H.H., Hadley, M., 1990. *Meth. Enzymol*, 186, 241-431.

Dreier, W. and Goring, M., 1974. De einfluss hoher salzkonzentrationen auf verschiedene physiologische parameter von maiswurzeln. *Z. der HU. Berlin Nat. Naturwiss R.*, 23: 641- 644.

Drouineau, G. et Mazoyer, R., 1962. Contribution à l'étude de la toxicité du cuivre dans les sols. *Am. Agron.*, 39: 390-392.

Durand, J.L., Sheehy, J.E., Minchin, F., 1987. Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential of soybean plants experiencing water deprivation. *Journal of Experimental Botany*, 38, 311-321.

E.

Edreva, A., 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 106(2-3), 119-133

Ekerhovd, E., Brannstrom, M., Weijdegard, B., Norstrom, A., 1999. Localization of nitric oxide synthase and effects of nitric oxide donors on the human Fallopian tube. *Mol Hum Reprod*, 5:1040–1047

El Fakhri, M., Mahboub, S. et Benchekroun, M., 2010. Effet du stress hydrique sur les caractéristiques d'enracinement du blé dur (*Triticum Durum. Desf*). 6-12.

El Mourid, M., 1988. Performance of wheat and barley cultivars under different soil moisture regimes in semi arid region. Ph.D. dissertation, Iowa State University Ames USA, 229 pages.

Emond, V., MacLaren, L.A., Kimmins, S., Arosh, J.A., Fortier, M.A., Lambert, R.D., 2004. Expression of cyclooxygenase-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the endometrial epithelium of the cow is up-regulated during early pregnancy and in response to intrauterine infusions of interferon-tau. *BiolReprod* 70:54-64

F.

FAO, 2005. Profil nutritionnel de l'Algérie, division de l'alimentation et de la nutrition. 9 pages.

FAO, 2011. Représentation du bulletin sur l'offre et la demande de blé sur le marché mondial. 12 pages.

Farquhar, G. D. et Sharkey. T.D., 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 33 : 317-345.

Farquhar, G.D., O'Leary, M.H., Berry, J.A., 1982. On the relationship between carbon isotope discrimination and the intercellular carbon dioxide concentration in leaves. *Australian Journal of Plant Physiology*, 9, 121-137.

Favier, A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. 108-115.

Feldman, M., 2001. Origin of Cultivated Wheat . Dans Bonjean A.P. et W.J. Angus (éd.) *The World Wheat Book: a history of wheat breeding*. Intercept Limited, Andover, Angleterre. 3-58.

Ferreira, R., Sellés, G., Ruiz, R.S. and Sellés, I.M., 2004. Effect of water stress induced at different growth stages on grapevine cv. Chardonnay on production and wine quality. *Acta Hort.* 664:233- 236.

Fischer, E.S. and Bremer, E., 1993. Influence of magnesium-deficiency on rates of leaf expansion, starch and sucrose accumulation, and net assimilation in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Plant* 89: 271-276.

Finazzi, G., Johnson, G. N., Dall'Osto, L., Zito, F., Bonente, G., Bassi, R. and Wollman, F. A., 2006. Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*. 45. 1490-1498.

Finney, L. A. and O'Halloran, T. V., 2003. Transition metal speciation in the cell: Insights from the chemistry of metal ion receptors. *Science* 300, 931-936.

Flexas, J., Bota, J., Galmés, J., Medrano, H. and Ribas-Carbó, M., 2006. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*. 127, 343-352.

Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G. et Sharkey, T.D., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol (Stuttg)* 6: 269-279.

Flexas, J., Diaz-Espejo, A., Galmes, J., Kaldenhoff, R., Medrano, H. et Ribas-Carbo, M., 2007. Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO2 concentration around leaves. *Plant Cell Environ* 30: 1284-1298.

Flowers, T.J. et Lauchli, A., 1983. Sodium versus potassium: substitution and compartmentation. *Inorg; Plant Nut.* 15: 651-681.

Fonseca, A.E., Westgate, M.E., 2005. Relationship between desiccation and viability of maize pollen. *Field Crops Research*, 94, 114-125.

Foote, C., Valentine, J., Greenberg, A., and Liebman, J., 1985. Active Oxygen in Chemistry. New York, Chapman and Hall. 134 pages.

Foyer, C.H. and Noctor, G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**, 355-366

Foyer, C.H. and Noctor, G., 2005a. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28: 1056-1071.

Foyer, C.H. and Noctor, G., 2005b. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* 17(7): 1866-1875.

Foyer, C.H., Lelandais, M. and Kunert, K.J., 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum.* 92(4), 696-717.

G.

Gardès-Albert, M., Abedinzadeh, Z., Jore, D., 2003. L'actualité chimique.. 269-270.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z. et Jore, D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène. L'actualité chimique. 91-96.

Garwood, E.A., Williams, T.E., 1967. Growth, water use and nutrient uptake from the subsoil by grass swards. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 69: 125-130

Gate, P., 1995. Ecophysiologie du blé : de la plante à la culture. Lavoisier. 429 pages.

Gate, P., Vignier, L., Vadon, B., Souici, D., Minkov, D., Lafarga, A., Zairi, M., 1997. Céréales en milieu méditerranéen. Un modèle pour limiter les risques climatiques. Perspectives agricoles. 217 : 59-70.

George, E.F., 1996. Plant propagation by tissue culture (Parts 1 and 2). Exegetics Ltd., Edington, UK. 561 pages.

Gherroucha, H., Djekoun, A., 1997. Effet de l'application foliaire de IAA et GA₃ et leur interaction sur la croissance du blé (*Triticum durum* Desf. Var Leucomilan, AL) en conditions de salinité. 233 pages.

Gonzalez, D., 2006. Effet du déficit hydrique sur l'état de nutrition azotée chez les graminées fourragères. Thèse de doctorat. Université de Poitiers. 164 pages.

Gorham, J., 1993. Stress tolerance and mechanisms behind tolerance in barley. Agronomical and physiological characterization of different barley genotypes to salt stress. 4-21.

Greenway, H. et Munns, R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *J. Ann. Rev. Plant Physiol.* 31.149–190.

Guan, L. and Scandalios, J. G., 1998. Two structurally similar maize cytosolic superoxide dismutase genes, Sod4 and Sod4A, respond differentially to abscisic acid and high osmoticum. *Plant Physiol* 117, 217-24.

Guilloton, M., et Quintard, B., 2003. Biochimie. Licence 1ère et 2ème année. Prépas. PCEM. Pharmacie. Dunod, Paris. 192 pages.

H.

Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 141(2): 312-322.

Halliwell, B. and Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Brazilian Journal of Pharmacology* 142(2): 231-255.

Hamilton, W. and Heckathorn, S., 2001. Mitochondrial Adaptations to Na Cl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology* Vol. 126m. 1266-1274.

Hansch, R. and Mendel, R. R., 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12, 259-266.

Hanson, A.D. Nelson, C.E. et Everson, E.H., 1977. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars, *Crop. Sci.* 17. 720 - 726.

Harper, J.E., 1994. Nitrogen metabolism. Physiology and determination of crop yield, Boote K.J. (Eds). 285-302.

Havaux, M., 1988. Effects of temperature on the transitions between state 1 and state 2 in intact maize leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, 26 : 245-251.

Heber, D. and Walker, D., 1992. Concerning a Dual Function of Coupled Cyclic Electron Transport in Leaves. *Plant Physiol.* 100:1621-1626.

Hegedüs, A. Erdei, S. and Horvath, G., 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant science*, 160 (6): 1085-1093.

Heller, R., Esnault, R., and Lance, C., 1993, *Physiologie végétale*, 1. Nutrition, Paris. 241 pages.

Heuer, B., and Nadler, A., 1998. Physiological response of potato plants to soil salinity and water deficit. *Plant Science*, Vol. 137, No. 1. 43-51.

Hiler, E.A., Van Bavel, C.H.M., Hossain, M.M., Jordan, W.R.,1972. Sensivity of southern peas to plant water deficit at three growth stages. *Agronomy Journal.*, 64, 60-64.

Hiner, A., Raven, E.L., Thorneley, R.N., Garcia-Canovas, F., and Rodriguez-Lopez, J.N.,2002. Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *J InorgBiochem*, 91(1), 27-34.

Hiner, A., Ruiz, J., Lopez, J.N., Arnao, M.B., Raven, E.I., Canovas, F. G. and Ascota M., 2002. Kinetic study of the Ascorbate-peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem.J.*, **348**,321-328.

Hippeli, S., Heiser, I. and Elstner, E.F.,1999. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry.* 37(3), 167-178.

Holden, M., 1975. chlorophylls in chemistry and biochemistry of plant pigment. 2nd edition, TW. Goodwin. Edition Academic Press New York. 133pages.

Hopkins, W., 1999. Introduction to Plant Physiology. John Wiley and Sons Inc., New York, USA, 464 pages.

Huang, H. C. A. and Cavalieri, A. J.,1979. Proline metabolism during water stress in mulberry. *American Fern Journal* 74. (2) 37-39.

Hubac, S., Viera, D., 1980. Action de la proline exogène sur l'activité de la voie du glycolate chez *Nicotiana tabacum* cv. Xanthin.c. *PhysiologiaPlantarum.* (3) 50:255.

I.

Ingestad, T.,1979. Nitrogen stress in birch seedlings. *PhysiologiaPlantarum*45 : 149-157.

Inze, D. and Montagu, M.V., 2001. Oxidative Stress in Plants, CRC. 156-167.

Inze D., van Montagu M., 1995. Oxidative stress in plants. *CurrOpin Biotechnology* 6:153-158.

J.

Jablonka-Shariff, A., Oison, L.M., 2000. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes *in vitro*. *MolReprodDev* 55:412-421

Jackson, C., Dench, J., Moore, A.L., Halliwell, B., Foyer, C.H., Hall, D.O., 1978. Sub cellular location and identification of superoxidedismutase in the leaves of higher plants. *European Journal of biochemistry*, 91: 339-344.

James J.J., Richard J.H., 2005. Plant N capture from pulses: effects of pulse size, growth rate, and other soil resources. *Oecologia*, 145: 113-122.

Jeejeebhoy, K. N.,2007. Human Zinc Deficiency. *Nutrition in Clinical Practice* 22, 65-67.

Jewell, A.W., Alloway, B..J. et Murray, B.G., 1985. The Effects of cooper deficiency on Pollen formation and **Yield in Cereals** J. Sci. Food Agric.36: 537-538.

Johnson, R.C., Nguyen, H.T. et Croy, L. I., 1984. Osmotic adjustment and solute accumulation in two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Sci., 24 : 957-962.

Jones, H.G. et Jones, M.B., 1989. Introduction : Some terminology and common mechanisms . In Plants Under Stress. Cambridge UK. Cambridge University Press. 1-10.

K.

Kaminaka, H., Morita, S., Tokumoto, M., Masumura, T., Tanaka, K.,1999. Differential gene expressions of rice superoxide dismutase isoforms to oxidative and environmental stresses. *Free Radical Research*, 31 Suppl, 19-25

Kang, J., Chapdelaine, P., Parent, J., Madore, E., Laberge, P.Y., Fortier, M.A., 2005. Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. J Clin EndocrinolMetab 90:2308-2313

Katyal, J.C. et Randhawa, N.S., 1986. Les oligoelements. Bulletin FAO: engrais et nutrition végétale.13 pages.

Kauss, H., 1977. Biochemistry of osmotic regulation. In: Plant Biochemistry II: International Review of Biochemistry, University Press 13:119–140.

kautsky, H. and Hirsch, A., 1931. Chlorophyllfluoreszenz und Kohlensäureassimilation. Naturwissenschaften, 19, 964.

Kawagashira, N., Ohtomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Kawai, J., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Kikuchi, S., and Higo, K., 2001. Multiple zinc finger motifs with comparison of plant and insects. *Genome Informatics* 12, 368-369.

Kaye, J.P., Hart, S.C.,1997. Competition for nitrogen between plants and soilmicroorganisms.*Trends in ecology and evolution*12 : 139-143.

Kellou, R., 2008. Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréaliers français. 198 pages.

Kim, J.Y., Mahe, A., Brangeon, J., Prioul, J.L.,2000. A maizevacuolar invertase, IVR2, isinduced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology*, 124, 71-84

Kleiman I.D., Cogliatti D.H., 1998. Chromium removal from aqueous solutions by different plant species, *Environmental Technology* 19, 1127-1132.

Kumar, P.K. and Singh, R.A., 1991. Germination and metabolism in susceptible and tolerant mung bean genotypes under moisture stress. *Indian J. Plant Physiol.*, 34: 267 pages.

L.

- Ladigues, P.Y.**, 1975. Some aspect of tissue water relation in three populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. New York. *Phytol.* 75, 53-62.
- Lambers, H.**, 1982. Cyanide-resistant respiration: A non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiologia Plantarum.* 55: 478-485.
- Larsson, C.M., Ingemarsson, B.**, 1989. Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In "*Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation*", Oxford University Press. 3-14.
- Lapointe, J., Bilodeau, J.F.**, 2003. Antioxidant défenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *BiolReprod* 68:1157-1164.
- Lapointe, J., Kimmins, S., Maclaren, L.A., Bilodeau, J.F.**, 2005. Estrogen selectively up-regulates the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in the oviducts. *Endocrinology* 146:2583-2592.
- Lawlor, D.W.**, 2002. Limitation to photosynthesis in Water-stressed Leaves: Stomata vs. Metabolism and the role of the ATP. *Annals of Botany.* 89: 871-885.
- Lawlor, D.W. et Cornic, G.**, 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25: 275-294.
- Lebon, E., Pellegrino, A., Louarn, G. and Lecoeur, J.**, 2006. Branch development controls leaf area dynamics in grapevine (*Vitisvinifera*) growing in drying soil. *Annals of Botany* 98:175-185.
- Lemaire, G., Denoix, A.**, 1987. Croissance estivale en matière sèche de peuplements de fétuque élevée (*Festucaarundinacea* Schreb.) et de dactyle (*Dactylis glomerata* L.) dans l'Ouest de la France. II. Interaction entre les niveaux d'alimentation hydrique et de nutrition azotée. *Agronomie*, 7(6) : 381-389
- Lemaire, G., Durand, J.L., Lila, M.**, 1989. Effet de la sécheresse sur la valeur énergétique et azotée de la luzerne. *Agronomie*, 9(9), 841-848.
- Levitt, J.**, 1980. Response of plant to environmental stresses. Vol II, water radiation, salt and others stresses, New York: Academic Press, 1980, 365-406.
- Loeb, S., Bridges, M., Bassok, D., Fuller, B., & Rumberger, R.**, 2005. How much is too much? The influence of preschool centers on children's development nationwide. Retrieved on May 30, 2006
- Loeb, L.A., Wallace, D.C. and Martin G.M.**, 2000. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102, 18769-18770.

Loggni,B.,Scartazza, A.,Brugnoli, E. and Navari-Izzo, F., 1999. Antioxydativedefence system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant physiology*, 119, 1091-1099.

Loué, A.,1986. Les oligo-éléments en agriculture. Agi-Nathan International.824-827.

Lu, Y.K, Chen, Y.,R and Yang C.M ,1995. Influence of Fe-deficiency and Mg-deficiency on the thylakoid membranes of a chlorophyll-deficient Ch5 mutant of *Arabidopsis thaliana*. *BotBull Acad Sin* 36: 175-179.

Lund, A. A., Blum, P. H., Bhattramakki, D. and Elthon, T.E.,1998. Heat-Stress response of maize mitochondrial. *Plant Physiol.* 116 : 1097-1110.

Lyunch,J., Van Beem, J. , 1993. *Agronomy Journal* 33. 1253-1257.

M.

McBride, M.B. et Blasiak, J.J. 1979. Zinc and cooper solubility as a function of pH in an acid Soil *Sci. Soc. Am. Proc.* 43: 866-870.

Mahajan, S., et Tuteja, N., 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overVlew. *Arch BiochemBiophys*444: 139-158.

Manivannan, P., Abdullaleel, C., Kishocekumar,A., Saukar, B., Somasundaram, R., Sridharam, R. and Panneersel, R.,2007. Changes in antioxidant metabolism of vignaunguiculata (L.). walp by propiconazole under water deficit stress. *Colloides and surfaces B.Bio interfaces* **57**, 69-74.

Marschner, H., 1971. Why can sodium replace potassium in plants? Proceedings of the 8th Colloquium of the International Potash Institute, Uppsala, Sweden. Int. Potash Institute: Berne. 401 pages.

Marschner, H., 1993. *Mineral nutrition of higher plants*. London, Academic Press Ltd., Harcourt Brace. 341-362.

Medrano, H., Escalona, J. M., Bota, J., Gulias, J. and Flexas, J., 2002. Regulation of Photosynthesis of C3 Plants in Response to Progressive Drought: Stomatal Conductance as a Reference Parameter. *Annals of Botany.* 89: 895-905.

Medrano, H., Parry, M.A., Socias, X., Lawlor, D.W., 2000. Long term water stress inactivates Rubisco in subterranean clover. *Annals of Applied Biology*131: 491–501.

Mehler, A.,1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents.*Archives of Biochemistry.* 33(1), 65-77.

Mei B., Puryear J.D., Newton R.J., 2002. Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species, *Plant and Soil* 247, 223-231.

Mekhlouf, A., Bouzerzour, H., Dehbi, F., Hannachin A., 2001. Rythme de développement et variabilité de réponses du blé dur (*Triticum durum* Desf.) aux basses températures. Tentatives de sélection pour la tolérance au gel. In Proceeding Séminaire sur la valorisation des milieux semi-arides. OEB. 167 pages.

Meksem, L., 2007 ; Etude des effets de deux fongicides: Le Flammenco SC et le Tilt 250 EC sur la physiologie, la croissance et le métabolisme énergétique des racines isolées de *Triticum durum* DESF. 162 pages

Mengel, K. et Kirkby, E.A., 1982. Principles of plant Nutrition, 3rd edn. Worblaufen-Bern, Switzerland: International Potash Institute. 425-426.

Merizek, S., 1992. Evolution de la biomasse et des composantes du rendement d'une culture de blé conduite en sec et en irrigué. Thèse Ing. INA El Harrach. 102.

Millaleo, R., Reyes, D.M. , Ivanov, A.G. , Mora, M.L. , Iberdi, M.A, 2010. Manganese as essential and toxic element for plants transport, accumulation and resistance mechanisms. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 10(4): 470-481.

Mirault, J., Regad, J., 1994. Le Dessèchement des pousses de Cèdre en Ardèche. In : La santé des forêts(France) en 1994. Paris : Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et de l'Alimentation – DERF/DSF. 34-35.

Mittler, R.,2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci,7(9), 405-410.

Mittler. R., Vanderauwera,S., Gollery, M. and Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. Trends in Plant Science 9(10): 490-498.

Moller, M., Rasmusson, A. G., 1998. The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends in Plant Science.* 3: 21-27.

Moller, I. M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 52, 561-591.

Monneveux, P., et Belhassen, E., 1997. The diversity of drought adaptation in the wide. *Plant Growth Regulation* 20: 85-92

Monneveux, P., et Nemmar, M., 1986. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre et chez le blé dur : Etude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie* 6 : 583-590.

Morris, C.J., Thompson, J.F. et Jonson, C.M., 1969. Metabolism of glutamic and N-acetoglutamic acid in leaf discs and cell free extracts of higher plants. *Plant Physiol.* 44. 1023-1026.

Mukhopadhyay, M.J., Sharma, A., 1991. Manganese in cell metabolism of higher plants. *Botanical Review,* 57: 117-149.

Muller, J.,1960. Echange des ions cuivriques sur les colloïdes minéraux. *Am. agron.* 75-91.

Muller, P., Li, X.P., and Niyogi, K. K., 2001. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology*. **125** : 1558-1566.

Mullineaux, L.S., Mills, S.W., Goldman, E., 1998. Recruitment variation during a pilot colonization study of hydrothermal vents (9° 50'N, East Pacific Rise). *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 45:441–464

Munné-Bosch, S. and Alegre, L.,2000. The significance of beta-carotene, alpha-tocopherol and the xanthophyllcycle in droughted *Melissa officinalis* plants.*Aust J Plant Physiol*27: 139-146.

N.

Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J.P., and Rouhier, N., 2006. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol*, 142(4), 1364-1379.

Nelson, G., Rosegrant, W, Koo, J., Robertson, R., Sulser, T., Zhu, T., Ringler, C., Msangi, S., Palazzo, A., Batka, M., Magalhaes, M., Valmonte-Santos, R., Ewing, M., 2009. Changement climatique, Impact sur l'agriculture et coûts de l'adaptation, Institut international de recherche sur les politiques alimentaires IFPRI, Washington. 423 pages.

Noctor, G. and Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology*. 49, 249-279.

Noctor, G., and Foyer, C.H., 2000. Homeostasis of adenylate status during photosynthesis in a fluctuating environment. *J Exp Bot*, 51 Spec No, 347-356.

O.

Ober, E.S., Sharp, R.E., 1994. Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. I. Requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiol*105: 981-987.

Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, L., Bogatek, R., Corbineau, F. and Bailly, C.,2009. The mechanism involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol*.**150**, 494-505.

Osonubi, O., Oren, R., Werk, K.S. et Schulze, E.D. , 1988. Performance of two *Piceaabies* (L) karst. Stands of different stages of declin. Xylem sap concentrations of magnesium, calcium, potasium and nitrgen. *J. Oecologia*. 77 .1-6.

Ourry, A., Gordon, A.J., Macduff, J.H., 1997. Nitrogen uptake and assimilation in roots and roots nodules. In "*A molecular approach to primary metabolism in higher plants*", *FoyerC.H., Quick W.P. (Eds), London, Taylor & Francis.* 237-253

P.

Padilla, M. , S. Ahmed, Z., H. Wassef, H., 2005. En Méditerranée : sécurité alimentaire quantitative mais insécurité qualitative ? Notes d'analyse du CIHEAM, n°4. 433-451.

Parent, C., Capelli, N., Dat, J., 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. C. R. Biologies 331 pages.

Parry, M.A.J., Flexas ,J. and H. Medrano, 2005. Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. *Annals of Applied Biology* 147:211-226.

Paul, M.H., Planchton, C., Ecochard, R., 1979. Etude des relations entre le développement foliaire, le cycle de développement et la productivité chez le soja. *Ann. amélio. Plants*, 29, 479-492.

Penuelas, J., Save, R., Marfa, O., and Serrano, L., 1992. Remotely measured canopy temperature of greenhouse strawberries as indicator of water status and yield under mild and very mild water stress conditions. *Agricultural and Forest Meteorology*, Vol. 58, No. 1-2. 63-77.

Perez Martinez, S., Farina, M., Ogando, D., Ribeiro, M.L., Gimeno, M., Franchi, A.M., 2000. Nitric oxide inhibits prostanoïd synthesis in the rat oviduct. Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids 62:239-242. *Phytologist*173, 677-702.

Pichard, A., Bisson, M., Diderich, R., Houeix, N., Hulot, C., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Leveque S., Magaud H., Morin A., Rose M., Pepin G., 2005a. Chrome et ses dérivés, INERIS - Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. 175 pages.

Pitzschke, A., Forzani,C. and Hirt,H., 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidant Redox Signal* 8(9-10): 1757-1764.

Potters, G., De Gara,L., Asard,H. and Horemans,N., 2002. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* 40(6-8): 537-548.

Price, A. and Hendry, G., 1997. The signification of the tocopherols in stress survival in plant. In: Evans CR (ed) *Free Radicals, Oxidant Stress and Drug Action*. Richelieu Press,London. 443-450. dans le cadre du pôle de compétitivité Quali-Méditerranée. Ciheam. 93 pages.

R.

Radin, J.W., Ackerson, R.C., 1981. Water Relations of Cotton Plants under Nitrogen Deficiency III. Stomatal conductance, photosynthesis, and abscissic acid accumulation during drought. *Plant Physiol.* 67:115-119.

Raghavendra, A.S. and Padmasree, K., 2003. Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation. *Trends Plant Sci.* 8, 546–553.

Rahimi, A. et Bussler, W., 1973. Physiological hypotheses in the formation of copper deficiency. *ZPflanzenernahr. Bodenk.* 136: 25-32.

Rai, V.K., Singh, G., Thakur, P.S. and Banyal, S.,1983. Protein and amino-acid relationship during water stress in relation to drought resistance. *Plant Physiol. Biochem.*, (Suppl.), 10: 161.

Rascio, A., 1988. Several mechanisms of water stress adaptation in durum wheat *Gen. Agraria.* 42, 90 pages.

Rasmusson, A. G., Soole, K. L. and Elthon, T. E., 2004. Alternatives NAD(P)H Dehydrogenases of Plant Mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 23-39.

Raven , E.L., Lad, L., Sharp, K.H., Mewies, M., and Moody, P.C., 2004. Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase. *BiochemSocSymp*(71), 27-38.

Reddy, P.S. and Veeranjanyulu, K., 1991. Proline metabolism in senescing leaves of horsgram (*Macrotylomauniflorum*Lam.). *J. Plant. Physiol.*137. 381-383.

Rehder, H., Schafer, A., 1978. Nutrient turnover studies in alpine ecosystems. IV. Communities of the Central Alps and comparative survey. *Oecologia*34 : 309-327.

Ridolfi, M., Fauveau, M. L., Label, P., Garrec, J. P. and Dreyer, E., 1996. Response to water stress in an ABA unresponsive hybrid poplar (*Populuskoreana* X *trichocarpa* cv. Peace). I Stomatalfunction. *New Phytologist.* 134: 445-454.

Richard-Molard,1999. Caractérisation physiologique, génétique et moléculaire de la mise en réserve de l'azote (VSP) chez *Cichoriumintybus*(endive). Conséquences sur la qualité morphologique et sanitaire du chicon. *Thèse de l'ENSA Rennes* : 171 pages.

Robelin, M.,1963. Contribution à l'étude du comportement du maïs-grain vis-à-vis de la sécheresse. Journées internationales de l'irrigation, AGPM Ed, 69-76.

Rosselli, M., Dubey, R.K., Rosselli, M.A., Macas, E., Fink, D., Lauper, U., Keller, P.J., Imthurn, B., 1996. Identification of nitric oxide synthase in human and bovine oviduct. *Mol Hum Reprod* 2:607-612.

Rufty, T.W., MacKown, C.T., Volk, R.J.,1990. Alterations in nitrogen assimilation and partitioning in nitrogen stressed plants. *PhysiologiaPlantarum*79 : 85-95.

S.

Sadras, V.O., 2005. A quantitative top-down view of interactions between stresses: theory and analysis of nitrogen-water co-limitation in Mediterranean agro-ecosystems. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 1151-1157.

Saiki, M.K., Jennings, M.R. et Brumbaugh, W.G., 1993. Boron, molybdenum, and selenium in aquatic food chains from the lower San Joaquin River and its tributaries, California. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 24: 307-319.

Salsac, L., S. Chaillou, J.F. Morot-Gaudry, C. Lesaint, and Jolivet, E., 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25:805–812

Saur, E., 1990. Carences et toxicités chez les conifères. *Annales des Sciences forestières*, vol. 47. 367-389.

Sauter, A., Davies, W. J. and Hartung, W., 2001. The long-distance abscissic acid signal in the droughted plant: The fate of the hormone on its way from root to shoot. *Journal of Experimental Botany.* 52: 1991-1997.

Sbartai,H., Djebar, M.R., Sbartai, I. et Berrabah, H., 2012. Bioaccumulation du Cd et du Zn chez les plants de tomates (*Lycopersicon esculentum* L.) Bioaccumulation of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Biologie et pathologie végétales.* 585-593

Schiels, R. and Burnett, W., 1960. Determination of protein bound carbohydrate in serum by a modified anthrone method *Anal. Chem.* 32: 885-886.

Schopfer, P., Plachy, C. and Frahry, G., 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellins, and abscissic acid. *Plant Physiol.* 125, 1591-1602.

Schuler, C.A., 1987. Impacts of agricultural drainwater and contaminants on wetlands at Kesterson Reservoir, California. MS Thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, 136 pages.

Schutzendubel, A. and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1351-1365.

Servais, P., 2004. Biofilm in the parisian suburbs drinking water distribution system. *Aqua - Journal of Water Supply Research and Technology.* 53 : 313-324

Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H., Avudainayagam S., 2005. Chromium toxicity in plants, *Environment International* 31, 739-753.

Shapiro, A.D. and Gerald, L., 2005. Nitric Oxide Signaling in Plants. *Vitamins & Hormones*, Academic Press. Volume 72: 339-398.

Sharp, R.E., Ober, E.S., 1994. Regulation of osmotic adjustment in maize roots growing at low water potentials. Zn DD Randall, RE Sharp, AJ Novacky, DG Blevins, eds, *Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology*, Vol 11. University of Missouri, Columbia, MO, pp 155-167

Shigeoka, S., Yukinori, Y., Takashi, M., Kazuya, Y., Toru, T., Takahiro, I., 2002. Activities of amine oxidase, peroxydase and catalase in seedlings of *Pisum Sativum* L. under different light conditions. *The Plant Journal* **32 (6)**, 915–925.

Siedow, J., Umbah, N., Ann. L. 1995. Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *The Plant Cell*. **7**: 821-831.

Simane, B., Struik, P.C., Nachit, M.M. et Peacock, J.M.,1993. Ontogenic analysis of yield stability of durum wheat in water-limited environments. *Euphytica*, **71** : 211-219.

Simon, H., Codaccioni, P., Lequeur, X., 1989. Produire des céréales à paille. Coll. Agriculture d'aujourd'hui. Science, Techniques, Applications. 63 – 67.

Smiley R. W. Patterson L. M. and Rhinhart E. L., 1996. Fungicide seed treatment effects on emergence of deeply planted winter wheat. Columbia Basin Agricultural Research Annual Report, spec. Rpt. 961. 85-96.

Smirnoff, N., Foyer, C., Dietz, K., Mittler, R., Feierabend, J., Grace, S., Desikan, R., Jones, M., Vreeburg, R., Logan, B. and Jaspers, P., 2005. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Blackwell publishing. *Sciences (CMLS)* **57(5)**: 779-795.

Sommer, A. L. and Lipman, C. B., 1926. Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. *Plant Physiology* **1**, 231-249.

Soltani, A., 1988. Analyse des effets de NaCl et de la source d'azote sur la nutrition minérale de l'orge. Thèse de Doctorat d'État. Tunis : Faculté des Sciences de Tunis, 322 pages.

Soltner, D., 1990. Les grandes productions végétales : Céréales, plantes sarclées, prairies. Coll. Sciences et Techniques agricoles. 17 ème Ed. 464 pages.

Steponkus, P.L., 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **35**: 543-584.

Stewart, C.R. et Lee, J.A.,1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta*, **120**: 279-289.

T.

Tahri, H. Belabed, A. Sadki, K., 1998. Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de proline, de chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*). Bulletin de l'institut scientifique, Rabat, n°21. 81-87.

Taiz, L. and Zeiger, E., 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, 427 pages.

Tal M., Imber D., Ernez M. et Epstein E., 1979. Abnormal stomatal behaviour and hormonal imbalance in FLACCA, a wilted mutant of tomato. *Plant physiol.* **63**. 1044-1048.

Tardieu F., 2003. Virtual Plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. *Trends in Plant Science*, 8, 9-14

Tardieu, F., and Dreyer, E., 1997. Régulation des échanges gazeux par les plantes soumises à la sécheresse. In *L'eau dans l'espace rural. Production végétale et qualité de l'eau*. edited by INRA-Éditions. Institut National de Recherche Agronomique. 41-59.

Toth, J., 2001. Problèmes phytosanitaires et mycorhizes du Cèdre. PHM. *Revue horticole*. 32-36.

Trejo, C.L. and Davies, W. J., 1991. Drought-induced Closure of *Phaseolus vulgaris* L. Stomata Precedes Leaf Water Deficit and any Increase in Xylem ABA Concentration. *Journal of Experimental Botany*. 42: 1507-1516.

Trinchant, J.C., Drevon, J.J., Rigaud, J.,1997. Fixation symbiotique de l'azote. In *Assimilation de l'azote chez les plantes. Aspects physiologique, biochimique et moléculaire*, Morot-Gaudry J.F. (Ed), Inra Editions. 133-147.

Troll, W. and Lindsley, J.,1995. A photometric method for the determination proline. *J. Biol. Chem.*,**215**: 655-660.

Trumpower, B. L., and Gennis, R. B., 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 675-716.

U.

Uchida, K., Kato, Y. et Kawakishi, S.,1990. A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical, *Biochemical and biophysical research communications* **169**, 265- 271.

Uehara, K., Fujimoto, S., aniguchi, T.T., 1974. Studies on violet-colored acid phosphatase of sweet potato II Enzymatic properties and amini acid composition. *Journal of Biochemistry*, 75: 639-649.

U.S. EPA (United States Environmental Protection Agency), 1975. Preliminary investigation of effects on the environment of boron, indium, nickel, selenium, tin, vanadium and their compounds. Vol. 1. Boron. U.S. Environmental Protection Agency Rep. 111pages.

V.

Van Breusegem, F., Vranova, E. Dat,J.F. and Inze,D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction.*Plant Science* 161(3): 405-414.

van der Zaal, B. J., Neuteboom, L. W., Pinas, J. E., Chardonnens, A. N., Schat, H., Verkleij, J. A. C., and Hooykaas, P. J. J.,1999. Overexpression of a Novel Arabidopsis Gene Related to Putative Zinc Transporter Genes from Animals Can Lead to Enhanced Zinc Resistance and Accumulation. *Plant Physiology* 119, 1047-1056.

Van Keulen, H.,1981. Modelling the interaction of water and nitrogen. *Plant and Soil*, 58: 205-229

Vanlerberghe, G. C. and McIntosh, L., 1997. alternative oxidase: From Gene to Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:703–34

Vanin, A.F., Svistunenko D.A., Mikoyan, V.D., Serezhenkov, V.A., Fryer, M.J., Baker, N.R. and Cooper, C.E., 2004. Endogenous Superoxide Production and the Nitrite/Nitrate Ratio Control the Concentration of Bioavailable Free Nitric Oxide in Leaves. *Journal of Biological Chemistry* 279(23): 24100-24107.

Vartanian, N. and Chauveau, M., 1986. In vitro study of root respiration recovery following a drought stress period. *Plant and soil*. 92. 255-264.

W.

Wall, A.M., Ripley, R. et Gale, M.D., 1971. « The position of a locus on chromosome 5B of *Triticumaestivum* affecting homoeologous meiotic pairing ». *Genet Res.*, 18: 329-339.

Weast, R.C.,1985. CRC handbook of chemistry and physics. Boca Raton, FL: CRC Press, Inc., B-79, B-10. 15-23.

Wiegand, C. L., Nixon, P. R., and Jackson, R. D. , 1983. Drought detection and quantification by reflectance and thermal responses. *Agricultural Water Management*, Vol. 7, No. 1-3. 303-321.

Wiese, M.V.,1977. Compendium of wheat diseases. The American Phytopathological Society. St-Paul, Minnesota. 92-93.

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

Wooley, T.J., 1957. Sodium and silicon as nutrient for the tomato plant. *Plant Physiol.*32. 317-321.

Wormuth, D., Heiber, I., Shaikali, J., Kandlbinder, A., Baier, M. and Dietz, K.J., 2007. Redox regulation and antioxidative defence in *Arabidopsis* leaves viewed from a systems biology perspective. *Journal of Biotechnology* 129(2): 229-248.

X.

Xiong, L., Wang, R.O., Mao, O. et Koczan, J.M., 2006. Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiol*142: 1065-1074.

Y.

Yamasaki, H. and Cohen, M.F., 2006. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in Plant Science* 11(11): 522-524.

Yun, H.Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., 1997. Nitric oxide in health and disease of the nervous System. *Mol Psychiatry* 2:300-310.

Z.

Zamocky, M., and Koller, F., 1999. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *ProgBiophysMolBiol*, 72(1), 19-66.

Zayed A.M., Terry N., 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, *Plant and Soil* 249, 139-156.

Zeriri, I., Tadjine, A., Grara, N., Belhaouchet, N., Berrebbah, H. and Djebbar, M.R., 2012. Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamates on a bioindicator model of the pollution the earthworm *Octodriluscomplanatus* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Annals of Biological Research*. 3 (11):5367-5373.

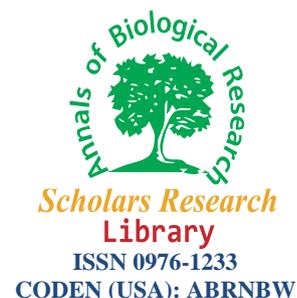
Zhang, S., Weng, J., Pan,J., Tu, T., Yao, S., and Xu, C., 2003. Study on the photo-generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynthesis Research*. 75(1),41-48.

Zinselmeier, C., Jeong, B.R., Boyer, J.S.,1999. Starch and the control of kernel number in maize at low water potentials. *Plant Physiology*, 121, 25-36



Scholars Research Library

Annals of Biological Research, 2013, 4 (5):11-15
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Oxidative stress, chlorophyll content and ROS production and localization in *Triticum durum* seed

¹Issaad Ghozlène., ¹Djebar Mohammed-Réda, ^{1,2}Grara Nedjoud, ¹Berrebah Houria and ¹Chagra Ali

¹Laboratory of Cellular Toxicology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Badji Mokhtar University, Annaba, Algeria

²Department of Biology, University 8 May, 1945, Guelma, Algeria

ABSTRACT

Plants subjected to unfavorable environmental conditions (abiotic stress) and which are under stress have manifested consequences by disturbances morpho physiological. The work that we have performed concerns the effects of water stress on plant model: durum wheat (*Triticum durum*) variety GTA. After germination, the plants were subjected to water stress during (03, 05, 07 and 09 days). Our results showed clearly a decrease in the average content in chlorophyll and disruption of respiratory metabolism. At the cellular level, this stress has led to changes in cellular homeostasis and toxicity, which are manifested by the production of reactive forms of oxygen, superoxide anion at the roots of our plant model.

INTRODUCTION

The Environmental stress in plants involve signaling reactions which can lead to the development of defenses or trigger programmed cell death [1- 4].

With the exception of organisms anaerobes, oxygen is required for all animals, plants and bacteria aims to produce energy through electron transport chains such as that found in mitochondria eukaryotic cells [5]. During evolution, the adaptation of plants to oxygen is translated by the appearance of enzymes facilitating not only its consumption but also the detoxification of reduced metabolites such as the superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$) and hydrogen peroxide H_2O_2 [6]. These species are called reactive oxygen species (ROS) because they are considerably more toxic than the oxygen [7]. Environmental changes are responsible of the failure of control systems and oxygen metabolites that are responsible for the phenomena of oxidative stress [8].

MATERIALS AND METHODS

Biological material:

The biological material used in this work is durum family Poaceae specifically *Triticum durum* (DESF). The chosen organ for this study is the root. The samples come from the interprofessional Algerian Office of cereals (CATO) El Hajar, Annaba, Algeria. We used the hard variety GTA.

Performing the test:

The tests are conducted at the Toxicology Laboratory of Cellular Badji Mokhtar Annaba University and Laboratory of Cellular and Molecular Physiology Plants of the University Pierre et Marie Curie-Paris 6.

After 4 days of germination, wheat germ suffer water stress by stopping watering and wheat samples were analyzed at 3, 5, 7 and 9 days after cessation of watering. A Part continues to be watered normally and is considered a witness.

The Germination occurs at a temperature of 21 ° C day and 17-21 ° C night with artificial lighting from 6 am to 22 H.

Extraction of chlorophyll

The extraction of chlorophyll is according to the method of Holden (1975), based on a maceration of the plant in acetone. The Reading is done by two wavelengths 645 nm and 663 nm, after calibration of the apparatus with the control solution of 80% acetone [9].

Monitoring of respiratory metabolism

The Respiratory metabolism was evaluated by the respiration measuring intensity (IR) of isolated roots of durum wheat. The intensity of respiration is monitored by using an oxygen electrode Clark electrode (Hansatech Ltd, Kinj's Lym, Uk). [10,11].

In situ localization of superoxide anion

Roots were incubated in 6 mM nitroblue tetrazolium (NBT) in 10mM Tris-HCl buffer (pH 7,) at room temperature for 30 min. Superoxide anion was visualized as deposits of dark-blue insoluble formazan compounds [12].

RESULTS

Average chlorophyll content:

The evolution of the average chlorophyll content (Table 01) showed a significant decrease in chlorophyll from 5 day. This decrease is proportional to the stress intensity

Table 01. Effect of water stress on mean levels chlorophyll a, b and (a + b).

| Times/Chlorophyll | 3 days | 5 days | 7days | 9 days |
|-------------------|------------|------------|------------|------------|
| WS chl (a) | 15,7343333 | 17,0943333 | 17,4743333 | 17,6636667 |
| US chl (a) | 15,469 | 14,8413333 | 14,555 | 13,4063333 |
| WS chl (b) | 28,795 | 31,2616667 | 31,9253333 | 32,2683333 |
| US chl (b) | 28,3116667 | 27,1793333 | 26,6466667 | 24,5613333 |
| WS chl (a+b) | 46,9813333 | 49,118 | 47,4113333 | 47,7133333 |
| US chl (a+b) | 46,78 | 45,931 | 44,3506667 | 42,3483333 |

(WS: Without Stress, US: Under Stress)

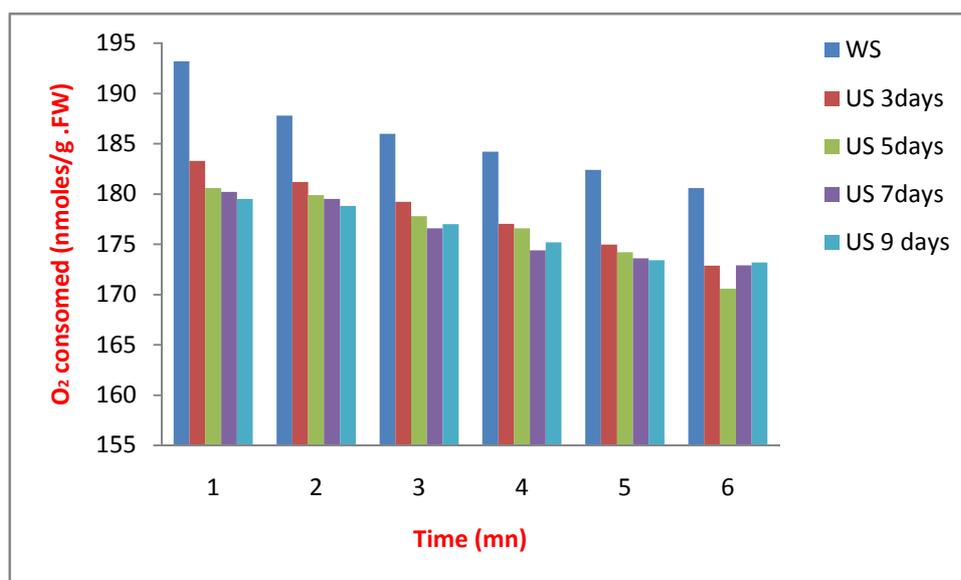


Figure 1. Oxygen Consumed at the root level (nmol / min / g. FW)
(WS: Without Stress, US : Under Stress, FW: Frais Weight)

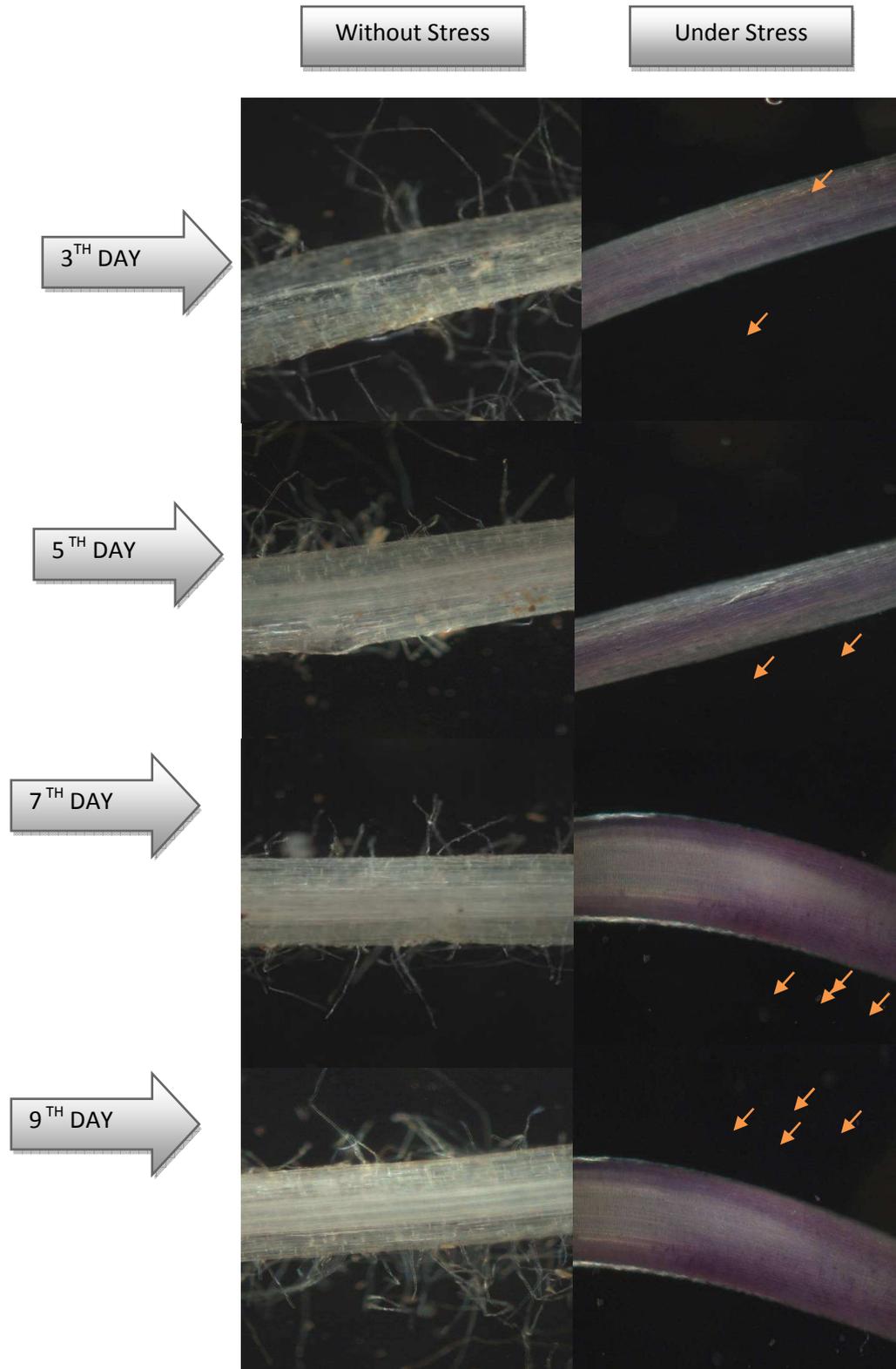


Figure 02. Using the method of Beyer and Fridovich, 1987 in highlighting the superoxide anion at the root level observed in control and stressed.

Monitoring of respiratory metabolism:

Monitoring of respiratory variations in intensity (figure 01) shows a strong inhibition in stressed roots seeds in comparison with controls. This decrease is observed according to the four time tested (3,5,7 and 9 days of stress).

Location of superoxide anion

Figure (02) shows the location of the superoxide anion in the roots of seeds subjected to stress (dark color). We find that the intensity of the violet color increases in a manner proportional to the intensity of water stress, parallel to the witnesses, no trace of O_2^- is observed.

DISCUSSION

The water has a great importance [13] so its lack causes physiological and morphological disturbances and appearance of oxidative stress which is characterized by the formation of reactive oxygen species (ROS) [14].

The whole of our results shows that water stress leads to a reduction of the average chlorophyll. This observation is in accordance with the work of (Havaux 1988; Djekoun and Ykhlef 1996; Kotchi, 2004 [15-17].

Reduction of photosynthesis is related firstly to stomatal closure [18-20] and secondly to reduce the photochemical activity of photosystem (PSII) [21]. However, the water deficit leads to an inhibition of respiration [22]. The dip in our work explains the presence of large amounts of ROS, which is derived from photosynthetic and respiratory metabolism that explains the positive correlation existing between respiration rate and chlorophyll synthesis recorded in our work.

Moreover, in mitochondria (site of ROS production in root), superoxide anion (O_2^-) is generated at complexes I, II and III of the respiratory chain [26-29] due to a leak in the mitochondrial respiratory chain, specifically at the terminal acceptor: cytochrome oxidase complex IV chain electronic transport in the inner mitochondrial membrane [28].

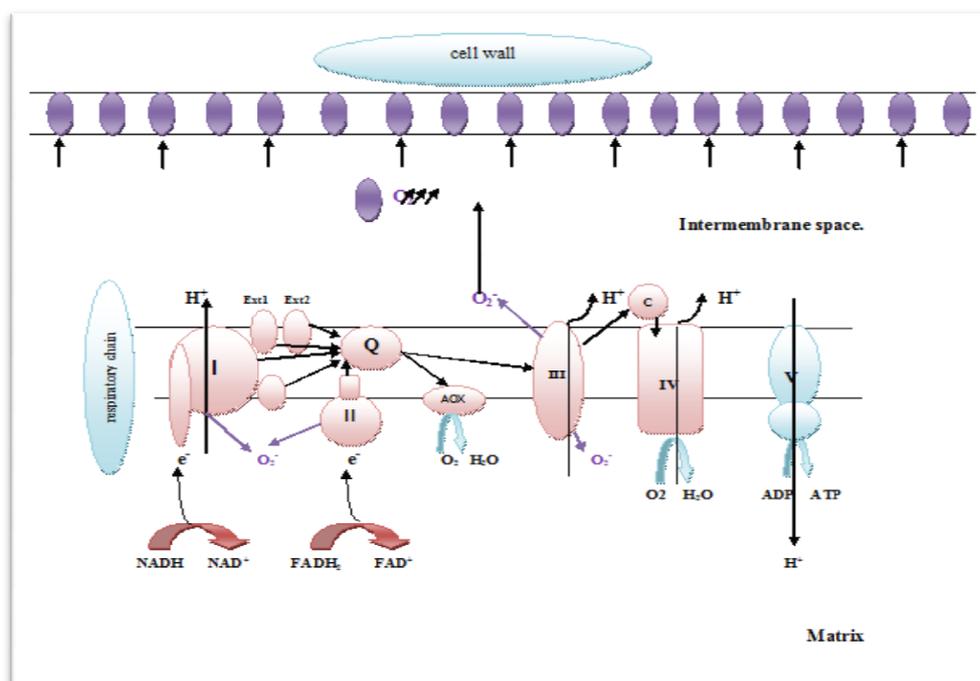


Figure.03 Representation of the formation of superoxide anion at the mitochondrial respiratory chain of durum wheat roots « *Triticum durum* DESF »

The purple arrows represent "leakage" of electrons to O_2 to form superoxide anions. Complex I: NADH dehydrogenase, complex II: Succinate dehydrogenase, complex III: Cytochrome bc1 complex IV: Cytochrome c oxidase, Complex V: ATPase, Q: ubiquinone pool, AOX: alternative oxidase, C: cytochrome C, Ext1 and Ext2: NAD(P)H dehydrogenases external.

And oxygen is partially reduced 2 to 3% of the oxygen is reduced at single electronic ubiquinone [29, 30]. The amount of ROS produced in mitochondria may be at least partially explained by the presence of alternative airway (AOX), which constitutes an emergency route for the diminution of O_2 does not involve complex III [31,32]. The efficiency of the antioxidant activity of ubiquinone (Q) depends of the fate of the semiquinone (SQH) that can perform any activity contrary (that is to say pro-oxidant) via the formation of superoxide anion (figure 03). Thus, complexes I and II reduced coenzyme Q using electrons donated by NADH and FADH₂. Coenzyme Q transfers the electrons to complex III which transferred to cytochrome C. Complex IV uses electrons from cytochrome C to

reduce oxygen to water. Complexes I, II and III through the superoxide anion incomplete reduction of oxygen. Complexes I and II produce the superoxide anion in the matrix and the complex III in the matrix and the inter-membrane.

CONCLUSION

The results obtained in our study confirm the toxicity of water stress on wheat (*Triticum durum* DESF) variety GTA. Indeed deficiency water causes an inhibition of the synthesis of chlorophyll and metabolic disorder breathing. These two basic metabolisms are essential for the growth and development of the plant and their disruption causes a state of oxidative stress through increased production of reactive oxygen species such as superoxide anion, we have highlighted the roots.

Acknowledgements

The authors wish to thank Professor Christophe Bailly Laboratory of Cellular Physiology and Plant Molecular University Pierre and Marie Curie-Paris 6 for the illustration of the location of ROS.

REFERENCES

- [1] C.A. Lamb, R.A. Dixon, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **1997**, **48**,251-275.
- [2] H. Mamoudou, *Selected Works.*, **2005**, 561-567.
- [3] M.F. Kasraoui , M. Braham ,M. Denden ,H. Mehri ,M. Garcia ,T. Lamaze ,F Attia , *Science direct.*,**2006**, 329, 98-105.
- [4] M. El Fakhrir, S.Mahboub, M. Bencheikroun, *Nature &Technologie.*, **2010**, 6-12.
- [5] I.E. Scheffler, Wiley-Liss.,**1999**.
- [6] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loliger, O.I Aruoma, *Food Chem Toxicol.*,**1995**, 33 (7). 601-617.
- [7] G.P. Novelli, *J.Physiol. Pharmacol.*, **1997.**, **48**. 517-527.
- [8] C.Parent, N. Capelli, J. Dat, *C. R. Biologies.*, **2008**, 331.
- [9] M. Holden, *Edition Academic Press New York.* ,**1975**,133.
- [10] M.R Djebar, H. Djebar, *Synthèse.*, **2000**, 23 - 25.
- [11] L.Meksem, PhD thesis , Badji Mokhtar University, (Annaba, Algeria) , **2007**.
- [12] W.F. Beyer, I. Fridovich, *Anal. Biochem.*, **1987**, **161**. 559-566.
- [13] D. Soltner, *Coll. Sciences et Techniques agricoles.*, **1990**, **464**.
- [14] R.Mittler, *Trends Plant Sci.*, **2002**, **7**(9), 405-410.
- [15] M. Havaux, *Plant Physiol. Biochem.*,**1988**, **26**. 245-251.
- [16] A. Djekoun, N. Ykhlef , 3ème Reunion du réseau SEWANA, de blé dur, IAV Hassan II, 6-7 Décembre ., **1996**.
- [17] S.O. Kotchi, *EPFL.*, **2004**,**115**
- [18] R.C. Johnson, H.T. Nguyen, L.I. Croy, *Crop Sci.*, **1984**, 24. 957-962.
- [19] T. Guissou , B.A. Amadou, C. Plenchette, S.Guinko, R. Duponnois, *Science et changements planétaires.*,**2001**, 12.
- [20] A. Mahhou, M.Theodore, S.Ken, *CIRAD,EDP Sciences.*,**2005**, 55-68.
- [21] G.D. Farquhar, T.D. Sharkey, *Ann. Rev. Plant Physiol*,**1982**, **33**,317 – 345.
- [22] N.Vartanian, M. Chauveau, *Plant and soil.*,**1986**, **92** ,255-264.
- [23] J.A. Imlay, *Annu Rev Microbiol.*, **2003**, **57**,395-418.
- [24] E. Herrero, J. Ros, G. Belli, E. Cabiscol, *Biochim Biophys Acta* .,**2008** (11), 1217-1235.
- [25] M.P. Murphy, *Biochem J.*, **2009**, **417**(1): 1-13.
- [26] R.B. Hamanaka, N.S .Chandel, *Trends Biochem Sci.*, **2010**, **10**.
- [27] D. Han, E.Williams, E.Cadenas, *Biochem. J.*, **2001**,**353**, **411-416**.
- [28] E.Cadenas, J.A. Davies, *Free Radical. Biol. Med.*, **2000**, **29**, 222-230.
- [29] L.A. Rio, F.J. Corpas, L.M. Sandalio, J.M. Palma, M. Gomez, J.B. Barroso, *J Exp Bot.*, **2002**, **53**(372), 1255-1272.
- [30] K. Oracz, H . El-Maarouf Bouteau, J.M. Farrant, K. Cooper, M. Belghazi, C. Job, D. Job, F Corbineau, C. Bailly,*Plant J.* , **2007**,**50**(3), 452-465.
- [31] D.P. Maxwell , Y. Wang, L. McIntosh, *Proc Natl Acad Sci U S A.*,**1999**, **96**, 8271-8276.
- [32] A.M.Wagner, *FEBS Lett.*, **1995** **368**. 339-342.



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

ROS and redox signaling in the response of stems of wheat durum to abiotic stress

Issaad Ghozlène*, Djebbar Mohammed-Réda, Berrebbah Houria

Laboratory of Cellular Toxicology. BP.12-Annaba 2300, Algeria

Key words: Water deficit, redox signaling, hydrogen peroxide, superoxide anion.

doi: <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/3.10.298-305> Article published on October 21, 2013

Abstract

Cereals hold an important place in agricultural research programs. In Algeria, this place is more important because the country wants to achieve stable production of cereals, especially concerning wheat and barley. However, water availability is a major factor which is limiting the productivity of cereal in Algeria. This work focuses on studying the effects of water deficit on the rods of a model plant: wheat (*Triticum durum*) variety GTA. After germination, the plants were subjected to a water stress during 03, 05, 07 and 09 days. Our results showed an increase in catalase activity (CAT), ascorbate-peroxidase (APX) (specific Enzymes of cellular detoxification system) and a lesser degree of activity of Guaiacol-peroxidase (GPX). On the other hand, we also showed a strong surge in the rate of hydrogen peroxide (H₂O₂) in rods. This increase is proportional to the degree of induced stress. The stress has caused toxicity which was manifested by the production of reactive forms of oxygen, hydrogen peroxide and superoxide anion in rods of our plant model.

* **Corresponding Author:** Issaad Ghozlène ✉ semsem-dj@hotmail.fr

Introduction

Cereals hold an important place in agricultural research programs. In Algeria, this place is more important because the country wants to achieve stable production of cereals, especially concerning wheat and barley. However, water availability is a major factor which is limiting the productivity of cereal in Algeria.

Water deficit is one of the main factors which is limiting yields around the world, lack of water, which is associated with other abiotic stresses (frost, high temperature, salinity ...), and climatic variability are responsible of yield losses (Monneveux and This, 1997). Facing to these attacks, the cells synthesize a number of antioxidant enzymes capable of trapping reactive oxygen species (Flexas *et al.*, 2006, Meksem, 2007). These are at the origin of the appearance of oxidative stress (Price *et al.*, 1998, Noctor and Foyer, 1998).

The main ROS (reactive oxygen species) which are formed are hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot OH$), superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) and singlet oxygen (1O_2). These ROS have a strong oxidant action and can react with most biological molecules, leading to a significant changes in their physico-chemical properties with harmful consequences for the integrity of the cell. In addition, some uncharged molecules are able to diffuse through the cell walls and thus can cause multiple damages such as bases oxidation of DNA or protein oxidation (Appel and Hirt, 2004).

Oxidative stress in plants is the subject of many literature reviews (Apel and Hirt, 2004, Foyer and Noctor, 2005a, Pitzschke *et al.*, 2006, Wormuth *et al.*, 2007). Thus, the purpose of this section is to understand the different pro-oxidant and antioxidant processes taking place in stems cells, to understand the mechanisms leading to the generation of oxidative stress under the effect of water stress.

Material and methods

The biological material used in this work is the durum family of Poaceae more specifically it is called *Triticum durum* (Desf). The organ chosen for this study is the stem. The samples come from the Algerian office inter cereals (CATO) El Hajar, Annaba, Algeria. We used the variety of GTA hard.

Performing the test

The tests are done at the Laboratory of Cellular Toxicology of Badji Mokhtar Annaba University-Algeria and the Laboratory of Cellular and Molecular Physiology Plants of the University Pierre and Marie Curie-Paris 6. After 4 days of germination, wheat germ suffer from water stress by stopping of watering in addition wheat samples were analyzed at 3, 5, 7 and 9 th day after cessation of watering. A part continues to be watered normally and is considered as a witness. Germination was carried out at a temperature of 21 ° C day and 17-21 ° C night with artificial lighting from 6 H to 22 H.

Relative turgidity of Water in rods (RWC)

Turgor on water is determined by the percentage of water present in the excised stems and immersed in water during 2 hours, according to the method of Clarke and Mc Caig (1982) which is also used by Rascio (1988). The calculation is based on Ladiges method (1975).

Measuring of the enzyme activity

The appropriate method to obtain the enzymatic extract of the stems of durum wheat is to Loggni *et al.*, 1999. The extract is used for measuring the Catalase activity (CAT) which is performed according to the method of Boscoloa *et al.*, 2003, ascorbate peroxidase-(APX) according to the method of (Manivannan *et al.*, 2007) and Guaiacol peroxidase-(GPX) according to the method of (Hiner *et al.*, 2002).

The fresh stems (1g) are crushed cold in a mortar with a phosphate buffer (50ml Na K, pH 7.2) at a rate of 1 ml buffer per 1 g of rod. The homogenate is then filtered and centrifuged cold 12000xg for 20 mn

(Centrifuge Sigma 3-16 K). The supernatant obtained will be used for the determination of various enzymatic extracts.

Measuring the production of H₂O₂

The rods are incubated in 250 µl of buffer solution potassium phosphate (20 mM, pH 6) containing 5µM of scopoletin (Sigma) and 1U/ml (final concentration) horseradish peroxidase at 25 ° C in the darkness using a stirrer as described by (Schopfer *et al.*,2001). The production of H₂O₂ is measured by the decrease in fluorescence (excitation 346 nm, emission 455 nm) of the environment of incubation and was converted into a molar concentration of average of three replicates and are expressed as mg fresh weight of stems.

Location of hydrogen peroxide H₂O₂

Intercellular ROS production was visualized using DCFH-DA (Molecular Probe) with a fluorescence microscope. The rod is incubated in a buffer for 20 mM potassium phosphate (pH 6) containing 50 microns DCFH-DA for 60 min at 20 ° in the dark. The

samples were rinsed 3 times in buffer .The images are taken (excitation: 480 nm, emission: 525 nm) with a fluorescence microscope using a digital lens * 05. To compare the density of DCFH-DA, samples of different experimental conditions are set at the same time and analyzed under the fluorescence microscope using the same experimental parameters (Oracz *et al.*, 2009).

Location of superoxide anion O₂⁻

The rods are incubated in nitroblue tetrazolium 6 mM (NBT) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) at room temperature for 30 mn. Superoxide anion is displayed in the form of dark blue deposits of insoluble formazan (Beyer and Fridovich, 1987).

Results

Relative Water turgor (RWC)

Figure (01) shows the relative water turgor (RWC), determined by the percentage of water which is present in the stems. We find a strong and high significant decrease in stems subjected to water stress; according to the witness.

Table 1. Effects of water stress on the activities of catalase (CAT), ascorbate-peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) in the GTA hard variety subjected to a water stress (WS :Without Stress ,US : Under Stress).

| Times (Days) | 3D | 5D | 7D | 9D |
|--------------|------------|------------|------------|------------|
| WS (APX) | 0,04435581 | 0,04842756 | 0,03756345 | 0,03296641 |
| US (APX) | 0,05305535 | 0,05531245 | 0,06163034 | 0,16380848 |
| | P > 0,05 | P > 0,05 | P < 0,05 | P < 0,01 |
| WS (CAT) | 0,00209596 | 0,00197406 | 0,00203046 | 0,00153465 |
| US (CAT) | 0,00306521 | 0,00520419 | 0,00673824 | 0,01026853 |
| | P ≤ 0,001 | P ≤ 0,001 | P ≤ 0,001 | P ≤ 0,001 |
| WS (GPX) | 0,01549042 | 0,01590525 | 0,0161675 | 0,01555897 |
| US (GPX) | 0,02270164 | 0,01707614 | 0,01445492 | 0,015062 |
| | P ≤ 0,001 | P ≤ 0,001 | P ≤ 0,001 | P ≤ 0,001 |

Enzymatic activities.

The development in activities of Catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol-peroxidase in seeds subjected to water stress (Table 01), shows that there is a positive correlation between the severity of water stress and the enzymatic activity from the 3rd day. However the rise of the catalase activity and guaiacol-peroxidase are both very highly significant within the

3rd day according to the witness ,by another hand; the graph presents a non- significant raise of ascorbate peroxidase activity from the 3rd day to which followed by a significant increase until the 7th day .

Measurement of Hydrogen Peroxide (H₂O₂) produced

The evolution of the average content H_2O_2 in rods (Figure 02) reveals a very high and significant production of Hydrogen Peroxide from the 3rd day tends to increase gradually when the stress level increases.

Location of hydrogen peroxide and superoxide anion

Figure (03) confirmed the presence of H_2O_2 (black darts) in stems of seeds subjected to stress, visible as fluorescent granule. Thus the figure shows the location of the superoxide anion (blue dart). In controls we observed no trace of H_2O_2 or O_2^- .

Discussion

Plants are constantly subjected to changes in their environment, requiring them to alter their metabolism to maintain a balance between production and consumption of energy. This balance depends largely on a signaling network that coordinates three important processes in the life of plants: photosynthesis, respiration and photorespiration. (Noctor *et al.*, 2007, Foyer and Noctor, 2009, Foyer *et al.*, 2009; Pfannschmidt *et al.*, 2009). However drought causes morphophysiological changes: this is one of the major factors that limit plant growth under natural conditions (Cornic and Massacci, 1996). Disruption of plant growth under stress is due to a decrease in leaf growth responsible of a reduction of the amount of the absorbed light by the plants. The assimilation of CO_2 decreases when the stress persists (Baxter *et al.*, 2007, Takahashi and Murata, 2008). This diminution is mainly due to the closure of stomata (Brodribb and Holbrook, 2003), which the opening limits the diffusion of CO_2 from the air to the sites of carboxylation. Stomatal closure also mitigates the cavitation for maintaining the hydraulic conductivity of the xylem. When plants lose a significant amount of their water that may occur damages which are probably due to the passive concentration of reactive oxygen species (ROS) (Buchanan and Blamer, 2005, Moller and Sweetlove, 2010).

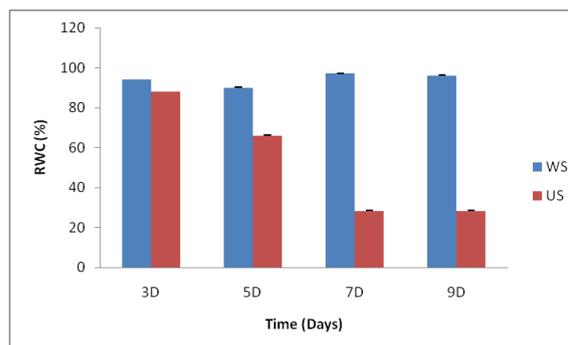


Fig. 1. Turgor Relative Water (RWC) at the stem (WS: without stress, US: under stress).

Deal with this stress, plants synthesize detoxification enzymes including catalase, guaiacol peroxidase and ascorbate peroxidase, involved in the maintain of cellular structures by the detoxification of ROS, which are then frequently produced, and responsible of the appearance of an oxidative stress (Flexas *et al.*, 2006, Meksem, 2007).

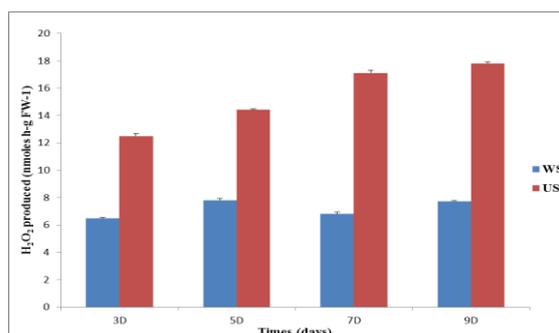


Fig. 2. Average content in hydrogen peroxide produced in durum wheat stalks.

According (Foyer and Noctor, 2003, Edreva, 2005, Asada, 2006) chloroplasts and mitochondria are the main sources of ROS in plants. However, the chlorophyll cells, due to their production of O_2^- during the photosynthetic process, are particularly vulnerable to the generation of ROS. This process is responsible for the direct formation of 1O_2 and O_2^- H_2O_2 and indirect (by dismutation of O_2^-) and $\cdot OH$. There is still some time, photosystem I (PSI) was considered as the main source of ROS chloroplast. Under normal physiological conditions, the electron flow of PSI is directed to the NADP which is reduced to NADPH by NADP reductase ferredoxin (FNR). During stress, the electron chain may saturate. Part of the electron flow can be derived by ferredoxin to

oxygen (Figure 04). In addition to ferredoxin, other electron acceptors of PSI have a redox potential sufficiently negative to reduce dioxygen to superoxide anion (Mehler, 1951, Asada *et al.*, 1974). In recent years, it became clear that the PSI was also a site of generation of O_2^- (Cleland and Grace, 1999, Dat *et al.*, 2000). Quinones A and B of PSI are involved in the loss of electrons leading to the reduction of O_2 (Figure 04). Some authors have even suggested that the production of superoxide anions from chloroplast is mainly the result of the loss of electrons from PSII, in particular at the level of quinone B (Zhang *et al.*, 2003). Chlorophyll *a* (Chl *a*) of PSII also has the ability to transmit an electron directly to oxygen in case of saturation of the electron transport chain (ETC) (Hippeli *et al.*, 1999). Once superoxide anions are produced in the stroma, they are quickly taken care of by superoxide dismutase (SOD), responsible of the dismutation of H_2O_2 (Foyer *et al.*, 1994, Edreva, 2005). (Figure 04).



Fig. 3. The demonstration of hydrogen peroxide and superoxide anion level in stems observed in controls and stressed. (Darts black: Represents the granules of the hydrogen peroxide (Darts blue: represent the superoxide anion).

Thus, mitochondria are a major source of ROS in non-chlorophyllous cells, whereas they represent only a small part of the chlorophyll cells (such as stem) (Foyer and Noctor, 2003). Under normal physiological conditions, approximately 2% to 6% of

the total oxygen consumed by mitochondria is converted into ROS (Boveris and Chance, 1973). In the same way as the (ETC) of chloroplasts it is a saturation of the mitochondrial (ETC) seems to be the cause of the loss of electrons to O_2 (Figure 04). The intermediates radical of ubiquinones formed by the reduction of the pool of ubiquinones by complexes I and III of the ETC are the main electron donating to oxygen (Moller, 2001, Rhoads *et al.*, 2006). However, flavoproteins of complex II may also contribute to the production of O_2^- (Young *et al.*, 2002) ROS production near the (ETC) may cause damages to the membrane, inducing a further decrease in the efficiency of the (ETC) and a greater loss of electrons. The result is a rise in the generation of ROS decreasing the efficiency of (ETC). During major stress, the initial generation of ROS can lead to deleterious cycle of production of these species which are toxic to the body. This cycle of mitochondrial ROS production is regarded as one of the main causes of cellular aging (Loeb *et al.*, 2005).

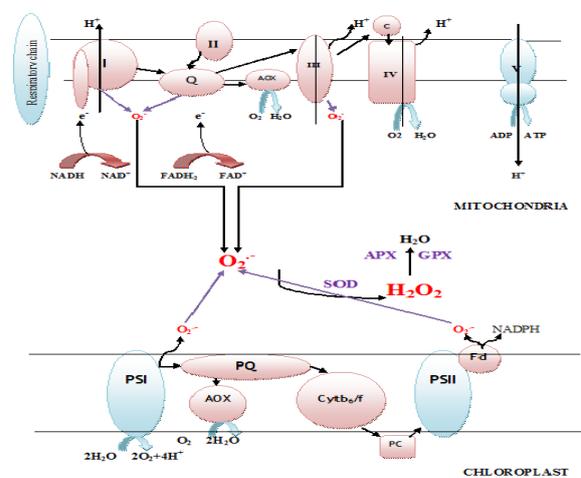


Fig. 4. Representation of the formation of superoxide anion and hydrogen peroxide in the mitochondria and chloroplasts of wheat stem hard "*Triticum durum* Desf".

The purple arrows represent "leakage" of electrons to O_2 to form superoxide anions. Complex I: NADH dehydrogenase, complex II: succinate dehydrogenase, complex III: cytochrome *bc*₁, complex IV: cytochrome *c* oxidase, complex V: ATPase, Q: ubiquinone pool, AOX: alternative oxidase, C: cytochrome *C*, Ext1 and

Ext2 : NAD (P) H dehydrogenases external ,APX: ascorbate peroxidase, GPX: guaiacol peroxidase, SOD: superoxide dismutase, Cytb6 / f: Cytochrome b6 / f, Fd: ferredoxin, PC: plastocyanin, PQ: plastoquinone, Q: quinones.

Acknowledgements

The authors wish to thank Professor Christophe Bailly Laboratory of Cellular Physiology and Plant Molecular University Pierre and Marie Curie-Paris 6 for the illustration of the location and measurement of ROS.

References

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

<http://dx.doi.org/10.1146/nrev.arplant.55.031903.11701>

Asada K. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* **141(2)**, 391-396.

Asada K, Kiso K, Yoshikawa K. 1974 Univalent Reduction of Molecular Oxygen by Spinach Chloroplasts on Illumination. *Journal of Biological Chemistry* **249(7)**, 2175-2181.

Baxter CJ, Redestig H, Schauer N. 2007. The metabolic response of heterotrophic Arabidopsis cells to oxidative stress. *Plant Physiology* **143**, 312-325.

<http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.090431>

Beyer WF, Fridovich I. 1987. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry* **161**, 559-566.

[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)

Boscoloa P, Menossib M, Renato Jorgea A. 2003. Aluminium-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* **62**, 181-189.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0031%209422\(02\)00723-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0031%209422(02)00723-9)

Boveris A, Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* **134(3)**, 707-716

<http://dx.doi.org/10.1172/JCI116700>

Brodribb TJ, Holbrook NM. 2003. Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. *Plant Physiol* **132**, 2166-2173

<http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.023879>

Buchanan BB, Blamer Y. 2005. Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* **56**, 187- 220.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144246>

Clarke JM, Mc Caig JN. 1982. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Science* **22**, 503.

Cleland RE, Grace SC. 1999. Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. *Febs Letters* **457(3)**, 348-352.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01067-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01067-4)

Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57(5)**, 779-795.

<http://dx.doi.org/10.1007/s000180050041>

Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **106(2-3)**, 119-133.

<http://dx.doi.org/10.1089/152308603321223531>

Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M. 2006. Keeping a positive carbon balance

under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* **127**, 343-352.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00621.x>

Foyer CH, Bloom AJ, Queva G, Noctor G. 2009. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual review of plant biology* **60**, 455-484

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.091948>

Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ. 1994. Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* **92(4)**, 696-717.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054>

Foyer CH, Noctor G. 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**, 355-364.

<http://dx.doi.org/10.1034/j.1399.3054.2003.00223.x>

Foyer CH, Noctor G. 2005a. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1056- 1071.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01327.x>

Foyer CH, Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms : signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling* **11**, 861-905.

<http://dx.doi.org/10.1089/ars.2008.2177>

Hiner A, Ruiz J, Lopez JN, Arnao MB, Raven EI, Canovas FG, Ascota M. 2002. Kinetic study of the Ascorbate-peroxidase by hydrogen peroxide *Biochemical Journal* **348**, 321-328.

Hippeli S, Heiser I, Elstner EF. 1999. Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **37(3)**, 167-178.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(99\)80031-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80031-X)

Ladigues PY. 1975. Some aspect of tissue water relation in three populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. *New Phytologist* **75**, 53-62.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137>

Loeb LA, Wallace DC, Martin, GM. 2005. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102(52)**, 18769-18770.

<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508886102>

Loggni B, Scartazza A, Brugnoli E , Navari-Izzo F.1999. Antioxydative defence system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant physiology* **119**, 1091-1099.

Manivannan P, Abdullaleel C, Kishocekumar A, Saukar B, Somasundaram R, Sridharam R, Panneersel R. 2007. Changes in antioxidant metabolism of vigna ungui culata (L.). walp by propiconazole under water deficit stress. *Colloides and surfaces . Bio interfaces* **57**, 69-74.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.01.004>

Mehler A. 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry* **33(1)**, 65-77.

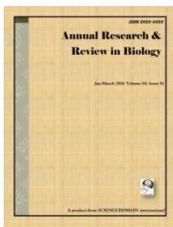
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90082-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-9861(51)90082-3)

Meksem L. 2007. Etude des effets de deux fongicides: Le Flammenco SC et le Tilt 250 EC sur la physiologie, la croissance et le métabolisme énergétique des racines isolées de *Triticum durum* DESF. PhD, university of Badji Mokhtar, annaba, p. 136-137.

Moller IM. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52(1)**, 561-591.

<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.561>

- Moller IM, Sweetlove LJ.** 2010. ROS signaling-specificity is required. *Trends in plant science* **15**, 370-374.
<http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/plso14>
- Monneveux P, This D.** 1997. La génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse : espoirs et difficultés. *Science et changements planétaires / Sécheresse* **1**, 29-37.
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH.** 2007. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in plants science* **12**, 125-134.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.005>
- Noctor G, Foyer CH.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249-279.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranter L, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C.** 2009. The mechanism involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* **150**, 494-505.
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.138107>
- Pfannschmidt T, Brautigam K, Wagner R, Dietzel L, Schroter Y, Steiner S, Nykytenko A.** 2009. Potential regulation of gene expression in photosynthetic cells by redox and energy state: approaches towards better understanding. *Annals of Botany* **103**, 602-609.
<http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcn081>
- Price A, Hendry G.** 1997. The signification of the tocopherols in stress survival in plant. In: Evans CR, ed. *Free Radicals, Oxidant Stress and Drug Action*, Richelieu Press, 443-450 p.
- Rascio A.** 1988. Several mechanisms of water stress adaptation in durum wheat *Gen. Agraria* **42**, 90.
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN.** 2006. Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiology* **141(2)**, 357-366.
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.079129>
- Schopfer P, Plachy C, Frahy G.** 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellins, and abscisic acid. *Plant Physiology* **125**, 1591-1602.
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.125.4.1591>
- Takahashi S, Murata N.** 2008. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Plant Science* **13**, 178-182.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.01.005>
- Wormuth D, Heiber I, Shaikali J, Kandlbinder A, Baier M, Dietz KJ.** 2007. Redox regulation and antioxidative defence in Arabidopsis leaves viewed from a systems biology perspective. *Journal of Biotechnology* **129(2)**, 229-248
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12>
- Young TA, Cunningham CC, Bailey SM.** 2002. Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **405(1)**, 65-72.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00338-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00338-7)
- Zhang S, Weng J, Pan J, Tu T, Yao S, Xu C.** 2003. Study on the photo-generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynthesis Research* **75(1)**, 41-48.
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1022439009587>



Annual Research & Review in Biology
4(8): 1241-1249, 2014

SCIENCEDOMAIN *international*
www.sciencedomain.org



ROS and Antioxidant System of *Triticum durum* after Water Stress

Issaad Ghozlene¹, Djebbar Mohammed-Reda¹, Rouabhi Rachid^{1,2*}
and Berrebbah Houria¹

¹Laboratory of Cellular Toxicology, University of Annaba, 23000, Annaba, Algeria.

²Biology department, Tebessa University, 12000, Tebessa, Algeria.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author IG carried out trials and managed the literature searches. Author RR designed the study, wrote the protocol, and wrote the first draft of the manuscript, translated it from French to English language. Authors DMR and BH followed and supervised this study. All authors read and approved the final manuscript.

Original Research Article

Received 14th June 2013
Accepted 17th October 2013
Published 2nd January 2014

ABSTRACT

Aim: Water stress is the cause of many disturbances in plants. This work focuses on the effects of water stress on the roots and seeds of a durum wheat (*Triticum durum*) of the GTA variety.

Study Design: After germination, the plants were submitted to water stress, and many enzymatic tests are followed to evaluate the response of durum wheat plant to this stress.

Place and Duration of Study: Laboratory of cellular toxicology, department of biology, faculty of sciences, Annaba university, and laboratory of Cellular and Molecular Physiology of Plants of the Pierre and Marie Curie, Paris VI, France University.

Methodology: Seeding was carried out in plastic vessels. After 4 days of germination, the seeds of wheat were submitted to water stress by stopping irrigation and wheat samples were analyzed at 3rd, 5th, 7th and 9th day after interruption of watering. Controls were watered normally.

Germination took place at a Day temperature of 21°C and 17-21°C at Night with artificial lighting from 6 am to 10 pm.

Results: The results showed an increase in catalase activity (CAT), ascorbate peroxidase

*Corresponding author: Email: r_rouabhi@yahoo.fr;

(APX) (specific enzymes o cellular detoxification system); this increase was less observed in the activity of guaiacol peroxidase (GPX).

On the other hand, as ever increase in the level of hydrogen peroxide (H₂O₂) in the roots was observed. This increase is proportional to the degree of induced stress. The observation under a fluorescence microscope was revealed that the produced hydrogen peroxide was localized generally in the cytoplasm and the cell wall.

Conclusion: It is clear and possible that water stress induced many plant disturbances and the increase of ROS production.

Keywords: Water stress; water state; catalase; ascorbate peroxidase; guaiacol peroxidase; hydrogen peroxide; reactive oxygen species.

1. INTRODUCTION

Oxidative stress in plants is the subject of numerous studies in recent years [1-4]. Plants are constantly exposed to environmental changes or a biotic stresses such as lack, cold, high temperatures, orbiotic stress types (of the many xenobiotics used to fight against pests or other infections). These stresses are responsible for cell disruption, causing the release of free oxygen radicals in the cytoplasm [5,6], including the superoxide (O²⁻), hydroxyl radicals (OH[·]),radicals and peroxides(RO)and non-radical forms such as hydrogen peroxide (H₂O₂).These elements are produced in the reduction of oxygen by cytochrome respiratory chain. The chloroplast is the compartment of photosynthesis associated with high-energy electron transport, and thus a supply of oxygen, which can cause the formation of ROS (Reactive Oxygen Species) [7]. In case of excess, the increase off reeoxygen radical sincells causes irreversible cellular damage, such as lipid peroxidation. These ROS at high concentrations can be fatal to cells by impairing the functions and cellular structures. Plants, however, have developed a system of defense to self-protect against oxidative stress. So, cells had been developed an antioxidants enzyme systems to cope with cascades of reaction striggered by oxidative stress at the cellular level. Catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase are among the most involved detoxification enzymes [8]. In this work, we propose to evaluate the resilience of a plant model (durum wheat, *Triticum durum*), subjected to water stress by monitoring the activity of not only the antioxidant enzymes (CAT, APX, GPX) but also by localization of produced hydrogen peroxide(H₂O₂) in the medium.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Biological Material

Biological material used in this work was the roots and seeds of the hard wheat *Triticum durum Desf* GTA variety. The samples were received from the International Office of Algerian Cereals (CATO) El Hadjar, Annaba, Algeria.

2.2 Conduct of the Trial

The trials were led at the Cellular Toxicology Laboratory, University of Annaba, and the laboratory of Plants Cellular and Molecular Physiology, Pierre and Marie Curie, Paris VI, France University.

Seeding was carried out in plastic pots. After 4 days of germination, the seeds of wheat are submitted to water stress by stopping irrigation and wheat samples were analyzed at 3rd, 5th, 7th and 9th day after interruption of watering. Controls were watering normally.

Germination took place at day temperature of 21°C and 17-21°C at Night with artificial lighting from 6 am to 10 pm.

2.3 Roots Relative Turgidity in Water(RWT)

The relative turgidity in water was determined by the percentage of water present in the excised roots and immersed in water for 2 hours, depending on the method of Clark and Mc Caig [9], which was used by Rascio [10]. The calculation is done according to Ladigues [11].

2.4 Measurement of the Enzyme Activity

To obtain the enzyme extract of the durum wheat roots Loggni et al. [12] method was followed. The extract was used for the measurement of catalase activity (CAT) according to the method of Boscoloa et al. [13], as corbate-peroxidase (APX) according to the method of Manivannan et al. [14] and guaiacol-peroxidase (GPX) according to the method of Hiner et al. [15].

Fresh roots (1g) were ground with cold mortar in a phosphate buffer (50mlNaK, pH7.2) at a rate of 1ml buffer per1g of roots. The homogenate was then filtered and centrifuged cold 12000xg for 20 min (CentrifugeSigma3-16K). The obtained super natant was used for the determination of various enzymatic activities.

2.5 Localization of Hydrogen Peroxide H₂O₂

Intercellular ROS production was visualized using DCFH-DA (Molecular probe) [16] with a fluorescence microscope. The root was incubated in a buffer of 20 mM potassium phosphate (pH6) containing 50 microns DCFH-DA for 60min at 20°C in the dark. The samples were washed three times in the buffer solution. The images were taken (excitation: 480nm, emission: 525 nm) with a fluorescence microscope using a 05* numerical target. To compare the density of DCFH-DA, samples from different experimental conditions were set at the same time and analyze dunder a fluorescence microscope using the same experimental parameters.

2.6 Measurement of the Hydrogen Peroxide H₂O₂ Production

The roots were incubated in 250ml of buffer solution of potassium phosphate (20mM,pH6) containing 5μ Mscopoletin (Sigma) and1U/ml (final concentration) horse radish peroxidase at 25°C in the dark using a haker as described by Schopfer et al. [17]. H₂O₂ production was assessed by the decrease in fluorescence (excitation 346nm, emission 455nm) o the incubation medium and was converted into a molar concentration of H₂O₂ using a linear calibration curve. The results were expressed as mg fresh weight of roots.

3. RESULTS

3.1 Roots Relative Turgidity in Water (RWT)

Fig. 1 represents Roots Relative turgidity in Water (RWT), determined by the percentage of water present in the roots. A significant decrease in roots subjected to water stress was observed.

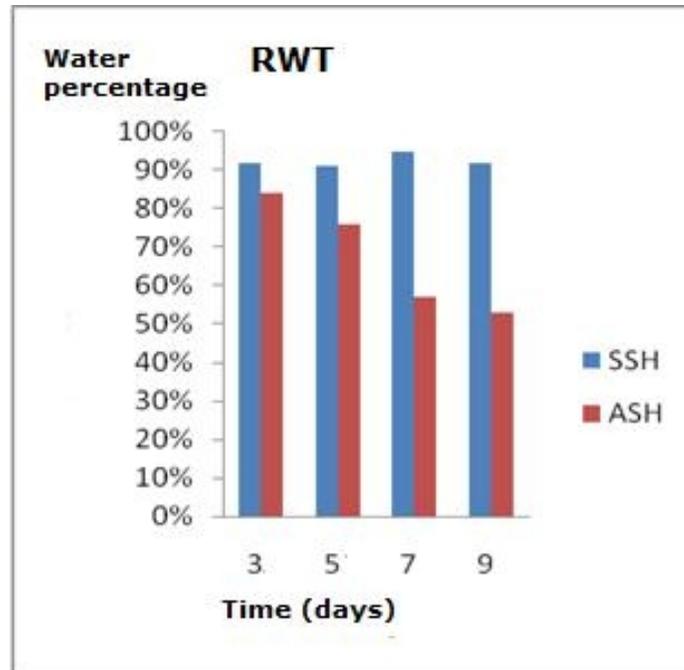


Fig. 1. Roots relative turgidity in water (%)
SSH without water stress. ASH: with water stress

3.2 Enzymatic Activities

The activities of catalase, as orbate peroxidase and guaiacol-peroxidase in seeds subjected to water stress (Table 1) showed a positive correlation between these verity of water stress and enzyme activity from the 3rd day.

Table 1. Effects of water stress on the activities of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (GPX) in the hard variety GTA seeds subjected to water stress

| Time (days) | 3d | 5d | 7d | 9d |
|-------------|------------|------------|------------|------------|
| SSH | 0.00679326 | 0.00656357 | 0.00637979 | 0.00661052 |
| CAT | | | | |
| ASH | 0.00543 | 0.01263091 | 0.02009793 | 0.0263769 |
| CAT | | | | |
| SSH | 0.02791878 | 0.02152284 | 0.01919705 | 0.03570803 |
| APX | | | | |
| ASH | 0.05908629 | 0.06608214 | 0.13758096 | 0.2551345 |
| APX | | | | |
| SSH | 0.01151846 | 0.00956 | 0.00997923 | 0.0103138 |
| GPX | | | | |
| ASH | 0.01767864 | 0.02453011 | 0.01353039 | 0.01094277 |
| GPX | | | | |

SSH: without water stress.

ASH: with water stress

3.3 Measurement and localization of Hydrogen Peroxide (H₂O₂)

The evolution of the average grade of H₂O₂ in the roots Fig. 2 showed as significant production of Hydrogen Peroxide from the 5th day, which tends to increase gradually as the stress level increases. Figs. 3 and 4 confirm the presence of H₂O₂ at the roots subjected to stress, visible as fluorescent granules (few root cells are highly vacuolated). In controls Fig. 3 no trace of H₂O₂ was observed.

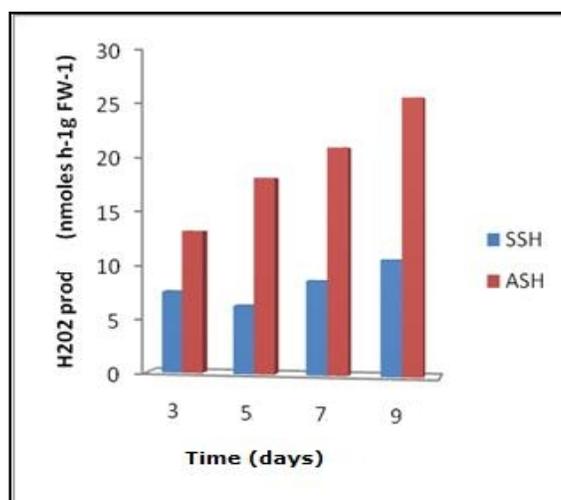


Fig. 2. Average content of hydrogen peroxide produced in the roots of durum wheat.

SSH: without water stress.

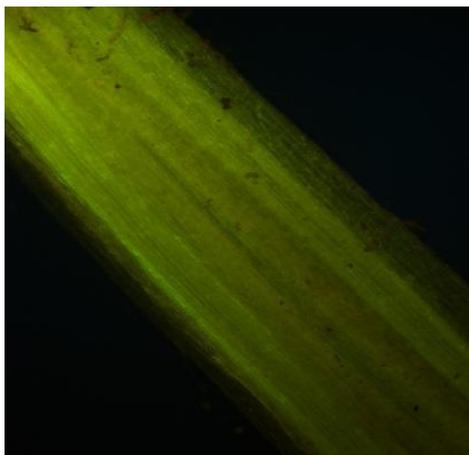


Fig. 3. H₂O₂ in controls.

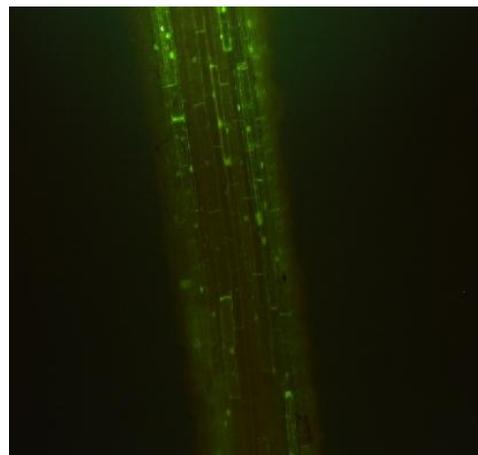


Fig. 4. Hydrogen Peroxide in stressed plants.

4. DISCUSSION

In our work, it was demonstrated that one of the consequences of water stress in roots of durum wheat, is the appearance of oxidative stress, causing the accumulation of reactive species oxygen species [18], proportional to the intensity of the induced stress.

Relative stability of H₂O₂ compared with other ROS and its ability to cross the membrane makes it suitable for signaling. It can induce the intracellular ROS scavenging system by activating the antioxidant enzymes and by modulating the expression of genes of these enzymes [19].

Faced with this attack, root cells synthesize a number of antioxidant enzymes that's cavenge these ROS. The results were demonstrated there spective increases in CAT activity, APX and GPX in stressed seeds [20].

Mitochondria are a major source of ROS in plants [21]. Nevertheless, the production of ROS from the mitochondria is variable depending on the involved organ and the environmental conditions (e.g. drought) [22].

Under normal physiological conditions, approximately 2% of the total oxygen consumed by mitochondria was converted to ROS [23-24]. The radical intermediates of ubiquinone formed by reducing the pool of ubiquinone by complex I and III of the Electron Transport Chain(ETC) are the main donors of electrons to oxygen.

ROS production close to CTE may cause membrane damage, leading to a further decrease in the efficiency of the CTE and greater loss of electrons. The result is an increase in the generation of ROS further decreasing efficiency of the CTE. When significant stress initiates the generation of ROS this can lead to deleterious production cycle. Mitochondrial Cycle of ROS generation is considered one of the main causes of cellular aging [26].

Undoubtedly, drought stress induces ROS generation as a primary response of plant and this may be mediated by hormones like ABA and ethylene as well, which may sometimes

play a downstream role too. Gross level of ROS could exacerbate the stress-induced damages to most of the cellular components unless compromised because of ROS scavenging by antioxidant system. However, depending on spatial and temporal ROS generation and scavenging (ROS management) responses can be characterized as toward conferring protection by arousing the protection system or as directly leading to injuries or death. Gradual imposition of drought stress, which is more common in nature, probably triggers ROS generation in the apoplast by plasma membrane-localized NADPH oxidase where Ca^{2+} plays a role as an upstream as well as downstream messenger forming a positive feedback loop. Apoplast is ideal site for initiation for signaling by ROS (localized oxidative burst) as this compartment has less redox buffering capacity, which could have otherwise diffused the signal strength. Efficiency for such an apoplast based ROS signaling system has already been appreciated in case of defense against pathogen (biotic stress). Now the fate of the cellular system subjected to water stress depends on whether intracellular ROS scavenging system, being stimulated by the ROS signal of extracellular origin, keeps the oxidative load low on the cellular components or a rapid intracellular ROS accumulation has taken over before defense system is put in place. This again depends on speed and magnitude of stress imposition as well as the plant system subject to the stress, the latter being variable genetically as regard to the chronology and propensity of ROS management toward orchestration of defense related changes under stress [27].

COMPETING INTERESTS

Authors have declared that No competing interests exist.

REFERENCES

1. Pitzschke A, Forzani C, Hirt H. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antioxidant Redox Signal*. 2006;8:9-10.
2. Wormuth D, Heiber I, Shaikali J, Kandlbinder A, Baier M, Dietz KJ. Redox regulation and Antioxidative defense in Arabidopsis leaves viewed from a systems biology perspective. *Journal of Biotechnology*. 2007;129:229-248.
3. Inze D, Montagu MV. *Oxidative Stress in Plants*. Ed. CRC; 2001.
4. Smirnoff N, Foyer C, Dietz K, Mittler R, Feierabend J, Grace S, Desikan R, Jones M, Vreeburg R, Logan B, Jaspers P. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Black well publishing; 2005.
5. Price A, Hendry G. The signification of the tocopherols in stress survival in plant. In: Evans CR (ed) *Free Radicals, Oxidant Stress and Drug Action*. Richelieu Press, London. 1998;443-450.
6. Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology*. 1998;49:249-279.
7. Asada K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 1999;50:601-639.
8. Meksem L. Études des effets de deux fongicides: LEFLAMMENC OS Cetele Tilt 250 EC sur la physiologie, la croissance et le métabolisme énergétique des racines de blé (*Triticum durum*). *DESF*. 2007;162:136-137.
9. Clark JM, Mc Caig JN. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop. Sci*. 1982;22:503.

10. Rascio A. Several mechanisms of water stress adaptation in durum wheat. *Gen. Agraria*. 1988;42:90.
11. Ladigues PY. Some aspects of tissue water relation in three populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. New York. *Phytol*. 1975;75:53-62.
12. Loggani B, Scartazza A, Brugnoli E, Navari-Izzo F. Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiology*. 1999;119:1091-1099.
13. Boscoloa P, Menossib M, Renato Jorgea A. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry*. 2003;62:181-189.
14. Manivannan P, Abdullaleel C, Kishoch Kumar A, Saukar B, Somasundaram R, Sridharam R, Panneersel R. Changes in antioxidant metabolism of *Vigna unguiculata* (L.) Walp by propiconazole under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2007;57:69-74.
15. Hiner A, Ruiz J, Lopez JN, Arnao MB, Raven EI, Canovas FG, Ascota M. Kinetic study of the Ascorbate-peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochem. J*. 2002;348:321-328.
16. Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner L, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C. The mechanism involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravels the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol*. 2009;150:494-505.
17. Schopfer P, Plachy C, Frahy G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellins, and abscisic acid. *Plant Physiol*. 2001;125:1591-1602.
18. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 2004;55:373-399.
19. Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signaling. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2002;5:388-395.
20. Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M. Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*. 2006;127:343-352.
21. Bailly C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res*. 2004;14:93-107.
22. Foyer CH, Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 2003;119:355-364.
23. Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*. 1973;134:707-716.
24. Moller IM. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2001;52:561-591.
25. Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN. Mitochondrial Reactive Oxygen Species. Contribution to Oxidative Stress and Interorganellar Signaling. *Plant Physiology*. 2006;141:357-366.

26. Loeb LA, Wallace DC, Martin GM. The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somaticmt DNA mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102:18769-18770.
27. Kar RK. Plant responses to water stress (Role of reactive oxygen species). 2011;6(11):1741-1745.

© 2014 Ghozlene et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Peer-review history:

The peer review history for this paper can be accessed here:

<http://www.sciencedomain.org/review-history.php?iid=382&id=32&aid=2929>