



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث 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 DIPLÔME DE DOCTORAT
OPTION: SANTE ENVIRONNEMENTALE

Intitulé

**Stratégies de défense observées chez le blé comme
réponse à l'induction d'un stress oxydatif**

Présentée par : M^{elle} YAICHE Fatma

Membres de jury:

Pr. OUALI Kheireddine	Président	Université Badji Mokhtar Annaba
Dr. SBARTAI Hana	Directeur de thèse	Université Badji Mokhtar Annaba
Pr. BOURDJIBA Ouahiba	Examineur	Université Badji Mokhtar Annaba
Pr. BRINIS Louhichi	Examineur	Université Badji Mokhtar Annaba
Pr. BENSAID Rabah	Examineur	Université 20 Aout 55, Skikda.

Année Universitaire: 2016/2017

Remerciements

Je remercie "Allah" le tout puissant de m'avoir donné la force pour la réalisation de ce travail.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur OUALI kheir-eddine (Directeur de Laboratoire de Biomonitoring Environmental, université d'Annaba) pour avoir, bien voulu me faire l'honneur de présider ce jury. Et pour la disponibilité et tout le soutien et l'aide qu'il a bien voulu m'apporter durant ces longues années.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Dr. SBARTAI Hana, qui m'a fait confiance en me proposant un sujet aussi important et qui a mis à ma disposition tous les moyens et les ressources nécessaires à sa réalisation durant ces quatre 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 Madame.

J'exprime mon estime et mes remerciements aux honorables membres de jury ; Je remercie Madame BOURDJIBA Ouahiba et Monsieur BRINIS Louhichi, Professeurs à l'Université Badji Mokhtar Annaba, Monsieur BNSAID Rabah, Professeur à l'Université 20 Aout 55 Skikda, qui m'ont fait l'honneur de juger et d'examiner ce travail.

Je remercie Dr. SBARTAI Ibtissem de l'université d'Annaba pour ses précieux conseils et ses encouragements.

J'aimerais remercier toute l'équipe de l'institut national de protection des végétaux (INPV), pour leur accueil très chaleureux et leur aide et gentillesse, particulièrement Mofida, Fouzia, et Mourad.

Madame FARAH Wafa (technicienne au laboratoire de physiologie végétale) n'a jamais réservé aucun effort pour m'aider, je la remercie.

Je tiens à remercier tous les responsables et les personnels des laboratoires qui m'ont aidée à réaliser mes expériences, surtout Nadia, Nissa, Sihem, Chahira, Wafa, Meriem, Bessma, et khawla

Un grand merci à Mademoiselle Amrane Choumaïssa, pour son aide, et surtout sa gentillesse.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités nommément et qui ne sont pas moins importants.

Mes derniers remerciements s'adressent à ma famille. Merci pour leur soutien sans faille.

Merci infiniment.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A la mémoire de mon père que Dieu repose son âme en paix. Papa, je te dédie ce travail en témoignage de mon profond respect.

A ma mère, la prunelle de mes yeux, l'exemple de tendresse, de patience et d'amour éternel.

A mon oncle « Mokhtar » qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les grands et qui a attendu avec patience les fruits de sa bonne éducation, que dieu le protège et lui donne une vie pleine de réussite et de bonheur.

A sa femme Hafssa et ses enfants, Asma, Lamine, Youssef, et Rahmoun.

A ma chère sœur Hadjira, pour leur aide, et compréhension, à mes frères Raouf, Walid et sa femme Kenza, et ses enfants Abdellah et Abd El.Wadoud

A mon époux Zinou, et ma belle-famille, mon beau-père, ma belle-mère, Imen, Sara, Hichem.

A mes amies, Meriem, khadidja, Zahra, Amina, Hawa, Imen, Asma, Klthoum, Selma, Asma, Marwa, Hasina, Nadia, Merci d'être présentes dans ma vie.

A tous mes amies de l'université, et à tous les gens qui m'admirent, je dis merci pour tous.



À la mémoire de Mon Cher papa

« Abd-ellah »

La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance.

Claude Bernard

*Biologiste, Médecin, Physiologiste,
Scientifique (1813 - 1878)*

Tout est poison et rien n'est sans poison; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison.

*Sieben defensiones (1537) de
Paracelse*

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des symboles et abréviations

Résumé

Résumé Arabe

Abstract

Chapitre I : Contexte Bibliographique

1. Le Blé dur

1.1. Présentation botanique.....	p15
1.2. Origine géographique du blé dur.....	p16
1.3. Cycle de vie du blé dur.....	p16
1.4. Importance et production dans le monde.....	p17
1.5. Importance et Situation actuelle en Algérie	p18
1.6. Caractéristiques de quelques maladies du blé	p19
1.6.1. Les Pourritures racinaires.....	p20
1.6.2. Les Rouilles.....	p21
1.6.3. La septoriose (<i>Septoria tritici</i>)	p22
1.6.4. L'oïdium (<i>Erysiphe graminis</i>)	p22
1.6.5. La tache auréolée (<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>).....	p22

2. Pollution des sols agricoles

2.1. Origine et sources de pollution.....	p26
2.1.1. Naturelle.....	p26
2.1.2. Anthropique.....	p26
2.2. Contamination des sols par les éléments traces métalliques (ETM).....	p27
2.3. Les ETM dans la plante.....	p28
2.4. Le Cuivre.....	p28
2.4.1. L'apoplasme, voie principale d'adsorption de Cu^{2+}	p30
2.4.2. Absorption du cuivre Cu^{+} par la voie symplasmique.....	p30
2.4.3. Translocation du cuivre vers les parties aériennes.....	p31
2.4.4. La toxicité du Cuivre.....	p33
2.4.4.1. Rhizotoxicité.....	p33
2.4.4.2. Déficience induite en fer et chloroses.....	p34
2.4.5. Tolérance.....	p35

3. La résistance naturelle des plantes

3.1. Perception des stress abiotiques.....	p36
3.2. Perception de l'agent pathogène.....	p36
3.2.1. La reconnaissance par les éliciteurs généraux.....	p37
3.2.2. La reconnaissance spécifique.....	p38
3.3. La signalisation	p40
3.3.1. Les flux ioniques et la dépolarisation membranaire.....	p40
3.3.2. Les différentes MAP kinases.....	p41
3.3.3. Phosphorylation/déphosphorylation des protéines.....	p43
3.3.4. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)	p43
3.4. Les réactions de défenses.....	p45
3.4.1. La réaction d'hypersensibilité (RH).....	p45
3.4.2. Le renforcement des parois cellulaires.....	p46
3.4.3. Synthèse de métabolites secondaires.....	p47
3.4.4. La synthèse de protéines PR.....	p47
3.4.5. Autres Réponses de défense lors d'un stress métallique.....	p48
3.5. Les molécules de signalisation	p49
3.5.1. L'acide salicylique (AS)	p50
3.5.2. L'acide jasmonique (AJ).....	p51
3.5.3. L'éthylène (ET).....	p52
3.5.4. Les autres molécules de signalisation	p53
3.5.5. Interconnexions entre les voies de signalisation	p55
3.6. Les résistances systémiques.....	p55
3.6.1. La SAR.....	p56
3.6.2. L'ISR.....	p57

4. Dynamique des ROS dans les cellules végétales

4.1. La toxicité de l'oxygène : les espèces réactives de l'oxygène.....	p57
4.2. Production de ROS.....	p58
4.2.1. Formation de ROS dans les chloroplastes.....	p59
4.2.2. Formation de ROS dans les mitochondries.....	p60
4.2.3. Formation de ROS dans les peroxysomes.....	p60
4.2.4. Formation de ROS dans le réticulum <i>endoplasmique</i>	p61
4.3. Production de ROS dans les interactions cellule-environnement.....	p62

4.3.1. Production de ROS dans les interactions biotiques.....	p62
4.3.2. Dynamique des ROS en situation de stress abiotique.....	p63
4.4. Dualité fonctionnelle des ROS.....	p64
4.4.1. Toxicité des ROS.....	p65
4.4.1.1. Oxydation des acides nucléiques.....	p65
4.4.1.2. Oxydation des lipides.....	p65
4.4.1.3. Oxydation des protéines.....	p67
4.4.1.4. Marqueurs biochimiques du stress oxydatif.....	p67
4.4.2. Implication des ROS dans les processus de transduction de signal.....	p68
4.4.2.1. Régulation de l'expression des gènes par les ROS.....	p68
4.4.2.2. Mécanismes de transduction des signaux ROS.....	p68

5. Mécanismes de régulation et de détoxification des ROS

5.1. Molécules antioxydantes.....	p70
5.2. Voies métaboliques antioxydantes.....	p71
5.2.1. Superoxyde dismutase.....	p71
5.2.2. Catalase.....	p71
5.2.3. Enzymes du cycle de Halliwell-Asada.....	p72
5.2.4. Glutathion-peroxydase.....	p73
5.2.5. Autres mécanismes impliqués dans les défenses antioxydantes.....	p73

6. Objectif de la thèse

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Présentation du matériel biologique.....	p77
2. L'agent pathogène étudié.....	p77
2.1. Site d'échantillonnage.....	p78
2.2 Méthode d'échantillonnage.....	p78
3. Le traitement étudié (cuivre).....	p79
3.1 Conduite de l'essai.....	p79
3.2. Le dispositif expérimental.....	p79
3.3. La fertilisation.....	p80
4. Techniques analytiques.....	p80
4.1. Paramètres physiologiques.....	p80
4.1.1. Teneur en eau des feuilles.....	p80

4.1.2. Dosage des chlorophylles.....	p81
4.2. Paramètres biochimiques.....	p81
4.2.1. Dosage des protéines totales	p81
4.2.2. Dosage de la proline.....	p82
4.2.3. Dosage des sucres totaux	p82
4.2.4. Dosage de lipides.....	p83
4.3. Les Biomarqueurs enzymatiques.....	p83
4.3.1. Préparation de l'extrait enzymatique.	p83
4.3.2. Dosage l'activité Ascorbate-peroxydases	p84
4.3.3. Dosage de l'activité catalase	p85
4.3.4. Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase	p85
4.4. Les Biomarqueurs non enzymatiques.....	p85
4.4.1. Le Glutathion (GSH)	p85
4.4.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)	p85
5. Analyse statistique des données	p86

Chapitre III : Résultats

1. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur teneur en eau des feuilles.....	p88
2. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur le taux des chlorophylles.....	p89
3. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur la teneur en protéines totales.....	p91
4. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur la teneur en proline.....	p92
5. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur le taux des sucres totaux.....	p93
6. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur le taux des lipides.....	p95
7. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur l'Activité APX.....	p96
8. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur l'Activité CAT.....	p97
9. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur l'Activité GST.....	p98
10. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur le taux de Glutathion.....	p100
11. Effet de la tache auréolée et du sulfate de cuivre sur le taux de MDA.....	p101

Chapitre IV : Discussion

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

N° de Figure	Titre de Figure	N° de Page
Fig. 1	Conidies de <i>tritici-repentis</i>	23
Fig. 2	Cycle de développement de la tache auréolée	23
Fig. 3	L'importance des maladies du blé en Algérie	24
Fig. 4	Transporteurs membranaires du cuivre impliqués dans l'absorption racinaire	31
Fig. 5	Différents chélateurs et transporteurs cupriques impliqués au niveau cellulaire	32
Fig. 6	La reconnaissance par les éliciteurs généraux	38
Fig. 7	La reconnaissance spécifique	39
Fig. 8	Les flux ioniques	41
Fig. 9	Voie de signalisation des MAPKs	42
Fig. 10	Voie de signalisation par l'H ₂ O ₂ chez les plantes.	44

Fig. 11	Voie de biosynthèse de l'acide salicylique chez <i>A. thaliana</i> .	51
Fig. 12	Structure de l'éthylène, acide jasmonique, méthyle-jasmonate (MeJa) et acide salicylique.	51
Fig. 13	Voie de biosynthèse de l'éthylène	52
Fig. 14	Comparaison des deux formes de résistance induite caractérisées chez les plantes	56
Fig. 15	Réactions du cycle de peroxydation lipidique	66
Fig. 16	Formation de radicaux hydroxyles par la réaction de Haber-Weiss	71
Fig. 17	Réactions centrales de la dégradation du H ₂ O ₂ par le cycle de Halliwell-Asada	72
Fig. 18	Action antioxydante des glutathion-peroxydases	73
Fig. 19	Le site d'échantillonnage	78
Fig. 20	Niveau de l'atteinte des plants de blé par la maladie	78
Fig. 21	Effet de la tache auréolée sur la teneur en eau des feuilles de blé.	88
Fig. 22	Effet du cuivre sur la teneur en eau des feuilles de blé	89

Fig. 23	Effet de la tache auréolée sur la teneur en protéines chez les feuilles de blé	91
Fig. 24	Effet du cuivre sur la teneur en protéines chez les feuilles de blé	92
Fig. 25	Effet de la tache auréolée sur la teneur en proline chez les feuilles de blé	92
Fig. 26	Effet du cuivre sur la teneur en proline chez les feuilles de blé	93
Fig. 27	Effet de la tache auréolée sur le taux des sucres totaux chez les feuilles de blé.	94
Fig. 28	Effet du cuivre sur le taux des sucres totaux chez les feuilles de blé	94
Fig. 29	Effet de la tache auréolée sur le taux des lipides chez les feuilles de blé	95
Fig. 30	Effet du cuivre sur le taux des lipides chez les feuilles de blé	95
Fig. 31	Effet de la tache auréolée sur l'activité APX chez les feuilles de blé	96
Fig. 32	Effet du cuivre sur l'activité APX chez les feuilles de blé	97
Fig. 33	Effet de la tache auréolée sur l'activité CAT chez les feuilles de blé	97
Fig. 34	Effet du cuivre sur l'activité CAT chez les feuilles de blé	98

Fig. 35	Effet de la tache auréolée sur l'activité GST chez les feuilles de blé	99
Fig. 36	Effet du cuivre sur l'activité GST chez les feuilles de blé	99
Fig. 37	Effet de la tache auréolée sur le taux de GSH	100
Fig. 38	Effet du cuivre sur le taux de GSH chez les feuilles de blé	100
Fig. 39	Effet de la tache auréolée sur le taux de MDA chez les feuilles de blé	101
Fig. 40	Effet du cuivre sur le taux de MDA chez les feuilles de blé	102

Liste des tableaux

N° du Tableau	Titre des Tableaux	N° de Page
01	Cycle de développement du blé	16
02	Représentation du bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de blé sur le marché mondial	17
03	Conditions favorisant de développement des maladies foliaires du blé	20
04	Rôles et localisations subcellulaires des principales molécules antioxydantes	70
05	Classification du blé dur d'après Feillet	77
06	Protocole expérimental de l'essai	79
07	Effet de la tache auréolée (a) et de cuivre (b) sur la chlorophylle <i>a</i> , <i>b</i> et <i>a+b</i>	90

Liste des symboles et abréviations

- **T** : Témoin.
- **C1** : la première concentration.
- **C2** : la deuxième concentration.
- **C3** : la troisième concentration.
- **DO** : Densité optique.
- **F** : Faible contamination.
- **M** : Moyenne contamination.
- **G** : grave contamination.
- **OAIC** : Office Algérien Inter Professionnel des Céréales.
- **TEF** : La teneur en eau au niveau des feuilles.
- **V** : **Variété** : Siméto.
- **Cu** : Cuivre.
- **R** : répétition.
- **Chl** : chlorophylle.
- **BBC** : Bleu brillant de Comassie.
- **BSA** : Sérum d'albumine de bovin.
- **MDA** : malondialdéhyde.
- **CAT** : Catalase.
- **GSH** : Glutathion.
- **APX** : Ascorbate-peroxydases.
- **GST** : Glutathion-S-Transférase

- **FAO** : Food and Agriculture Organization
- **INSID** : L'Institut National des Sols de l'Irrigation et du Drainage
- **JRC MARS** : Joint Research Center/Monitoring Agricultural Resources
- **INPV** : l'Institut National de la protection des végétaux
- **CECR** : capacité d'échange cationique racinaire
- **MTs** : métallothionéines
- **PCs** : phytochélatines
- **PS** : phytochélatine synthase
- **PTTE** : Élément Trace Potentiellement Toxique
- **NPT** : non proteine thiol content
- **UV** : ultraviolets
- **MAMPs** : microbial-associated molecular patterns
- **DAMPs** : damage-associated molecular patterns
- **ETI** : Effector-Triggered Immunity
- **HR** : réponse hypersensible
- **ETS** : Effector-Triggered Susceptibility
- **MAPKs** : Mitogen-Activated Protein Kinases
- **PR** : pathogenesis-related
- **ROS** : Réactive Oxygen Spécies
- **NADPH-oxydases** : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
- **PCD** : mort cellulaire programmée
- **LTP** : Lipid Transfer Protein
- **ABA** : L'acide abscissique

- **BR** : les brassinostéroïdes
- **CR** : les cytokinines
- **GA** : les gibbérellines
- **SAUR** : small auxin up RNA
- **OPDA** : acide 12-oxo-phytodienoïque
- **ACC** : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
- **O₂^{•-}** : le radical superoxyde
- **OH[•]** : le radical hydroxyle
- **ROO[•]** : les peroxydes
- **RO[•]** : les alkoxydes
- **MS** : Matière en suspension
- **Onfaa** : Observation National des Filières Agricoles et Agroalimentaires

Résumé

La plante, comme tout organisme vivant, est influencée durant toute sa vie par les conditions climatiques et non climatiques du milieu. Ces conditions, vont lui assurer soit un environnement favorable à la croissance et au développement, soit la soumettre à des facteurs de stress abiotiques ou biotiques qui vont perturber son métabolisme. L'objectif essentiel de notre étude consiste à comprendre les stratégies adaptatives de la plante vis-à-vis le stress biotique et abiotique, provoqué par l'agent pathogène d'une maladie cryptogamique «la tache auréolée» et/ou un métal lourd : Le Cuivre. Dans ce contexte, un échantillonnage des plantes infestées (*Triticum durum*. Desf., var. Siméto) a été réalisé afin d'évaluer sa toxicité en fonction de la gravité de la contamination qui est déterminée selon le nombre de tâches présentent sur les feuilles (non contaminées, faible, moyenne, et grave contamination) pour le stress biotique et en fonction des concentrations croissantes du sulfate de cuivre (0, 200, 400, 800 μ M) pour le stress métallique. Les résultats obtenus montrent un effet toxique, qui se manifeste par une diminution de la teneur en eau des feuilles, une forte augmentation du taux de protéines, de proline, de sucres totaux et du MDA et une diminution du taux des lipides et du glutathion, Ainsi une perturbation du taux de chlorophylle *a*, *b* et *a+b*. En revanche, une induction très significative des activités enzymatiques (CAT, APX et GST) intervenant dans le système de défense de la plante. L'ensemble de ces résultats met en évidence la présence d'un stress oxydatif généré par les deux types de stress.

Mots clés : *Triticum durum* Desf, *Pyrenophora tritici-repentis*, Sulfate de cuivre, Burst Oxydatif, Biomarqueurs de stress

ملخص

النبات، مثله مثل أي كائن حي، يتأثر طوال حياته بالعوامل الجوية و غير الجوية للوسط الذي يعيش فيه. هذه العوامل توفر له إما وسط معيشي ملائم لنموه و تطوره و إما قد تعرضه لهجمات و اقتحامات حية و غير حية التي تؤدي الى اضطرابات في جهازها الوظيفي. الهدف الرئيسي لعملنا هذا هو معرفة كيف يتأقلم النبات و ما هي الاستراتيجيات المتبعة من قبله للتأقلم مع هذه الاقتحامات، الناجمة عن العامل الممرض ل الداء اللالزهي "البقعة الهلمنتسبورية" و/او المعدن الثقيل النحاس. في هذا السياق، قمنا بأخذ مجموعة عينات للنباتات المصابة بالمرض (النبات : القمح الصلب. النوعية : سيميطو) لمعرفة مدى سميته بدلالة مدى الإصابة بالمرض (عدم الإصابة، إصابة خفيفة، إصابة متوسطة، إصابة جسيمة)، هذا بالنسبة للاقتحامات الحية أما بالنسبة للاقتحامات الغير حية فقد قمنا بمعالجة نباتات القمح بنسب متفاوتة من كبريتات النحاس (0, 200 , 400, 800 ميكرو مول). النتائج المتحصل عليها تثبت لنا ان هناك اثر سمي، الذي تمثل في، انخفاض نسبة ماء الأوراق، ارتفاع نسبة البروتينات، البرولين، السكريات، و المألونألدهيد. و انخفاض في نسبة الليبيد و القلوتاتيون، و أيضا اضطرابات في نسبة اليخضور أ، ب و أ+ب و وجدنا ايضا ارتفاع ملحوظ نشاط الإنزيمات المتدخلة في نظام الحماية لدى النبات. كل هذه النتائج تؤكد لنا وجود أكسدة، ناجمة عن الاقتحامين المدروسين.

الكلمات المفتاحية : القمح الصلب , البقعة الهلمنتسبورية , كبريتات النحاس , أكسدة , مؤشرات الإجهاد.

Abstract

The plant, like any living organism, is influenced throughout its life by the climatic and non climatic conditions of the environment. These conditions, will ensure either a favorable environment to growth and development, either subjected to abiotic or biotic stressors which will disrupt its metabolism. The main objective of our study is to understand adaptative strategies of the plant with respect to biotic and abiotic stress, caused by the pathogenic agent of a cryptogamic disease « aureole spot » and/or a heavy metal : copper. In this context a sampling the infested plants (*triticum durum*. Desf, variety. Siméto) have been realised to determine its toxicity according to the severity of the contamination which is determined according to the number of spots on the leaves (non contaminated, low, average, serious contamination) for biotic stress and as function of the increasing concentrations of copper sulphate (0, 200, 400, 800 μM) for metallic stress. The results obtained show a toxic effect, which is manifested by a decrease in the water content of the leaves, a sharp increase in protein levels, of proline, of total sugars, and MDA and decreased lipid levels and of glutathione, thus a disruption of chlorophyll *a*, *b*, and *a+b*. on the other hand, a very significant induction of the enzymatic activities (CAT, APX, GST) intervening in the system of defense of the plant. All these results highlight stress generated by the two types of stress.

Keywords : *Triticum durum* Desf, *Pyrenophora tritici-repentis*, Copper sulfate, Oxidative burst, Stress biomarkers.



CONTEXTE BIBLIOGRAPHIQUE

Les plantes sont au cours de leur vie constamment confrontées à différents types de stress influant sur leur croissance et par conséquent leur développement. Plus une plante est capable de mettre en place des mécanismes de défense rapides et appropriés, moins le stress aura de conséquences sur la santé de la plante (Rémus-Borel, 2007). La plupart des maladies des plantes cultivées, sont dues aux champignons microscopiques, ces derniers détruisent chaque année une bonne partie des récoltes mondiales (Nasraoui., 2006). La situation actuelle des maladies en Algérie, au niveau des champs de blé dur, a été caractérisée par la prédominance de la rouille brune (*Puccinia recondita*), et la tache auréolée (*Pyrenophora tritici-repentis*) (Benbelkacem et Bendif, 2010). La reconnaissance de ces maladies ainsi que leurs moyens de lutte restent des outils importants pour une meilleure maîtrise de ces contraintes et une amélioration de la productivité par la suite (Aouali et Douici-Khalfi, 2009).

Tout comme les animaux, les plantes sont capables de reconnaître le non-soi et le soi modifié, ainsi que d'induire des mécanismes de défense en réponse aux attaques d'agents pathogènes (Nürnberg & Kemmerling, 2009). Il existe deux types de défense des plantes ; constitutive et inductible. Le premier peut être d'origine biochimique ou morphologique. (Gravot, 2009), il est présent à tout moment du développement de la plante, il est constitué par un ensemble de structures physiques ou barrières chimiques qui permettent de contrer la pénétration et le développement des bio-agresseurs (Klarzynsk et Fritig, 2001). Le second type de défense regroupe un ensemble de défenses induites ; La perception de l'agent pathogène va conduire à l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire (Boller & Felix, 2009).

Les événements de signalisation cellulaire précocement induits suite à la reconnaissance du microorganisme sont plus généralement étudiés via les éliciteurs (Zhao et al, 2005 ; Hofius et al, 2007). Parmi ces événements figurent la production de phytohormones comme l'acide salicylique et surtout des modifications de la perméabilité de la membrane plasmique manifestées par des influx de Ca^{2+} , des efflux de K^+ et d'anions, (Garcia-Brugger et al, 2006). Ces flux d'ions peuvent agir en amont d'autres événements cellulaires, en particulier une production d'espèces réactives à

l'oxygène (ROS), telles que l'anion superoxyde O_2^- et H_2O_2 , ainsi qu'une cascade de phosphorylation impliquant des protéines kinases (Sbartai et al, 2015). L'ensemble de ces réactions va engendrer une reprogrammation de l'expression de gènes, plus particulièrement des gènes de défense, afin de mettre en place des réponses de défense adaptées (Dubreuil, 2010).

En plus des agressions causées par des organismes vivants, les plantes sont exposées à des variations environnementales induites dans la plupart des cas par les activités humaines. Les éléments traces métalliques sont considérés parmi les éléments les plus dangereux pour les organismes vivants et en particulier pour les plantes qui sont directement exposées à ces éléments dont le potentiel toxique est indéniable. L'exposition à la toxicité des métaux lourds est devenue un facteur limitant majeur dans la croissance et le rendement des plantes cultivées, affectant la durabilité de la production agricole et menaçant la sécurité alimentaire. La toxicité des métaux lourds retarde la croissance des plantes en marginalisant les fonctions cellulaires des protéines, des lipides et des composants élémentaires des membranes des chloroplastes (Sharma et al, 2003 ; Scocinati et al, 2006). Parmi ces métaux, le cuivre est considéré comme un oligo-élément nécessaire aux fonctions métaboliques et au développement de la plante (Burkhead et al, 2009). Il existe sous de multiples formes redox grâce à sa faculté d'échanger des électrons depuis son orbite. Ce métal est un cofacteur dans la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie et le chloroplaste (Palmer et Guerinot, 2009). Il est aussi défini comme un Élément Trace Potentiellement Toxique, comme tout élément essentiel au développement de la plante, il peut induire des symptômes de toxicité (réduction de la biomasse, inhibition de la croissance racinaire, chlorose, perte de l'intégrité du chloroplaste, etc.), à des expositions supérieures à son homéostasie cellulaire. Sa toxicité vient en premier de sa contribution à la production des ROS tels les superoxydes (O_2^-), les radicaux hydroxyles (HO^\bullet) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). (Marschner, 2011 ; Azzizi et al, 2016).

1. BLE DUR

Dans tous les pays du monde, les céréales, originaires d'Orient, constituent la base de l'alimentation humaine en tant que sources protéiques et énergétiques. L'homme désignait autrefois sous le vocable «blé» toute céréale comestible. Les romains remplacèrent le terme «froment», pour être à nouveau appelé « blé » (Boudreau et Ménard., 1992). Aujourd'hui encore, le blé conserve l'image de la fécondité, de la fertilité et de la prospérité et reste la céréale la plus cultivée au monde. Le blé est à la base de la nourriture de l'homme (Ruel, 2006), c'est une espèce connue depuis la plus haute antiquité, dont il constitue la base alimentaire des populations du globe (Yves et de Buyer, 2000).

1.1. Présentation botanique

Le blé a d'abord été récolté à l'état sauvage puis cultivé depuis le néolithique dans le «croissant fertile» (actuels Liban, Syrie, Sud de la Turquie) où subsistent à ce jour des blés sauvages. Le blé, issu de la famille botanique des Poacées, est cultivé depuis la Préhistoire. Un premier croisement accidentel, survenu il ya 10 000 ans, entre un blé sauvage (*Triticum monococcum*) et une herbe (*Aegilops speltoides*), a donné naissance à un blé dur (*Triticum turgidum*) (Brink et Belay, 2006).

Les céréales telles que le blé et l'orge sont des cultures annuelles qui appartiennent à la famille des graminées. Le blé dur et le blé tendre appartiennent au genre *Triticum*, et l'orge appartient au genre *Hordeum*. Selon la classification la plus utilisée, les espèces du genre *Triticum* se divisent en trois groupes :

Le groupe des diploïdes ($2n = 14$ chromosomes) : Parmi les espèces cultivées appartenant à ce groupe, on distingue *Triticum monococcum* ou engrain.

Le groupe des tétraploïdes ($2n = 28$ chromosomes) : Les espèces appartenant à ce groupe sont, *Triticum diccoides*, *Triticum dicoccum*, *Triticum turgidum*, *Triticum polonicum* et *Triticum durum* ou blé dur.

Le groupe des hexaploïdes ($2n = 42$ chromosomes) : Les espèces appartenant à ce groupe sont, *Triticum spelta*, *Triticum compactum* et *Triticum aestivum* ou blé tendre. (Boulal et al., 2007).

1.2. Origine géographique du blé dur

Le moyen orient serait le centre géographique d'origine, à partir duquel, l'espèce *Triticum durum* s'est différenciée dans trois centres secondaires différents qui sont le bassin occidental de la Méditerranée, le sud de la Russie et le Proche Orient. Chaque centre a donné naissance à des groupes de variétés botaniques, possédant des caractéristiques phénologiques, morphologiques et physiologiques spécifiques (Lev-Yadun et al., 2000). L'Afrique du Nord est considérée comme centre secondaire d'après la classification de l'espèce (Feldman, 2001).

1.3. Cycle de vie du blé dur

Le cycle évolutif du blé se divise en trois grandes périodes, la période de végétation, la période de reproduction, et la période de maturation.

Tableau 1 : Cycle de développement du blé (Jacques, 1970)

Période	Phase	Date	Phénomène
Période de végétation	Germination – levée	15 Oct-15Déc.	Sortie de la première feuille.
	Levée - tallage	Jan-Fév.	3 feuilles, 5-6 racines primaires, Formation du plateau tallage, Développement des racines secondaires, Application de la première ébauche d'épillet.
	Tallage – montaison	Mars - Avril	Formation des talles herbacées.
Période de reproduction	Montaison	Avril - Mai	Formation de matière sèche et talles épis
	Epiaison	Mai - Juin	Différenciation des stigmates, Organisation détaillée des épillets, Fécondation – floraison.
	Maturation des ovules	Juin	Grossissement des grains, Jaunissement de la plante, Elaboration de matière sèche.
Période de maturation	Maturité	25 Juin- 10 Juillet	Gonflement du grain, dessiccation, récolte.

1.4. Importance et production dans le monde

Les prévisions actuelles de la FAO pour 2017 font entrevoir une production mondiale de céréales de 2,594 milliards de tonnes, soit une baisse de 5 millions de tonnes par rapport aux estimations de mai et un recul de 14,1 millions de tonnes (0,5%) en glissement annuel. La baisse mensuelle s'explique principalement par de moins bonnes perspectives en ce qui concerne les céréales secondaires et, dans une moindre mesure, le riz.

En effet, la production du blé dans le monde est en hausse au mois de février par rapport aux prévisions du mois de janvier 2016 (1 million de tonnes), soit une hausse de +3 millions de tonnes, en Turquie, en Russie et en Australie et une baisse en Inde de 2,4 millions de tonnes. De même, la production mondiale de blé dur en 2015/16 au cours du mois de février 2016 est en hausse de 1,7 million de tonnes par rapport au mois de janvier de la même année, atteignant 39,7 millions de tonnes, un bond de 15% par rapport au résultat de l'année précédente. Les stocks des quatre principaux exportateurs (Canada, États-Unis, Mexique et Union Européenne) devraient grimper d'environ un tiers, à 3,4 millions de tonnes (Onfaa, 2016a).

Tableau 2 : Représentation du bulletin de la FAO sur l'offre et la demande de blé sur le marché mondial (Anonyme 1, 2017).

Marché mondial du blé						
	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17 estimation	2017/18 prévision	
					précédente (04 mai 2017)	dernière (08 juin 2017)
(..... millions de tonnes))						
Production	711.4	730.7	735.7	760.1	740.4	743.2
Disponibilités	885.2	916.5	939.8	983.9	980.0	990.6
Utilisation	691.5	713.6	711.1	731.3	731.0	728.3
Commerce	158.2	156.6	166.7	174.0	170.0	171.0
Stocks de clôture'	185.8	204.1	223.8	247.5	247.6	257.4
(..... pour cent))						
Rapport stocks mondiaux- utilisation	26.0	28.7	30.6	34.0	32.8	34.2
Rapport stocks des principaux exportateurs- utilisation totale	14.9	16.7	16.7	20.1	19.1	18.5

1.5. Importance et situation actuelle en Algérie

Le blé dur (*Triticum durum*) occupe une place importante en Afrique du Nord et particulièrement en Algérie puisqu'il constitue une grande partie de l'alimentation de l'humanité, d'où son importance économique. En effet, les grains de blé dur donnent de la semoule pendant la mouture, cette semoule est valorisée dans la fabrication des pâtes alimentaires (Jeantet et *al.*, 2006). De plus, on utilise aussi cette céréale pour la production de couscous et des pains traditionnels (la galette) (Feillet, 2000).

Le blé dur est la première céréale cultivée dans le pays. Elle occupe annuellement plus d'un million d'hectares. La production nationale en blé dur est encore faible, elle ne couvre que 20 à 25 % des besoins du pays, le reste étant importé. La cause principale de la faiblesse de la production du blé dur en Algérie est le faible niveau de productivité (rendement) obtenu, soit 9 à 11 quintaux/hectare. Cette faible productivité est elle-même due à des contraintes abiotiques (pluviométrie surtout), biotiques (adventices surtout) et humaines (itinéraires techniques appliqués etc...) (Chellali, 2007). Il est à signaler que les valeurs d'importations du blé dur ont tendance à la baisse où les importations des deux premiers mois de l'année 2016 ont atteint 208.619,8 tonnes (74,6 millions USD) contre 323.626 tonnes (132,3 millions USD) en 2015, soit une diminution de 35% tonnes et 43,6% en USD (Onfaa, 2016a).

La céréaliculture en Algérie se retrouve face à une situation critique de stress hydrique pour sa deuxième année consécutive. Cette situation a marqué pratiquement tout le premier trimestre de la campagne 2015/2016 avec une pluviométrie cumulée ne dépassant pas les 160 mm dans la majorité des régions et une absence totale de pluie durant le mois de décembre selon L'Institut National des Sols de l'Irrigation et du Drainage (INSID) (Onfaa, 2016b).

Selon le bulletin du Joint Research Center/Monitoring Agricultural Resources (JRC MARS), un déficit pluviométrique important depuis le début de l'hiver a été enregistré dans les principales zones agricoles en Algérie. Le cumul des précipitations a dépassé à peine les 40 mm, exception faite pour les régions de l'Ouest Algérien où ils ont reçu des précipitations bénéfiques depuis le 20 Février (Onfaa, 2016b).

Concernant la situation phytosanitaire, cette dernière n'a pas connu de faits saillants au début de cette campagne à l'exception du fléau « rongeurs arvicoles » et contre lequel des opérations de lutte se sont effectuées durant toute la période hivernale. En effet, selon l'Institut National de la protection des végétaux (INPV), la superficie déclarée infestée par la mérione de Shaw enregistrée au cours des opérations de surveillance au titre de la campagne 2015/2016 avoisine les 37.550,75 ha répartis au niveau de 23 wilayas. Les infestations les plus importantes sont enregistrées au niveau de la zone Est avec 62,21% de la superficie globale et plus particulièrement au niveau des wilayas steppiques à l'exemple de Tébessa (8.670 ha), Msila (5.891 ha) et Khenchela (3.749 ha).

Aussi, les opérations de désherbage chimique ont été clôturées sur une superficie de 539785,45 ha. Au mois d'avril, plusieurs maladies fongiques sont apparues, notamment la tache auréolée, la septoriose, la fusariose, la rouille jaune, la rouille brune et l'oïdium au niveau des zones céréalières. Selon l'INPV, le total des superficies traitées est arrivé à 58 835 ha (Onfaa, 2016b).

1.6. Caractéristiques de quelques maladies du blé

Le blé peut être attaqué par de nombreuses maladies à différents stades de son développement. Ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés sont sensibles et les conditions de l'environnement sont favorables à l'expansion des maladies (Ezzahiri, 2001). Environ 80% des maladies de plantes cultivées, en particulier les céréales, sont dues à des champignons microscopiques ; ces derniers détruisent, chaque année, près du quart des récoltes mondiales. Parmi les maladies cryptogamiques du blé, les maladies foliaires sont les plus dominantes en Algérie. Les différentes maladies foliaires ainsi que leurs conditions de développement sont représentés dans le tableau 3 (Boulif, 2012).

Tableau 3: Conditions favorisant le développement des maladies foliaires du blé (Boulif, 2012)

Agents pathogènes	Durée d'humectation du feuillage (en hr)	Températures °C		
		Min	Optimum	Max
<i>Erysiphe graminis</i>	-----	1	15 – 20	25
<i>Septoria tritici</i>	48 – 72	6	15 – 22	32
<i>Puccinia triiformis</i>	24 – 36	5	15 – 22	25
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	24 – 48	-	18 – 28	32
<i>Puccinia recondita</i>	24 – 36	6	20 – 25	35
<i>Puccinia triticinia</i>	24 – 36	6	20 – 26	37

La reconnaissance de ces maladies ainsi que leurs moyens de lutte restent des outils importants pour une meilleure maîtrise de ces contraintes et une amélioration de la productivité par la suite (Aouali et Douici-Khalfi, 2009).

1.6.1. Les Pourritures racinaires (Fusarioses)

Cette maladie est plus agressive en conditions de faible pluviométrie et de hautes températures. Selon les espèces, l'orge est plus sensible à la maladie que le blé. Plusieurs champignons sont responsables de la maladie, les plus connues *Fusarium graminearum* et *fusarium avenaceum*. Le symptôme le plus fréquent est la coloration brun foncé des nœuds inférieurs. Sur les plants plus anciens, l'infection par *Fusarium* peut générer un véritable pourridié ; la base de la tige devient alors brune et pourrie, ce qui entraîne une verse et la formation d'épis argentés (Ezzahiri, 2001).

1.6.2. Les Rouilles

Trois espèces de rouilles s'attaquent au blé : la rouille brune, la rouille noire et la rouille jaune. Les trois rouilles s'attaquent aussi bien au blé tendre qu'au blé dur. Concernant leur importance relative, la rouille brune est la plus répandue dans sa distribution, alors que la rouille noire est la plus dévastatrice quand elle se développe. La rouille jaune est limitée au climat tempéré froid et aux zones d'altitude. (Ezzahiri, 2001)

- ✓ **La rouille noire :** (*Puccinia graminis*) elles sont reconnues par la présence de pustules (ou urédospores) de couleur brun-roux alignées sur les feuilles, mais également sur les tiges et les épis. A l'approche de la maturité, les téléutospores qui apparaissent à la place des urédospores, prennent une teinte brune noire à noire. (Boulal et *al.*, 2007)

- ✓ **La rouille jaune :** (*Puccinia striiformis*) les premiers symptômes se manifestent par des pustules de couleur jaune à orange disposées à la face supérieures des feuilles et alignées en stries entre les nervures du limbe. Sur la tige se forment souvent aussi des stries avec des amas de spores. Parfois, en cas de forte attaque, la maladie peut atteindre l'épi. En 2004, une attaque sévère de rouille jaune sur blé tendre a causé des pertes élevées allant jusqu'à 100% dans les régions du Centre et de l'Est de l'Algérie.(Boulal et *al.*, 2007)

- ✓ **La rouille Brune :** (*Puccinia triticina*) on reconnaît cette maladie par la présence de pustules (ou spores) arrondies de couleur orange ou brunâtre qui recouvrent le limbe des feuilles. Celles-ci préfèrent la face supérieure des feuilles. En fin d'attaque, on voit apparaître parmi les pustules brunes, des pustules noires, ce sont les téléutospores (phase sexuée). (Boulal et *al.*, 2007)

1.6.3. La septoriose (*Septoria tritici*)

Elle est considérée comme l'une des maladies qui cause le plus de dégâts sur blé au Maghreb (Ezzahiri, 2001), Cette maladie cryptogamique foliaire rencontrée dans toutes les régions de production du blé, participe à la destruction d'environ 2% du blé mondial, et cause des millions de tonnes de grains et des billions de dollars de pertes chaque année. (Zahir et al., 2007). La *Septoria tritici* s'identifie par des nécroses allongées, délimitées par les nervures. Ces nécroses sont de tailles et de formes variables, mais présentant assez souvent des bords parallèles. D'une couleur brun rougeâtre, ces taches prennent par la suite une couleur gris-clair. Des pycnides sous forme de ponctuations noires se développent en largeur sur les taches. (Boulal et al., 2007).

1.6.4. L'oïdium (*Erysiphe graminis*)

Tous les organes aériens peuvent être attaqués par cette maladie. Elle se développe sous forme de touffes blanches de mycélium à la surface des feuilles. Par la suite les taches blanches deviennent grisâtres avec des petits points noirs qui sont les cléistothèces (ou périthèces, organes sexués). L'humidité de l'aire est le facteur le plus important pour son développement et cette maladie se manifeste en période sèche (Bégos, 2005). Cette maladie reste de loin plus fréquente sur l'orge que sur le blé, elle prive la plante des éléments nutritifs et réduit la capacité photosynthétique des feuilles (Boulal et al., 2007).

1.6.5. La tache auréolée

La tâche auréolée est une maladie fongique qui affecte le blé, largement répandue en Algérie. Elle est plus fréquente dans les régions dont la pluviométrie est importante plus particulièrement dans le Nord Est du pays. Le champignon pathogène *Pyrenophora tritici-repentis* est à l'origine de la tache auréolée du blé (Forrer et Hecker, 2003). Ce pathogène, est un destructeur de blé dans le monde entier, a été isolé de divers autres hôtes de la famille des Poaceae mais la nature de son interaction avec ces hôtes est inconnue. (Aboukhaddour et Strelkov, 2016).

1.6.5.1. Cycle de développement

L'agent pathogène se conserve sous forme de spores et de mycélium sur les résidus du blé infecté à la surface du sol. Sur les chaumes, les périthèces (structure de reproduction sexuée) et le mycélium constituent la principale source d'inoculum primaire. En présence d'humidité, les périthèces libèrent les ascospores et le mycélium produit des conidies. Les deux types de spores sont disséminés pour initier l'infection primaire sur les plantules de blé en début de saison. Au cours de la saison, l'infection secondaire est assurée par les conidies qui sont facilement disséminées par le vent. La germination des conidies et l'infection des tissus sont favorisées par une durée d'humectation du feuillage de 24 à 48h. Les températures optimales pour l'infection se situent entre 18 et 28°C. La sporulation au niveau des taches foliaires est favorisée par des conditions humides. (Ezzahiri, 2001 ; Aouali et Douici-Khalfi, 2009).



Figure 1 : Conidies de *tritici-repentis*
(G25×3,2) (Azoui, 2015)

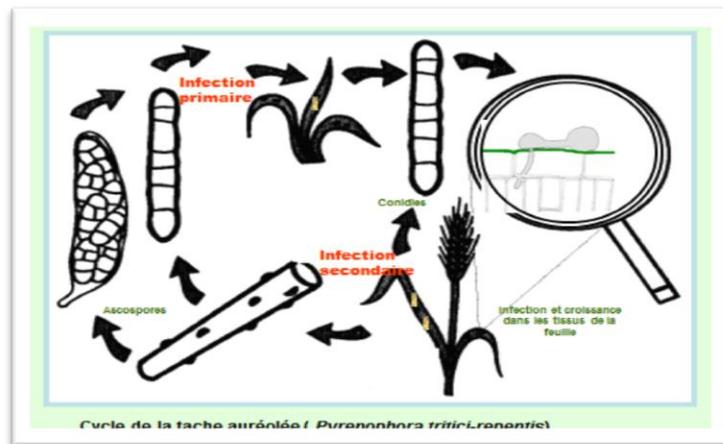


Figure 2 : Cycle de développement de la tache auréolée
(Sayoud, 2008)

1.6.5.2. Symptômes et dégâts

La tache auréolée se développe sur les faces supérieures et inférieures des feuilles. Les lésions apparaissent d'abord sous la forme de mouchetures ocre qui s'allongent ensuite en lésions lentiformes, semblables à celles produites par le champignon de la tache septorienne des feuilles. La présence d'un point brun foncé au centre des tâches. Ainsi que la présence d'un halo jaune caractéristique autour des

tâches présentent les symptômes les plus remarquables. Les facteurs favorisants sont ; température entre 18 et 28°C ; humidité entre 60 et 100% ; un temps pluvieux et couvert qui persiste plus de 48 heures permet l'infection des plantes (Bayer, 2017).

La tache auréolée cause beaucoup de dégâts et elle a pour conséquence ; la perte de tissus assimilateurs, la rétention des assimilés et des composants azotés dans les feuilles ce qui provoque la dépréciation de la qualité du grain, la réduction du poids moyen du grain et par conséquent le rendement, En effet, les pertes de rendement causées par la tache auréolée varient avec les conditions climatiques, la sensibilité de la variété et le stade de la culture au moment de l'attaque. Ces pertes peuvent atteindre 30% quand la maladie est présente tout au long du cycle de culture, et entre 10 à 15% quand elle attaque aux stades tardifs seulement. (Bayer, 2017).

1.6.5.3. Situation de la maladie en Algérie

D'après l'enquête réalisée par Sayoud entre 1992 et 2004 concernant l'importance des maladies du blé en Algérie et actualisée en 2008, on constate que la tache auréolée est la maladie la plus dominante chez le blé dur ($\approx 60\%$) suivi par la septoriose ($\approx 43\%$), la rouille jaune, la rouille brune, l'oïdium, la jaunisse nanisante, la carie et enfin le charbon alors qu'elle vient après la septoriose chez le blé tendre.

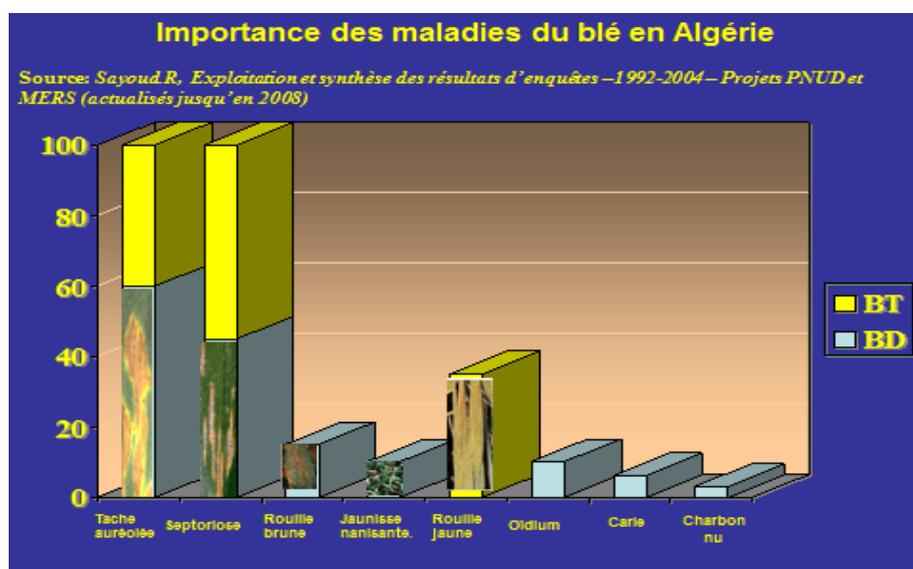


Figure 3 : L'importance des maladies du blé en Algérie (Sayoud, 2008).

La situation actuelle des maladies en Algérie (Benbelkacem et Bendif, 2010) indique que les champs de blé tendre sont infestés selon ordre d'importance par la rouille brune, la septoriose, et à un degré moindre la rouille jaune alors que les champs de blé dur sont caractérisés par la prédominance de la rouille brune, la tache bronzée (tache auréolée), et des septorioses. La rouille jaune a été observée surtout dans l'Est du pays.

2. Pollution des sols agricoles

Le sol est un compartiment complexe, un carrefour multifonctionnel en relation avec lithosphère, hydrosphère, atmosphère et biosphère. Il est le résultat de l'altération, du remaniement et de l'organisation des couches supérieures de la croûte terrestre sous l'action de la vie et des échanges d'énergie qui s'y manifestent (Thomas, 2008).

Un sol est considéré comme pollué quand il contient un ou plusieurs polluant(s) ou contaminant(s) susceptibles de causer des altérations biologiques, physiques et chimiques de l'écosystème constitué par le sol (AFNOR, 1994). La notion de pollution du sol appelle donc généralement à la contamination d'un ou plusieurs composants des écosystèmes (atmosphère, milieux aquatiques) ou à l'accumulation et à un transfert des polluants vers la chaîne trophique par des organismes en contact direct ou indirect avec le sol (plantes, mésofaune, champignons, bactéries).

Parmi les polluants rencontrés, on retrouve principalement les pesticides, les hydrocarbures dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les éléments traces métalliques (ETM). Les ETM les plus répandus, en termes d'occurrence sur les terrains contaminés, sont le plomb (Pb), le chrome (Cr), le cuivre(Cu) et, dans une moindre mesure, l'arsenic (As), le zinc (Zn), le nickel (Ni), le mercure(Hg) et le cadmium (Cd). Parmi les ETM, les métaux lourds (Pb, As, Hg et Cd) sont considérés avec un très vif intérêt. En concentration d'oligo-éléments, la plupart des métaux sont indispensables au métabolisme cellulaire. Mais leur forte toxicité en fait de véritables poisons pour toutes les espèces animales ainsi que pour la plupart des végétaux si la dose absorbée devient trop importante (Perrono, 1999).

2.1. Origine et sources de pollution

Une contamination du sol a souvent pour origine une diffusion lente de produits stockés dans des conditions non réglementaires. Un site pollué peut apparaître ou être découvert en cas :

- d'incident ou d'accident d'exploitation
- de découverte d'une pollution ancienne à l'occasion par exemple d'un changement de propriétaire.

Selon Souguir (2009), Il existe deux sources de pollution:

- Pollution diffuse : elle touche une grande superficie. Elle peut être due aux pratiques agricoles ou aux retombées atmosphériques
- Pollution ponctuelle : elle est très localisée et intense. Elle est liée à des sites industriels, à des dépôts de déchets ou à d'autres sites pollués de façon chronique ou accidentelle.

2.1.1. Naturelle

Les ETM présents dans les sols sont issus de l'héritage du fonds géochimique, Naturellement, le sol contient des ETM issus de la roche-mère sur laquelle il s'est formé. Par conséquent, le sol sera d'autant plus riche en ETM que la roche-mère l'est également. Ainsi, des sols formés sur des sables quartzeux renferment des quantités extrêmement faibles d'ETM (moins de 5 mg/kg de MS de Cu) alors que ceux qui se sont formés sur des sédiments calcaires ou marneux, ou des schistes sont plus riches (25 à 50 mg/kg de MS de Cu) (Perrono, 1999).

2.1.2. Anthropique

Les métaux sont des constituants naturels des roches et des sols. Ces métaux sont présents à l'état de trace d'où le nom "éléments traces métalliques". Leurs sources d'émission dans l'environnement sont très nombreuses et difficiles à limiter, les plus importantes sont d'origine anthropique (industries, fonderies, engrais chimiques...). Les engrais chimiques, en particulier les fertilisants phosphatés sont des produits non

purifiés et contiennent de ce fait des quantités variables d'impuretés parmi lesquelles les métaux lourds occupent une place de premier plan (Mortvedt et *al.*, 1981).

Les boues résiduelles d'origine urbaine constituent une autre source de contamination des zones agricoles par les métaux lourds. Certains métaux lourds sont présents en grande quantité dans ces boues. En plus de ces métaux lourds, ces boues contiennent des composés organiques dangereux dont certains sont des mutagènes comme la nitrosamine, les PCB, le dibenzo-pdioxinepolychlorinate et le furan (PCDD/F) et les hydrocarbures poly-aromatiques (Rejeb, 1990).

Il existe d'autres sources de contamination de l'environnement par les métaux lourds reposant sur l'utilisation des produits phytosanitaires essentiellement les herbicides, les insecticides et les fongicides mercuriels et cupriques destinés au traitement des cultures ou à la conservation des semences. Ces produits contribuent à la toxicité du sol par des éléments traces (Souguir, 2009).

2.2. Contamination des sols par les éléments traces métalliques

Tous les ETM sont potentiellement polluants. Leur nocivité est fonction de leur concentration dans le sol mais également de leur spéciation chimique et de leur biodisponibilité. En effet, l'impact potentiel des ETM sur la biosphère dépend en grande partie de leur passage dans la solution de sol (MacDonald et Hendershot, 2006 ; Fest et *al.*, 2008).

La notion de biodisponibilité a été définie par Baize en 2007 comme "l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (microflore, faune, flore et homme)". La biodisponibilité résulte de l'interaction de trois paramètres, l'espèce chimique présente dans la solution du sol (nature et concentration), les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sol et l'organisme vivant considéré.

2.3. Les ETM dans la plante

L'interface sol-racine est le siège d'intenses processus physiques, chimiques et biologiques qui participent au contrôle du prélèvement des métaux par les plantes. Certains éléments métalliques sont essentiels aux organismes vivants à de faibles concentrations. Mais, ils agissent à de fortes concentrations comme un facteur de stress qui entraîne une modification de la réaction physiologique. Le terme «sensibilité » décrit les effets du stress, qui peuvent aller jusqu'à la mort de la plante, Par opposition, le terme « résistance » fait référence à la réaction de la plante qui lui permet de survivre face au stress métallique et d'assurer sa descendance. (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Certains métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba, sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress (Rengel, 1999). En outre, certains éléments traces peuvent se présenter sous différents états d'oxydation. Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001). Malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains restent considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. On retrouve parmi les plus toxiques, Hg, Cr, Ni, Pb et Cd (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

2.4. Le Cuivre

Le cuivre est un élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique 29, il appartient au groupe 11 et de période 4. Sa masse atomique est de 63,546g/mole, il est représenté sur notre planète par deux isotopes stables : ^{63}Cu (69,17%), ^{65}Cu (30,83%). (Amirouche, 2011)

Le Cu est un élément essentiel pour les plantes supérieures comme le Fe, Zn, Mn, et Ni. Il existe sous de multiples formes redox grâce à sa faculté d'échanger des électrons depuis son orbite d (Palmer et Guerinot, 2009). Ce métal est un cofacteur dans la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie et le chloroplaste (Marschner, 2011). En tant qu'une protéine à cuivre, le complexe IV, ou cytochrome c oxydase (dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie), appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Le site actif binucléaire de cette enzyme est composé d'un noyau hème de haut spin (hème a₃) associé à un ion cuivre (Cu_B). En plus de ce centre binucléaire, le cytochrome c oxydase possède un hème de bas spin (hème a) et un autre centre cuivre (Cu_A). Le cuivre divalent est facilement réduit en Cu monovalent instable. Ainsi, Cu lié enzymatiquement participe à des réactions d'oxydoréduction principalement dépendantes du changement de valence : $\text{Cu}^{2+} + \text{e}^{-} \leftrightarrow \text{Cu}^{+}$ (Mengel et Kirkby 2001). Il est associé à de nombreuses enzymes intervenant dans des processus physiologiques clés tels que la photosynthèse et la respiration (Kabata-Pendias et Pendias 1992 ; Michaud, 2007) :

- ✓ La plastocyanine des chloroplastes : protéine participant à la chaîne de transport des électrons au cours de la photosynthèse.
- ✓ Le superoxyde dismutase : responsable de la détoxification de radicaux superoxydes.
- ✓ L'ascorbate oxydase : catalysant les réactions d'oxydation de l'acide ascorbique.
- ✓ Les peroxydases et les phénols oxydases : enzymes impliquées dans la synthèse des plastocyanines et de la lignine, respectivement.

Il existe deux voies d'absorption du cuivre au niveau racinaire : la voie apoplastique et la voie symplasmique. Le cuivre s'accumule surtout dans les racines à cause de sa forte affinité pour l'apoplasme racinaire, ce qui explique en grande partie les teneurs élevées des racines en cuivre. Ainsi de 10 à 84 % du cuivre total dans les racines est du cuivre apoplastique (Brun et al, 2001, Michaud et al, 2007).

2.4.1. L'apoplasme, voie principale d'adsorption de Cu^{2+}

La composition de l'apoplasme et la capacité d'échange cationique racinaire (CECR) varient suivant l'espèce, la variété et l'âge du végétal (Marschner, 1995). Plus la CECR est élevée, plus la concentration en cuivre adsorbée dans l'apoplasme sera importante. Le cuivre se fixe préférentiellement sur la pectine de la paroi cellulaire lorsque le cuivre est en excès dans le milieu (Konno et *al.*, 2005). L'apoplasme racinaire possède des groupes fonctionnels, le plus souvent carboxyliques, chargés négativement à pH neutre ou alcalin, qui peuvent fortement se lier aux ions Cu^{2+} (Mengel et Kirkby, 2001, Iwasaki et *al.*, 1990). L'adsorption du cuivre sur les constituants de la paroi cellulaire augmente avec le pH tandis que la complexation du cuivre avec les ligands organiques comme l'acide malique et surtout l'acide citrique diminue son adsorption apoplastique (Vulkan et *al.*, 2004). L'adsorption apoplastique du cuivre sur les parois cellulaires pourrait être mobilisée lors de carence en cuivre et être une étape préliminaire à l'absorption du cuivre (Graham, 1981). Toutefois, un excès de Cu^{2+} lié à la paroi cellulaire peut avoir une action pro-oxydante et inhiber la croissance cellulaire (Fry et *al.*, 2002 cité par Martins et *al.*, 2012).

2.4.2. Absorption du cuivre Cu^+ par la voie symplasmique

L'absorption des métaux correspond à leur transport à travers la membrane plasmique. Pour le cuivre, l'absorption s'effectue majoritairement sous la forme ionique libre Cu^+ mais la forme liée aux ligands organiques pourrait être absorbée sans dissociation du complexe formé (Xuan et *al.*, 2006). Les mécanismes d'absorption du cuivre sont encore mal connus, bien qu'ils aient été étudiés chez *Arabidopsis thaliana* : ils nécessitent des transporteurs à haute affinité pour Cu^+ , les COPT (copper transporters), localisés au niveau des apex des racines primaires et secondaires, parfois au niveau de la zone d'élongation et des poils racinaires. Comme le cuivre est présent dans l'apoplasme sous la forme Cu^{2+} , il doit être réduit sous la forme Cu^+ pour passer la membrane plasmique via les transporteurs COPT1 et COPT2. Cette réduction est possible grâce à des protéines de la membrane plasmiques FRO (ferric réductase oxydase) qui réduisent également les ions Fe^{3+} (Puig et *al.*, 2007) bien qu'il ne soit pas établi que ce soient strictement les mêmes protéines qui effectuent la réduction des 2

ions car elles pourraient être localisées à des endroits différents sur la racine selon l'ion (Bravin, 2008). La présence d'acide ascorbique provoque également la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ . Tous les transporteurs membranaires de cuivre et leur fonctionnement biochimique ne sont pas encore connus. Dans les plantes, ce sont majoritairement des transporteurs COPT1 qui permettent au cuivre de franchir la membrane plasmique sous la forme Cu^+ . L'activité de ces transporteurs n'est pas pH-dépendante (Martins et *al.*, 2012). Il semblerait que les transporteurs membranaires de Zn^{2+} , les ZIP puissent également transporter les ions Cu^{2+} , mais les avis semblent contradictoires à ce sujet (Clemens, 2001, Puig et *al.*, 2007). Les transporteurs transmembranaires des métaux sont rarement spécifiques à un seul métal. Le transport d'un métal est donc en compétition avec d'autres ions dont H^+ et dépend donc du pH (Bravin, 2008). Il y a une compétition pour les sites d'adsorption racinaire entre H^+ , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+} (Kinraide et *al.*, 2004, Vulkan et *al.*, 2004). L'affinité des membranes plasmiques pour Cu^{2+} est plus importante que pour Ca^{2+} , Zn^{2+} et Mg^{2+} (Vulkan et *al.*, 2004). Pourtant, l'absorption du cuivre est stimulée par Ca^{2+} et inhibée par Zn^{2+} (Martins et *al.*, 2012).

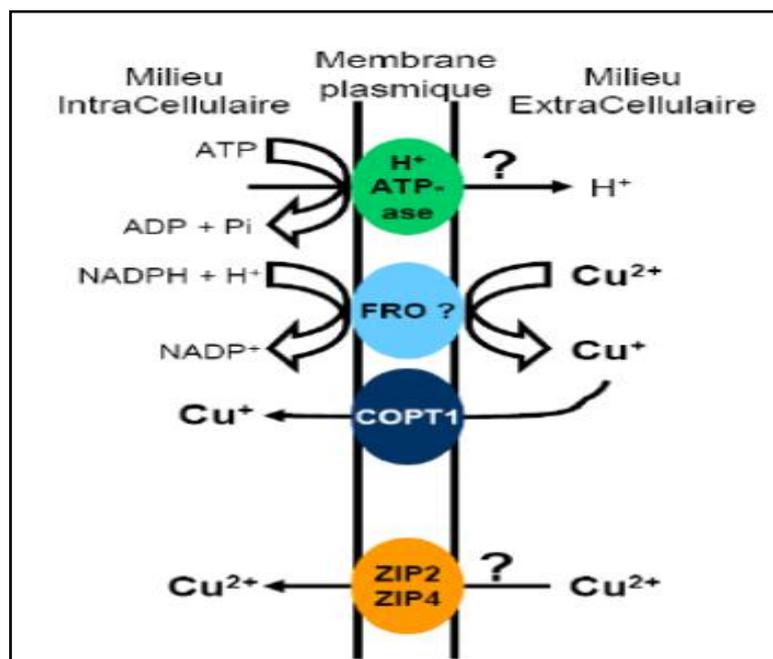


Figure 4 : Transporteurs membranaires du cuivre impliqués dans l'absorption racinaire (Bravin, 2008).

2.4.3. Translocation du cuivre vers les parties aériennes

Après avoir franchi les membranes plasmiques des cellules racinaires, l'ion Cu^+ est transporté vers les parties aériennes via le xylème sous forme complexé par des acides aminés (Brun *et al.*, 2001) par l'histidine ou la nicotianamine (Clemens, 2001) ou des acides organiques comme le citrate ou le malate (Puig *et al.*, 2007). La nicotianamine est aussi utilisée pour le transport de Fe^{2+} , l'histidine est davantage présente dans les plantes plus tolérantes au cuivre (Clemens, 2001). La concentration du cuivre dans le xylème et le phloème est à l'état de trace, soit environ $140 \mu\text{M}$, et semble corrélée à la concentration en acides aminés (KabataPendias, 2010). Le cuivre est ensuite stocké dans les vacuoles et d'autres organites cellulaires, il pénètre dans la cellule grâce au transporteur COPT1. Dans le cytoplasme, le cuivre est pris en charge par des chaperons (COX17, CCH, CCS, CpCCS) car les ions cupriques libres sont hautement toxiques pour la cellule. Les chaperons transportent le cuivre jusqu'aux enzymes Cu-dépendantes des organites ou vers la vacuole pour être stocké (Marschner, 1995, Clemens, 2001, Yruela, 2005). Des transporteurs spécifiques sont utilisés pour pénétrer dans les organites : COPT5 et RAN1 pour l'appareil de Golgi, COPT3, PAA1 et PAA2 pour les chloroplastes et COX17 pour les mitochondries (Yruela, 2005). Le cuivre pourrait également être transporté dans la vacuole et les chloroplastes grâce à des pompes à protons ATP-ases qui pourraient également être utilisées pour d'autres cations. (Martins *et al.*, 2012, Yruela, 2005).

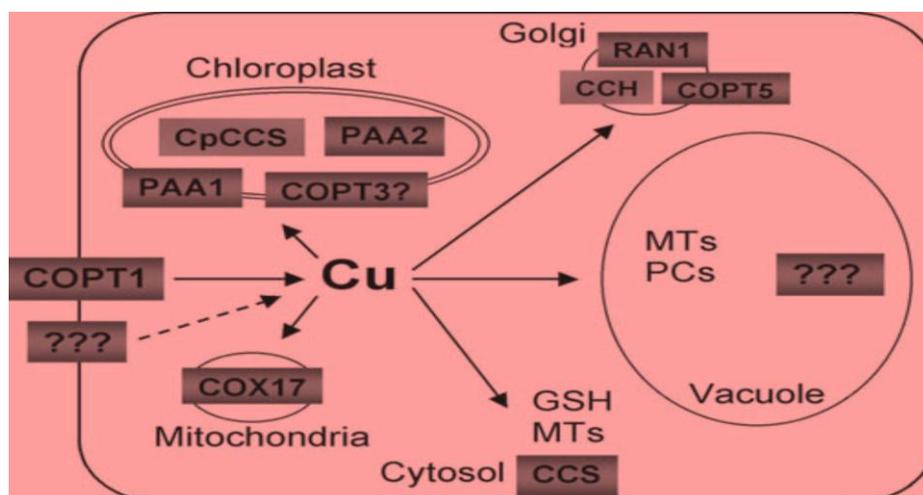


Figure 5: Différents chélateurs et transporteurs cupriques impliqués au niveau cellulaire (Yruela, 2005)

Lorsque le cuivre est en excès, il est pris en charge par des molécules plus spécifiques des métaux lourds comme les métallothionéines (MTs) et les phytochélatines (PCs) jusqu'à sa destination finale, généralement la vacuole (Yruela, 2005). Les métallothionéines sont des protéines riches en cystéine surtout présentes chez les plantes tolérantes au cuivre (Wei et al., 2008, Jack et al., 2007) et présentent une très forte affinité pour le cuivre (Banci et al., 2011). Les phytochélatines résultent de la réduction de glutathion (GSH) formé de glutamine, cystéine et glycine, Ils sont synthétisés à partir du glutathion par la phytochélatine synthase (PS), sous l'effet du stress oxydatif engendré par une toxicité cuprique élevée (Wei et al., 2008). Dans la vacuole, le cuivre est pris en charge par des acides aminés, des acides organiques et des métallothionéines (Clemens, 2001). Le cuivre stocké dans la vacuole peut être remobilisé par la plante si nécessaire, lorsqu'il n'y a plus de cuivre disponible dans le milieu (Martins et al., 2012).

2.4.4. Toxicité du cuivre

Le cuivre est défini comme un Élément Trace Potentiellement Toxique (*en anglais* PTTE) (Adriano, 2001); comme tout élément essentiel au développement de la plante, il peut induire des symptômes de toxicité (réduction de la biomasse, inhibition de la croissance racinaire, bronzing, chlorose, réduction du prélèvement de Fe, Zn et P, perte de l'intégrité du chloroplaste, etc.) à des expositions supérieures à l'homéostasie cellulaire de Cu (Marschner, 2011).

2.4.4.1. Rhizotoxicité

Le cuivre s'accumule dans les racines et particulièrement dans l'apoplasme, ainsi, sa phytotoxicité agit principalement sur la croissance et la morphologie du système racinaire (Marschner 1995 ; Michaud, 2007). Un excès de Cu dans le milieu environnant induit une rhizotoxicité visible au travers d'un épaississement et d'une coloration brune des racines, de la diminution de la ramification et du nombre de poils racinaires et de l'élongation racinaire globale (Sheldon et Menzies 2005; Kopittke et

Menzies 2006). Des lésions de l'épiderme sont également observées ainsi qu'un épaissement des apex et des dommages occasionnés sur les méristèmes. Les lésions de l'épiderme observées sous toxicité métallique, comme avec Al, pourraient être dues à une différence de taux d'élongation entre l'intérieur et l'extérieur des cellules. Les effets de la phytotoxicité de Cu sur l'élongation racinaire sont d'ailleurs similaires à ceux provoqués par Al (Blamey, 2001). La liaison de l'Al avec des composés pectiques des parois cellulaires augmenterait la rigidité des parois cellulaires et déplacerait les cations basiques, particulièrement Ca^{2+} , diminuant ainsi l'expansion cellulaire et donc l'élongation racinaire. Comme pour les ions Al^{3+} , les ions Cu^{2+} pourraient inhiber l'élongation racinaire en réduisant l'expansion cellulaire et en augmentant la rigidité des parois cellulaires. D'autre part, la rhizotoxicité de Cu pourrait altérer la nutrition globale de la plante en réduisant le prélèvement d'éléments nutritifs à travers une diminution de la croissance racinaire.

2.4.4.2. Déficience induite en fer et chloroses

En plus de la rhizotoxicité, la phytotoxicité de Cu est également connue pour induire dans certains cas une déficience en Fe et des symptômes de chlorose ferrique (Kabata-Pendias et Pendias 1992 ; Mengel et Kirkby 2001). Des travaux ont ainsi montré que les teneurs en Fe des parties aériennes diminuaient avec l'augmentation de la concentration en Cu en solution et dans le sol (McBride, 2001) chez des céréales comme le maïs et le blé, avec l'apparition de symptômes de chlorose ferrique. Des niveaux élevés de Cu peuvent également induire la formation de radicaux libres et provoquer un stress oxydatif. Ceci peut agir sur la peroxydation des lipides et entraîner la destruction des membranes plasmiques, la détérioration de la structure et de la composition des thylakoïdes et des chloroplastes, altérer les photosystèmes et ainsi inhiber la photosynthèse (Yruela et al, 1996 ; Quartacci et al., 2000 ; Yruela 2005). En plus de l'induction d'une déficience en Fe, la toxicité de Cu pourrait aussi agir directement sur la photosynthèse, en altérant notamment la chaîne de transport d'électrons, et induire des symptômes de chlorose.

2.4.5. Tolérance

Le cuivre est un élément fortement toxique capable de catalyser la production de radicaux libres qui sont de puissants oxydants. Par conséquent, les plantes ainsi que les autres organismes ont développé des mécanismes complexes d'homéostasie pour maintenir dans une gamme étroite les concentrations en oligoéléments tels que Cu et minimiser les risques de phytotoxicité (Clemens 2001). Le cuivre possède trois états d'oxydation, le Cu^+ , Cu^{2+} et le Cu^{3+} . Dans la cellule, différents systèmes ont évolué pour canaliser le pouvoir d'oxydoréduction du cuivre et réguler son homéostasie (Manon Gault, 2014). Les plantes ont développé des mécanismes d'homéostasie pour maintenir les concentrations en oligoéléments dans une gamme étroite. Pour gérer l'excès de cuivre, les plantes peuvent mettre en place plusieurs stratégies qui sont principalement l'exclusion et la séquestration. La stratégie la plus courante est l'exclusion (Lou et *al.*, 2004).

L'exclusion consiste à limiter la pénétration des contaminants au niveau des racines. Il s'agit soit de produire des exsudats qui vont limiter la biodisponibilité des métaux, soit de les piéger dans les parois cellulaires pour limiter leur pénétration vers l'intérieur des cellules, et éviter leur transfert vers les parties aériennes plus sensibles pour protéger celles-ci. La plante peut diminuer la biodisponibilité du cuivre dans le sol grâce aux ligands organiques qui vont se complexer au cuivre, ou grâce aux exsudats racinaires permettant de modifier le pH (Hall, 2002). La plante peut aussi bloquer le cuivre sur les parois cellulaires en augmentant les charges négatives des parois, qui peuvent alors se lier aux cations métalliques (Wei et *al.*, 2008). La plante limite également la concentration du cuivre dans les cellules racinaires en diminuant l'activité des transporteurs de cuivre de la membrane plasmique vers le cytoplasme ou en augmentant l'activité d'efflux du cuivre qui y a pénétré via des exsudats racinaires (Hall, 2002).

La séquestration consiste à lier le cuivre libre à des phytochélatines ou des métallothionéines pour limiter ses dégâts oxydatifs dans la plante puis à le bloquer dans les cellules en les stockant dans la vacuole ou dans des organes spécialisés. La

production de phytochélatines et de métallothionéines augmente en cas d'exposition à une teneur élevée en cuivre. Les phytochélatines sont des monomères de type Glutathion, tandis que les métallothionéines sont des protéines riches en Cystéine (Clemens, 2001). Ces deux familles de molécules se lient au cuivre grâce à des groupements thiols. Des composés NPT (non protéine thiol content) pourrait également accroître la tolérance au cuivre en formant un complexe avec le cuivre afin de faciliter son transport du tonoplaste vers la vacuole (Wei et *al.*, 2008).

3. La résistance naturelle des plantes

3.1. Perception des stress abiotiques

Les mécanismes de perception des stress abiotiques sont encore en partie méconnus. Lors d'un excès de lumière, des récepteurs photosensibles, comme par exemple les phototropines, les néochromes et les cryptochromes, vont capter l'information et transmettre le signal. Selon le rayonnement (longueur d'onde), certains de ces récepteurs peuvent également intervenir lors de radiations par les ultraviolets (UV) : les phytochromes pour la lumière rouge, les cryptochromes et les phototropines pour la lumière bleue et les UVA, et il semblerait que des récepteurs (encore indéterminés) soient impliqués dans la perception des UV-B (Li et *al.*, 2009).

En revanche, dans le cas d'un stress hydrique, salin ou d'une exposition à de basses températures (chilling ou freezing), la présence de récepteurs n'a pas encore été démontrée. Il semblerait que ce soit plutôt les dégâts causés par ces stress qui seraient détectés par la plante et engendreraient l'activation des mécanismes de défense. Par exemple, la plante va percevoir le froid via les modifications de la fluidité membranaire, l'accumulation de FAOs, la réorganisation du cytosquelette ou la modification de la conformation des protéines (Knight & Knight, 2001).

3.2. Perception de l'agent pathogène

Tout comme les animaux, les plantes sont capables de reconnaître le non-soi et le soi modifié, ainsi que d'induire des mécanismes de défense en réponse aux attaques d'agents pathogènes (Chisholm et *al.*, 2006 ; Jones & Dangl, 2006 ; Nürnberger &

Kemmerling, 2009). Deux types de reconnaissance peuvent être proposée ; la reconnaissance spécifique qui fait intervenir le produit du gène de résistance de la plante et le produit du gène d'avirulence du pathogène correspondant, et la reconnaissance non spécifique qui implique des éliciteurs généraux.

3.2.1. La reconnaissance par les éliciteurs généraux

La résistance non-spécifique d'hôte est basée sur la reconnaissance d'éliciteurs généraux communs à de nombreux agents pathogènes. Initialement, le terme éliciteur a été utilisé pour décrire les molécules capables d'induire la production des phytoalexines (Keen, 1975), puis il a été étendu à l'ensemble des molécules qui induisent les réactions de défense chez les plantes (Montesano et *al.*, 2003). Ainsi, d'après cette définition, les éliciteurs peuvent avoir une origine microbienne ; éliciteurs exogènes (constituant des surfaces, ou molécules sécrétées), ou bien provenir de la dégradation de la paroi cellulaire végétale sous l'action des enzymes hydrolytiques du parasite ; éliciteurs endogènes (Garcia-Brugger et *al.*, 2006). Ces éliciteurs appartiennent à plusieurs familles chimiques : protéines, glycoprotéines, glycanes, lipides. Les éliciteurs sont aussi regroupés sous le terme de PAMPs (pathogen associated molecular pattern) et sont reconnues par des récepteurs de la plante appelés PRRs (pattern-recognition receptors) (Zipfel, 2008).

* Les MAMPs (microbial-associated molecular patterns)

Anciennement appelés éliciteurs exogènes, ce sont en général des éléments nécessaires à la survie des micro-organismes, donc conservés au cours de l'évolution (Lyon, 2007 ; De Vleeschauwer & Höfte, 2009). Leur nature est variée : glycoprotéines (Poinssot et *al.*, 2003 ; Garcia-Brugger et *al.*, 2006), oligosaccharides (Klarzynski et *al.*, 2000 ; Rabea et *al.*, 2003) ou composés lipidiques (Amborabé *etal.*, 2003 ; Zeidler et *al.*, 2004 ; Varnier et *al.*, 2009). Les composants principaux de la paroi des champignons (chitine, glucanes, ergostérol, sphingolipides) sont d'excellents éliciteurs (Zhang *etal.*, 2002 ; Umemura et *al.*, 2004 ; Lyon, 2007 ; Zhang et *al.*, 2010).

* Les DAMPs (damage-associated molecular patterns)

De nombreux DAMPs (Hématy et *al.*, 2009), anciennement appelés éliciteurs endogènes, et d'extraits de plantes ont été caractérisés comme agent éliciteur ces dernières années : brassinolide, oligogalacturonides, oxalate, extraits d'*Hedera helix*, VOCs produits en réponse à une blessure et extraits d'algues marines (Bouarab et *al.*, 1999 ; Klarzynski et *al.*, 2001 ; Nakashita et *al.*, 2003 ; Lyon, 2007).

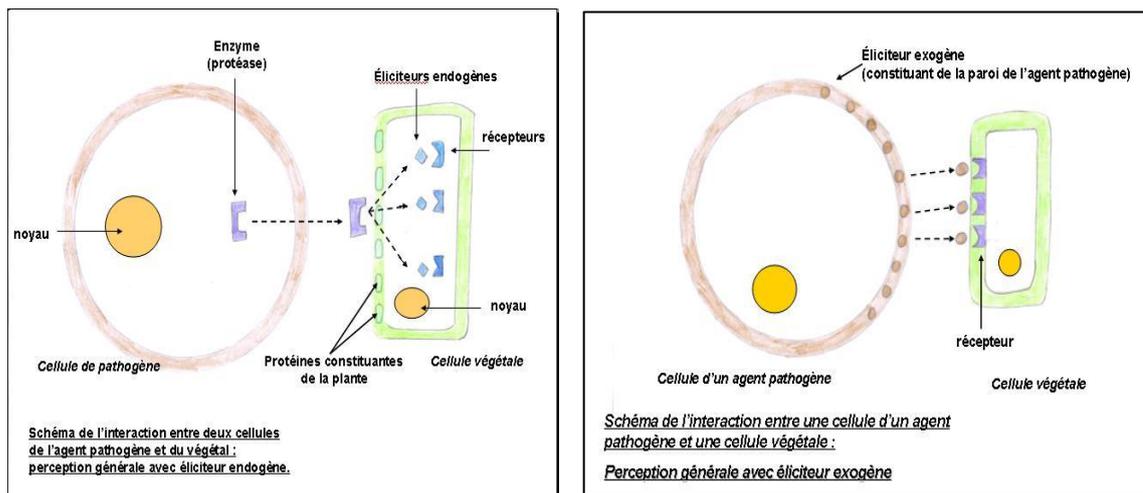


Figure 6 : La reconnaissance par les éliciteurs généraux (Anonyme 2).

3.2.2. La reconnaissance spécifique

Il s'agit du deuxième niveau de reconnaissance des plantes, lorsque les parasites sont capables de franchir la barrière de la reconnaissance non-spécifique. Elle est liée à la détection spécifique de certaines races, appartenant à une espèce de microorganisme pathogène, par certaines variétés, appartenant à une espèce de plante hôte. On doit à Flor la démonstration que la résistance spécifique de race et de cultivar ne dépend en général que d'un seul gène dans chaque partenaire (Flor, 1955). D'où le concept gène-pour-gène selon lequel la présence simultanée et spécifique du produit d'un gène de résistance (*R*) dans le génome d'une plante et du produit d'un gène d'avirulence (*Avr*) correspondant dans celui d'un parasite conduit à une résistance spécifique souvent caractérisée par la mort cellulaire programmée des cellules attaquées, aussi appelé réponse hypersensible (HR). L'interaction est alors considérée comme incompatible. Ce phénomène de résistance, basé sur la reconnaissance spécifique d'effecteurs de

l'agent pathogène est qualifiée d'ETI (Effector-Triggered Immunity). Dans le cas où le parasite est capable de contourner tous les systèmes de reconnaissance de son hôte, il parvient à se développer et à accomplir son cycle en provoquant la maladie. Cette sensibilité de la plante due aux effecteurs du parasite est qualifiée d'ETS (Effector-Triggered Susceptibility) (Jones et Dangl, 2006).

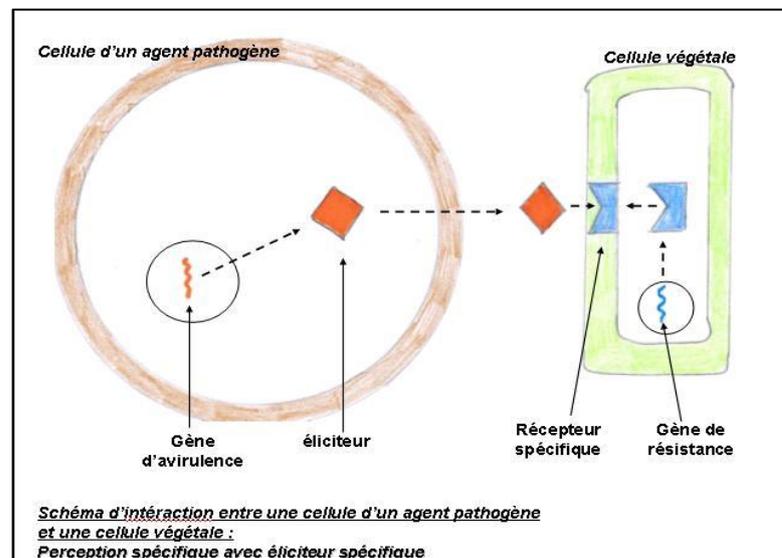


Figure 7 : La reconnaissance spécifique (Anonyme 2).

✓ Les gènes d'avirulence (Avr)

Les gènes d'avirulence codent des protéines qui possèdent une activité élicitrice spécifique aux cultivars de plantes qui possèdent les récepteurs race-spécifique correspondants (Montesano et *al.*, 2003, Ellis et *al.*, 2007). De nombreux gènes d'avirulence ont été isolés chez les champignons, les bactéries et les virus et les oomycètes (Gohre and Robatzek, 2008). Dans le cas des bactéries, elles sont injectées directement dans le cytoplasme des cellules végétales grâce au système de sécrétion de type III (Espinosa et Alfano, 2004). Dans le cas des champignons, elles sont majoritairement sécrétées de façon extracellulaire. Chez les oomycètes, les protéines d'avirulence sont sécrétées dans la matrice extra-haustoriale puis internalisées dans la cellule hôte (Birch et *al.*, 2008).

✓ Les gènes de résistance

Depuis 1992, des gènes de résistance ont été clonés chez différentes espèces végétales. Plus de 60 gènes *R* ont été clonés à partir des plantes mono et dicotylédones (Hammond-Kosack et Kanyuka, 2007). Enfin il apparaît aujourd'hui que le modèle gène pour gène requiert non seulement les déterminants *R* et *Avr*, mais également d'autre protéine-hôtes (Dixon et *al.*, 2002) qui s'associent au binôme *R/Avr* pour activer la défense. Le système de reconnaissance *R/Avr* permet à la plante de reconnaître spécifiquement son agresseur et d'activer une cascade d'événements qui vont lui permettre de résister.

3.3. La signalisation

La perception du stress va engendrer l'activation de réponses précoces et la transduction du signal au niveau intracellulaire. La survie de la plante dépendra de la vitesse et de l'efficacité de leur mise en place. La reconnaissance entre la plante et un microorganisme médiée par les gènes de résistance et par la perception des PAMPs conduit à l'activation d'une cascade de signaux aboutissant à la mise en place d'un réseau complexe de mécanismes de défense et, dans le cas d'interactions spécifiques, au déclenchement de la réaction HR. La découverte de nouveaux gènes et l'analyse d'une batterie de mutants ont permis de déchiffrer en partie la transduction des signaux de reconnaissance impliquant des flux ioniques, des espèces activées de l'oxygène, des protéines, et des signaux hormonaux (Knight et Knight, 2001 ; Garcia-Brugger et *al.*, 2006 ; Zipfel, 2008).

3.3.1. Les flux ioniques et la dépolarisation membranaire

Les flux d'ions à travers la membrane plasmique (influx de Ca^{2+} et H^+ et efflux de K^+ et Cl^-) et la dépolarisation membranaire qui en découle ont lieu dès les premières minutes de l'interaction. C'est la réponse la plus précoce à la reconnaissance spécifique d'un agent pathogène. Parmi les différents ions cités, le calcium est particulièrement important pour le bon fonctionnement des protéines kinases qui interviennent dans la phosphorylation/ déphosphorylation de diverses protéines afin de

les réguler (Lecourieux et *al.*, 2006 ; Wendehenne et *al.*, 2002). Le Ca^{2+} est considéré comme l'un des seconds messagers majeurs puisqu'il peut activer de nombreux événements dans la cellule végétale. L'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol est nécessaire pour l'activation du stress oxydant et de la mort cellulaire chez *A. thaliana* en réponse à *P. syringae* (Grant et *al.*, 2000). De plus, plusieurs méthodes de mesure *in vivo* de la concentration en Ca^{2+} dans la cellule ont rapporté que la concentration en Ca^{2+} cytosolique libre ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) variait de 50-100 nM à 1-5 μM en seulement 2 à 5 min après élicitation (Zhao et *al.*, 2005). Concernant l'efflux de Cl^- , les réponses de défense de plusieurs plantes requièrent ce mouvement d'ions à travers la membrane plasmique (Nürnberg et *al.*, 2004). De plus, des efflux de K^+ ont été également observés dans des suspensions de tabac en réponse à la cryptogéine et à d'autres éliciteurs (Pugin et *al.*, 1997).

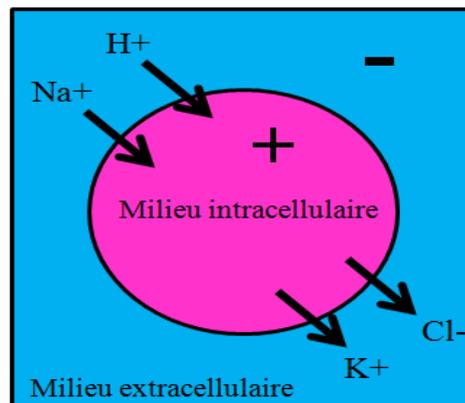


Figure 8 : Les flux ioniques.

3.3.2. Les différentes MAP kinases

Les plantes répondent aux stimuli extérieurs en mettant en place toute une machinerie moléculaire et cellulaire complexe. Les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) sont des éléments clé de ce système de réponses : elles interviennent dans la transduction d'un signal lors d'un stress, au cours du cycle cellulaire, et au niveau du contrôle de la croissance. L'augmentation intracellulaire des ions Ca^{2+} active par la suite une cascade de MAPKs qui va activer différents facteurs de transcription, permettant ainsi l'induction de l'expression de gènes impliqués dans les réponses de défense (Pitzschke et *al.*, 2009). La voie des MAPKs fait intervenir de nombreuses

molécules dont les principales sont les MAPKs, les MAPKKs, et les MAPKKKs (Widmann et *al.*, 1999 ; Ligterink et Hirt, 2000). La voie des MAPKs est une voie intracellulaire essentielle à la transduction du signal après la perception d'un stress (biotique ou abiotique), qui permet d'acheminer le signal depuis la surface des cellules (récepteurs) jusqu'au noyau (Colcombet et Hirt, 2008 ; Pitzschke et *al.*, 2009). Cette voie se caractérise par des cascades successives d'activation de kinases : l'activation d'une MAPK kinase kinase (MAPKKK) induit la phosphorylation d'une MAPK kinase (MAPKK) sur les résidus sérine et thréonine, qui va elle-même phosphoryler une MAPK sur les résidus tyrosine et thréonine. La MAPK ainsi activée active certains facteurs de transcription ou migre par la suite dans le noyau ou pour influencer sur divers phénomènes : la production de FAOs et de messagers secondaires, l'expression de gènes impliqués dans les réponses de stress, et la mort cellulaire (Xiong et Zhu, 2001 ; Pedley et Martin, 2005 ; Pitzschke et *al.*, 2009 ; Rodriguez et *al.*, 2010).

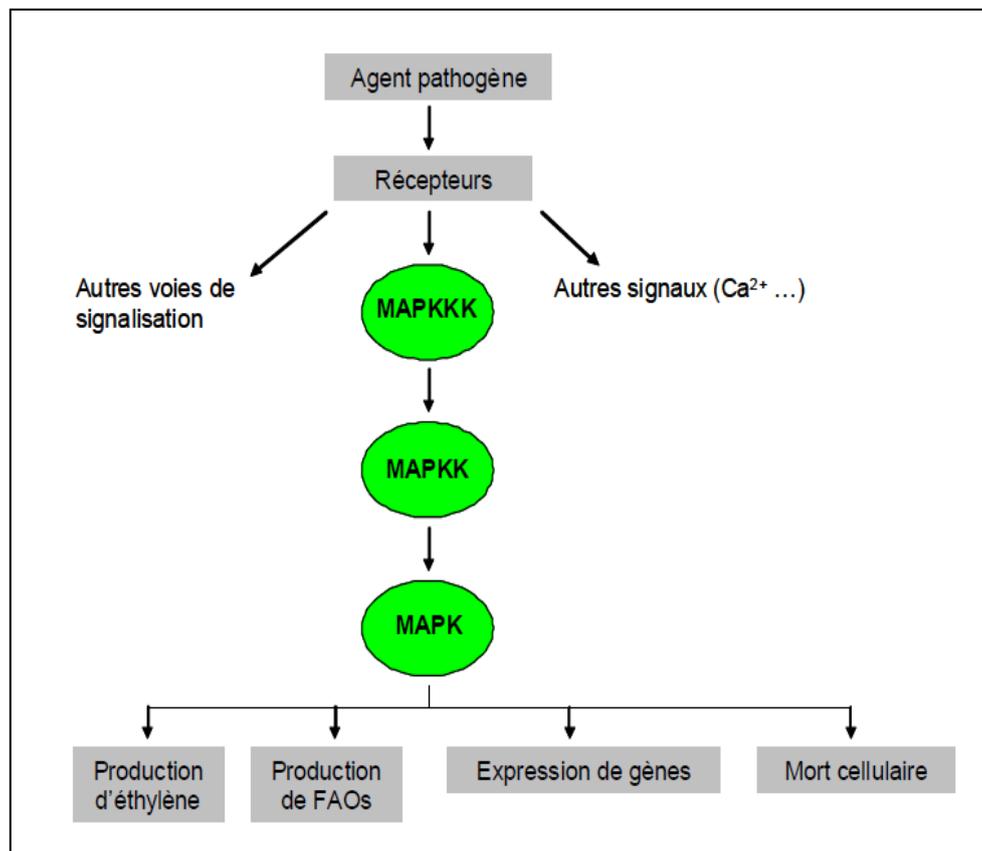


Figure 9 : Voie de signalisation des MAPKs.
FAOs : formes actives de l'oxygène (d'après Pedley & Martin, 2005).

3.3.3. Phosphorylation/déphosphorylation des protéines

La phosphorylation est l'ajout d'un groupement phosphate à une protéine. Les phosphorylations et déphosphorylations de protéines jouent un rôle essentiel dans la transduction des signaux menant à la résistance aux pathogènes chez les plantes. Elle consiste en une modification de l'activité biologique d'une protéine, ainsi que sa localisation et sa durée de vie. En réponse à des éliciteurs chez différentes espèces, l'analyse du phosphoprotéome a mis en évidence l'implication d'événements de phosphorylation et de déphosphorylation de protéines qui interviennent précocement dans la cascade de signalisation (Nuhse et *al.*, 2007). Par exemple, en réponse à la cryptogéine chez le tabac, des approches pharmacologiques ont permis de montrer que de nombreux événements de signalisation (alcalinisation du milieu extracellulaire, influx de Ca^{2+} , production de FAO), étaient régulés à la fois par des protéines kinases et des protéines phosphatases (Lecourieux-Ouaked et *al.*, 2000). Parmi les protéines kinases impliquées dans les cascades de signalisation associées aux défenses figurent les MAPKs (Colcombet et Hirt, 2008 ; Pitzschke et *al.*, 2009).

La phosphorylation ainsi que l'activation des MAPKs participe à l'activation de réponses de défense incluant l'expression de gènes codant des protéines de défense comme les PR (pathogenesis-related) et des protéines du métabolisme secondaire, ainsi que l'induction de la RH (Pedley et Martin, 2005).

3.3.4. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS)

Lors de l'établissement de la réponse à un stress biotique une forte accumulation de FAOs (ou ROS : Réactive Oxygen Spécies) a lieu en une ou deux phases selon le type d'interaction : compatible ou incompatible. La première phase qui est commune aux deux types d'interaction a lieu dès les premiers instants, la seconde n'est observée que lorsque l'interaction est incompatible environ 6 à 12h après détection de l'agent pathogène. Cette dernière est une des réponses les plus étudiées entre un pathogène et sa plante hôte (Torres et *al.*, 2006 ; Parent et *al.*, 2008). Les principales formes étudiées dans les interactions plante-agent pathogène sont l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroperoxyde (HO_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2),

forme la plus stable) et le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$). Plusieurs enzymes interviennent dans la biosynthèse de FAOs au niveau de l'apoplasme et de la membrane, notamment les NADPH-oxydases (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) et les peroxydases. Les NADPH-oxydases participent à la synthèse d' O_2^- et d' H_2O_2 , leur production générant un 'burst oxydatif' (Gerber et Dubery, 2004 ; Mittler et *al.*, 2004 ; van Loon et *al.*, 2008). Ce burst est lui-même impliqué dans l'activation des MAPKs, le renforcement des parois cellulaires, la mise en place de la réponse d'hypersensibilité (RH) et l'expression de gènes de défense, tout en ayant une activité cytotoxique directe vis-à-vis des micro-organismes (Neill et *al.*, 2002 ; Chinnusamy et *al.*, 2004 ; Garcia-Brugger et *al.*, 2006).

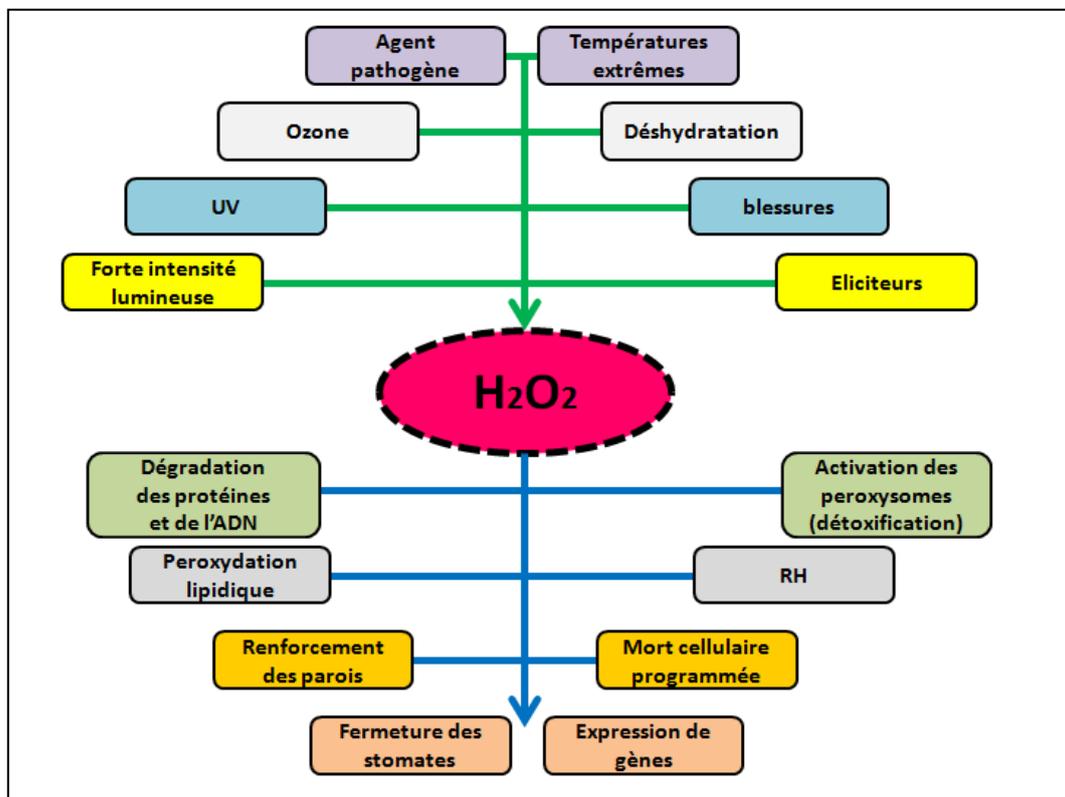


Figure 10 : Voie de signalisation par l' H_2O_2 chez les plantes. (Neill et *al.*, 2002).
Les flèches en vert: les phénomènes induisant sa biosynthèse ; les flèches en bleu : les effets potentiels d'une accumulation d' H_2O_2 .

3.4. Les réactions de défenses

La cascade de signalisation, établie après perception de l'agent pathogène, va engendrer une reprogrammation de l'expression de gènes, plus particulièrement des gènes de défense, afin de mettre en place des réponses de défense adaptées. Les produits de ces gènes sont impliqués dans les processus de signalisation cellulaire, les voies de biosynthèse de composés antimicrobiens et de protéines PR, participent au renforcement de paroi mais aussi à la mise en place de la RH. Tous ces mécanismes enclenchés conduiront à la résistance de la plante (Dubreuil, 2010).

3.4.1. La réaction d'hypersensibilité (RH)

Chez la plante, il existe un programme de mort cellulaire qui, inactivé dans des conditions normales, est induit sous l'effet d'une stimulation par un organisme pathogène. La mort cellulaire de type hypersensible se manifeste phénotypiquement par l'apparition de lésions nécrotiques localisées aux sites de pénétration du pathogène. La RH est une réponse de défense caractéristique qui est considérée par certains auteurs comme l'étape finale du processus de mise en place de la résistance (Mur et *al.*, 2008). Elle apparaît dans de nombreuses interactions plante-pathogène et est souvent associée à la résistance de type race-spécifique mais peut également être déclenchée par des éliciteurs généraux (Jones et Dangl, 2006 ; Heath, 2000). La RH est définie comme une mort cellulaire localisée au niveau du site d'infection du pathogène, qui entraîne l'apparition de lésions nécrotiques. Plutôt observée dans les réponses de défense aux biotrophes, cette résistance locale limite le développement du pathogène en réduisant l'accès aux nutriments (Dangl et *al.*, 1996 ; Greenberg et Yao, 2004).

La RH est particulièrement efficace pour lutter contre de nombreux agents pathogènes (virus, bactéries, nématodes et champignons), mais il a été démontré qu'elle est insuffisante si les agents pathogènes sont de type nécrotrophe (Glazebrook, 2005). En effet, ces derniers sont capables de vivre sur des tissus morts, et il a été proposé qu'ils pourraient même induire la RH pour leur propre profit (Govrin et Levine, 2000 ; Govrin et *al.*, 2006 ; Garcion et *al.*, 2007). La RH est stimulée et régulée par les flux ioniques (surtout le Ca^{2+}), les FAOs (H_2O_2 et NO) ou l'AS et elle

est souvent associée à la production de phytoalexines et au renforcement des parois cellulaires (Lecourieux et *al.*, 2002 ; Garcion et *al.*, 2007). Cependant, l'H₂O₂ n'est pas obligatoirement nécessaire pour son établissement (Dorey et *al.*, 1999 ; Hirasawa et *al.*, 2005). De nombreux auteurs ont tout d'abord qualifié la RH de mort cellulaire programmée (PCD) similaire à l'apoptose chez les animaux (Greenberg et Yao, 2004).

3.4.2. Le renforcement des parois cellulaires

Pour la plupart des agents pathogènes, la paroi végétale constitue le premier obstacle à franchir. Ainsi, il n'est donc pas étonnant que les plantes renforcent cette barrière structurale en réponse à leurs attaques (Garcion et *al.*, 2007). Parmi les principales substances qui viennent renforcer la paroi, on peut citer les appositions pariétales, la callose et la lignine. Les appositions pariétales sont des structures riches en composés phénoliques qui s'accumulent au niveau du site d'infection, provoquant une réorganisation du cytosquelette, et sont souvent associées à la résistance (McLusky et *al.*, 1999). La callose (β -1,3-glucane) s'accumule au niveau et autour du site de pénétration pour former des papilles. Son rôle est de restreindre le développement (barrière physique) et la progression du champignon pathogène, notamment par l'arrêt des échanges nutritionnels entre le site d'infection et le reste de la plante (Garcion et *al.*, 2007). Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de la callose dans la défense de plusieurs espèces de plantes à différents pathogènes, traitées ou non par des inducteurs de résistance (Zimmerli et *al.*, 2000 ; Soylu et *al.*, 2003 et 2004 ; Hamiduzzaman et *al.*, 2005 ; Trouvelot et *al.*, 2008 ; Ahn et *al.*, 2007).

Le processus de lignification consiste en une accumulation de lignine sur l'intégralité de la paroi de la (les) cellule(s) infectée(s) ou à proximité du site d'infection. La lignine intervient dans la formation du xylème et du sclérenchyme et elle est synthétisée pendant le développement de la plante. Cependant, son accumulation est plus importante à la suite de stress biotiques ou abiotiques (Heitefuss, 2001 ; Hawkins et Boudet, 2003), où il a été noté que sa composition différait de celle produite lors de conditions non stressantes (Lange et *al.*, 1995 ; Stange et *al.*, 2001).

3.4.3. La synthèse de métabolites secondaires

Les métabolites secondaires, non essentiels aux processus métaboliques de base, sont des produits de faible masse moléculaire de nature chimique variée (terpénoïdes, dérivés d'acide aliphatique, phénoliques/phénylpropanoïdes, composés riches en soufre et/ou azote) (Dixon, 2001). Appartenant à diverses classes chimiques, Les phytoalexines sont des métabolites secondaires, de faible poids moléculaire, à activité antimicrobienne (Ferrer et *al.*, 2008). Elles se déposent rapidement autour du site d'infection, ainsi qu'en réponse à des éliciteurs (Dixon et *al.*, 2002). Leur production entraîne une réduction du développement de l'agent pathogène et de la sévérité des symptômes (Hammerschmidt, 1999). Cependant, une même plante peut synthétiser différentes phytoalexines comme par exemple le riz qui en possède 16 (Garcion et *al.*, 2007). Plusieurs études ont mis en évidence la production de phytoalexines à proximité du site d'attaque de l'agent pathogène (Kobayashi et *al.*, 2000 ; Giorcelli et *al.*, 2004 ; Verhagen et *al.*, 2010).

3.4.4. La synthèse de protéines PR

Des protéines PR (Pathogenesis-Related) sont produites par la plante à la suite de divers stress (Tuzun et Somanchi, 2006). Leur rôle dans les réponses de défense à tous les types de pathogènes a été rapporté chez un grand nombre d'espèces végétales comme le tabac, le persil, et l'orge (Van Loon *etal.*, 2006). Depuis, 17 familles de protéines PR ont été identifiées chez de nombreuses espèces végétales. Elles sont classées selon leurs structures et leurs activités biologiques (Edreva, 2005 ; van Loon et *al.*, 2006b ; Sels et *al.*, 2008).

La majorité des protéines PR possède des activités anti-microbiennes. Les PR-2 (Les β -1,3- glucanases) ainsi que les chitinases (PR-3, PR-4, PR-8 et PR-11) sont capables de dégrader les parois fongiques (Tuzun et Somanchi, 2006). À celles-ci s'ajoutent les osmotines (PR-5) qui perturbent la perméabilité membranaire des agents pathogènes (Hu et Reddy, 1997 ; van Loon, 1997), les inhibiteurs de protéases (PR-6) qui bloquent les protéines digestives et/ou les effecteurs de l'agent pathogène (Sels et *al.*, 2008), ainsi que les endoprotéases (PR-7) qui seraient impliquées dans la

dissolution des parois cellulaires microbiennes (van Loon et *al.*, 2006b). Les peroxydases (PR-9) sont impliquées aussi bien dans le métabolisme de l'auxine et la biosynthèse de l'ET que dans la formation de lignine (Lagrimini et *al.*, 1987). Les PR-10 (Les N-glycosidases) inhibent la synthèse protéique chez les agents pathogènes (Stirpe et *al.*, 1992). Les défensines, thionines et LTP (Lipid Transfer Protein), respectivement PR-12, PR-13 et PR-14, possèdent des activités antifongiques, parfois antibactériennes voire même insecticides pour les défensines (Wijaya et *al.*, 2000 ; van Loon et *al.*, 2006b ; Sels et *al.*, 2008).

Chez les monocotylédones, des PR-15 et PR-16 ont également été caractérisées. Elles sont à l'origine d' H_2O_2 cytotoxique pour les agents pathogènes et peuvent induire directement ou indirectement les réactions de défense de la plante (Donaldson et *al.*, 2001 ; Hu et *al.*, 2003).

3.4.5. Autres systèmes de défense au stress métallique

D'autres mécanismes agissant contre les effets néfastes des métaux lourds peuvent être mis en œuvre chez les plantes :

3.4.5.1. Des transporteurs membranaires de type pompe ATPasique, spécifiques du cadmium seraient présents chez *A. thaliana* et réaliseraient un efflux actif des ions métalliques à l'extérieur des cellules (Briat et Lebrun, 1999).

3.4.5.2. L'accumulation des métaux dans les feuilles âgées Juste avant leur abscission diminuerait ainsi les concentrations métalliques dans la plante. En général, la concentration dans les feuilles augmente avec l'âge. Chez *Armeriamaritimasubsp. halleri*, dans les feuilles marron (les plus âgées), les concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb sont 3 à 8 fois celles des jeunes feuilles (Dahmani-Muller, 1999). Cette observation suggère un transport interne depuis des feuilles vertes, encore actives d'un point de vue photosynthétique, vers les feuilles qui sont sur le point de tomber, préservant ainsi la photosynthèse tout en détoxiquant la plante.

3.4.5.3. Les protéines de choc thermique (Hsp) déjà réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique, seraient également responsables de la tolérance aux métaux toxiques. En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique ». L'induction des HSP par le stress protéotoxique permet à la cellule de réparer les dommages protéiques ainsi occasionnés par resolubilisation des agrégats, renaturation des polypeptides ou, si cela est impossible, par l'engagement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation (Banzet et *al.*, 1998).

3.4.5.4. La biosynthèse d'éthylène Dans les racines et les feuilles est provoquée par certains métaux, comme le cadmium. L'éthylène serait alors un messager stimulant la lignification capable de limiter les flux de métaux dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse anti-oxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase, ainsi que la synthèse de métallothionéines (Sanita di Toppi et Gabbrielli, 1999).

3.5. Les molécules de la signalisation

La transduction du signal est le résultat d'un réseau très complexe de régulation et de connexion entre les différentes voies. Les molécules de signalisation (phytohormones) interviennent dans la signalisation intercellulaire, c'est-à-dire qu'elles vont diffuser le signal émis par la cellule stressée aux cellules voisines et même au reste de la plante. Les phytohormones sont des molécules indispensables à la régulation de processus biologiques comme la croissance, le développement, la reproduction, la survie mais aussi les mécanismes de défense des plantes (Bari et Jones, 2009).

Les principales molécules impliquées dans les mécanismes de résistance sont l'AS, l'AJ et l'ET (Pieterse et van Loon, 1999 ; Glazebrook, 2001 ; Thomma et *al.*, 2001). L'acide abscissique (ABA), les brassinostéroïdes (BR), les cytokinines (CK), les gibbérellines (GA) et/ou l'auxine (AIA : acide indole-3-acétique) peuvent également intervenir dans la résistance mais leur rôle n'est pas encore bien défini car

moins étudié (Pieterse et van Loon, 2007 ; Lopez et *al.*, 2008 ; Shah, 2009 ; Truman et *al.*, 2010). Le rôle de ces différentes hormones dans les réponses de défense a récemment été décrit par Bari et Jones (2009). Le SA occupe le rôle majeur dans l'activation de défense contre les pathogènes biotrophes, tandis que le JA et ET sont préférentiellement associés à la défense contre les pathogènes nécrotrophes (Kunkel et Brooks, 2002; Turner et *al.*, 2002; Glazebrook, 2005; van Loon et *al.*, 2006).

3.5.1. L'acide salicylique (AS)

L'acide salicylique (SA) est synthétisé dans les plantes en réponse à l'attaque de divers pathogènes et constitue un élément clef pour l'établissement de la résistance locale et la SAR (Loake et Grant, 2007 ; Vasyukova et Ozeretskovskaya, 2007). Il est impliqué dans plusieurs réponses aux stress biotiques (infection par les pathogènes) et abiotiques (excès de radiation UV, des niveaux d'ozone accrus) et qui interagissent avec les espèces réactives d'oxygène dans un réseau de signalisation encore pas bien élucidé. Le SA module aussi la mort cellulaire associée à la réponse hypersensible, l'activation de la peroxydation des lipides et la génération de radicaux libres (Dempsey et *al.*, 1999; Shah et Klessig, 1999). L'acide salicylique (SA) est une molécule omniprésente de signalisation et impliqué dans beaucoup de phénomènes physiologiques des plantes (Raskin, 1992b). L'accumulation de SA en réponse au stress implique à la fois sa biosynthèse et sa libération à partir de composés conjugués. Chez les végétaux, deux voies de biosynthèse sont responsables de la production d'AS ; L'AS peut être synthétisé par la voie des phénylpropanoïdes via la PAL et/ou à partir du chorismate via l'isochorismate synthase. La concentration d'AS augmente localement et dans les parties systémiques en réponse à une infection par un agent pathogène d'origine fongique, bactérienne ou virale (Ryals et *al.*, 1996).

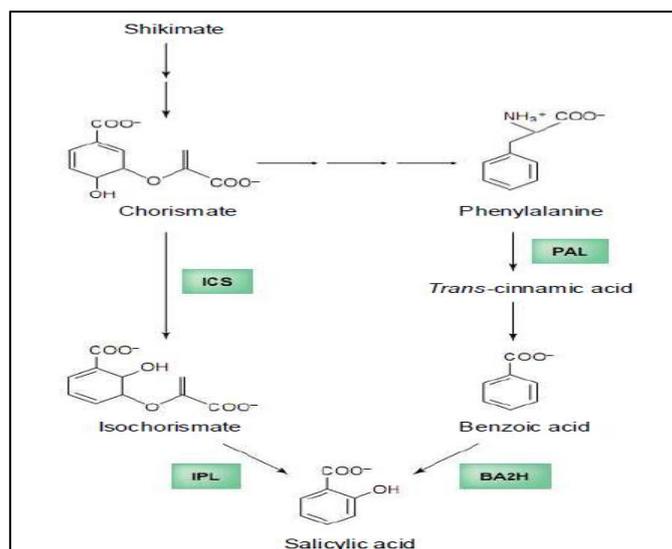


Figure 11 : Voie de biosynthèse de l'acide salicylique chez *A. thaliana*. (Shah, 2003).
 PAL : phénylalanine amonia-lyase ; IPL : isochorismate pyruvate lyase ; BA2H : benzoic-acid-2-hydroxylase ; ICS : isochorismate synthase.

3.5.2. L'acide jasmonique (AJ)

L'acide jasmonique (JA) est une molécule signal dérivée d'acides gras. Il est impliqué dans plusieurs aspects de la biologie de la plante comme le développement du pollen et de la graine, la défense contre les blessures, l'ozone, les insectes et les agents pathogènes (Turner et *al.*, 2002; Li et *al.*, 2001). L'AJ est aussi impliqué dans divers processus développementaux tels que la germination des graines, la croissance racinaire, la sénescence foliaire, l'ouverture des stomates (Bari et Jones, 2009).

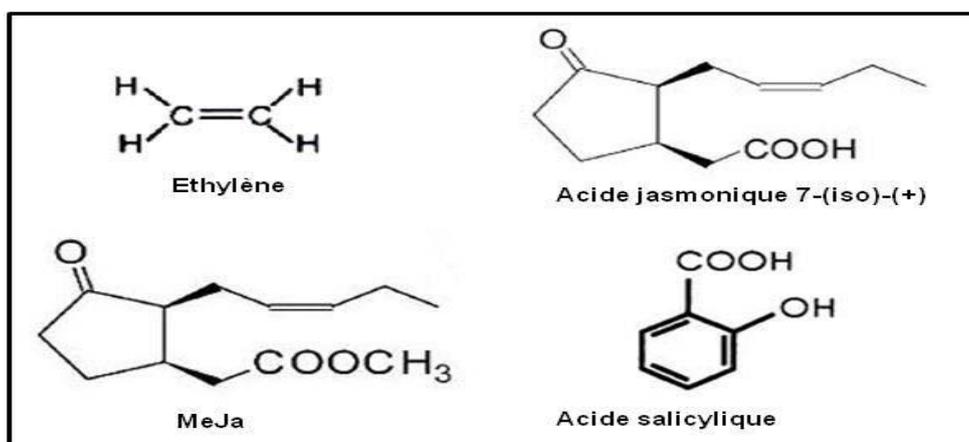


Figure 12 : Structure de l'éthylène, acide jasmonique, méthyle-jasmonate (MeJa) et acide salicylique. (Jaspard, 2011)

La voie générale de la biosynthèse de JA débute à partir de l'acide linoléique (18 :3) qui est oxydé par la lipoxygénase. L'acide linoléique serait libéré par la phospholipase à partir des lipides de la membrane plasmique tout comme chez les mammifères (Turner *et al.*, 2002). La biosynthèse du JA implique des enzymes comme la lipase, lipoxygénase (LOX), allène oxyde synthéase (AOS) et allène oxyde cyclase (AOC) (Schaller, 2001).

3.5.3. L'éthylène (ET)

L'éthylène (ET) est une phytohormone gazeuse impliquée dans la croissance et le développement de la plante. C'est une molécule volatile dérivant de la méthionine impliquée dans plusieurs processus physiologiques (abscission, germination, floraison et sénescence, nodulation racinaire, mort cellulaire programmée) et dans les réponses de défense (Bleecker et Kende, 2000 ; Panter et Jones, 2002 ; Broekaert *et al.*, 2006). Suite à des attaques par des agents pathogènes, des insectes ou suite à des blessures, il s'accumule en grande quantité surtout au niveau du site d'infection. (Thomma *et al.*, 2001). L'éthylène est aussi un régulateur des réponses de la plante suite à un stress abiotique ou biotique suite à l'attaque par un agent pathogène (Wang *et al.*, 2002).

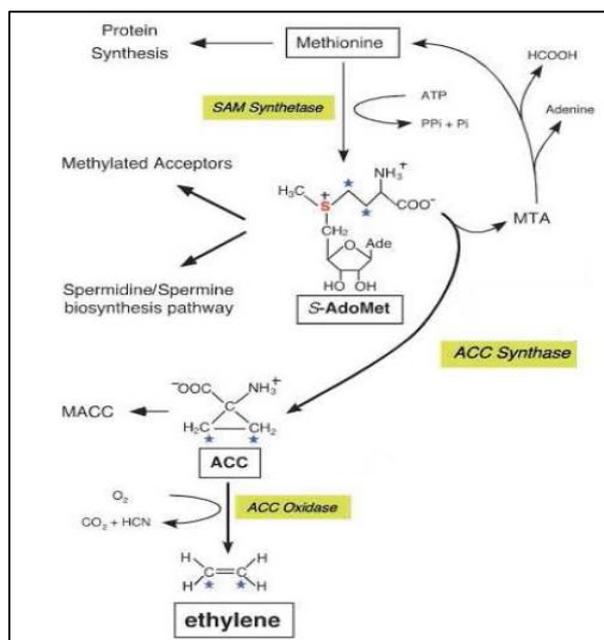


Figure 13 : Voie de biosynthèse de l'éthylène. ACC : acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique; SAM : SAdoMet ; ROS : formes actives de l'oxygène ; MACC : malonyl-ACC ; MTA : 5'méthylthioadénosine (schéma simplifié de Wang *et al.*, 2002).

Le précurseur de l'ET lors de sa biosynthèse est la S-adénosyl méthionine transformée en 1-acide carboxylique 1-aminocyclopropane (ACC) par la ACC synthase. L'ACC est ensuite transformé par l'action de l'ACC oxydase en éthylène, CO₂ et cyanide (Yang et Hoffman, 1984). L'expression des gènes d'ACC synthase et ACC oxydase a été démontrée induite chez les plantes après inoculation avec des agents pathogènes (van Loon et *al.*, 2006). Le rôle de l'éthylène dans la défense des plantes peut être différent selon le type d'agent pathogène et l'espèce de la plante. En réponse à un pathogène nécrotrophe, l'éthylène en déclenchant des réponses de défense pourrait inhiber le développement de symptômes. En revanche, il pourrait augmenter la mort cellulaire provoquée par les pathogènes biotrophes (van Loon et *al.*, 2006). En conclusion, on observe que les voies indépendantes de l'AS impliquent les voies de l'AJ et/ou de l'ET. L'infection par un agent pathogène biotrophe provoque principalement une activation de la voie de l'AS. En revanche, les réponses induites par l'AJ et/ou l'ET sont généralement activées soit après l'infection par un agent pathogène nécrotrophe, une blessure ou un traitement par une PGPR (Govrin et Levine, 2000 ; McDowell et Dangl, 2000 ; Glazebrook, 2005 ; Robert-Seilaniantz et *al.*, 2007 ; Lopez et *al.*, 2008).

3.5.4. Les autres molécules de signalisation

L'**AIA**, outre son effet positif sur la rhizogénèse, induit l'expression de trois groupes de gènes : *Aux/IAA*, *GH3* (codant des AIA-aminosynthases) et *SAUR* ('smallauxin up RNA' ; Woodward & Bartel, 2005). Il régule l'expression de gènes associés à la biosynthèse ou le catabolisme et la signalisation d'autres hormones (Papanovet *al.*, 2008). L'AIA est impliquée dans la résistance mais aussi dans la sensibilité des plantes lors de stress biotiques, son rôle étant fonction du patho-système considéré (Spaepen et *al.*, 2007 ; Llorente et *al.*, 2008 ; Kazan & Manners, 2009 ; Bari & Jones, 2009).

L'**ABA** est impliqué dans divers aspects de la croissance et du développement des plantes : germination, maturation embryonnaire, sénescence foliaire, fermeture des

stomates et adaptation aux stress environnementaux (Wasilewskaa *et al.*, 2008). Dans la plupart des cas, l'ABA a un effet négatif sur la régulation des défenses de la plante lors de stress biotiques, qu'il s'agisse d'agents pathogènes de nature biotrophe ou nécrotrophe (Lopez *et al.*, 2008 ; Bari & Jones, 2009). Par ailleurs, l'ABA active la fermeture des stomates, ce qui réduit certaines infections bactériennes ou fongiques (champignons nécrotrophes), les stomates pouvant être une voie de pénétration dans la plante pour ces agents pathogènes (Ton & Mauch-Mani, 2004 ; Mauch-Mani & Mauch, 2005 ; Melotto *et al.*, 2006 ; Jalloul *et al.*, 2009). Il est également impliqué dans le dépôt de callose, la production de FAOs et la régulation de l'expression de gènes de défense (Bari & Jones, 2009 ; Jalloul *et al.*, 2009).

Les **GA** favorisent la croissance des plantes par la stimulation de la dégradation des protéines DELLA, ces dernières induisant l'expression de gènes codant des enzymes de détoxification des FAOs (catalases et peroxydases), régulant ainsi les taux de FAOs lors de stress (Achard *et al.*, 2008). Les GA confèrent à la plante une résistance contre les agents pathogènes biotrophes mais augmentent sa sensibilité lors d'attaques par des agents nécrotrophes.

Les **CK** sont impliquées dans la différenciation vasculaire, la balance en nutriments, la croissance des racines, tiges et inflorescences, la sénescence foliaire (Muller & Sheen, 2007). Leur rôle dans les mécanismes de défense est peu connu mais il semble qu'elles soient impliquées dans les réponses mises en place chez l'arabette lorsque celle-ci est attaquée par *Plasmodiophorab Brassicae*: une régulation négative des gènes gouvernant leur homéostasie a été rapportée (Siemens *et al.*, 2006). Tout comme l'AIA, les CK sont capables de bloquer la traduction des ARNm de certaines protéines PR comme la β -glucanase et la chitinase (Spaepen *et al.*, 2007).

Les **BR** sont impliqués dans divers processus physiologiques (germination, division cellulaire, élongation, floraison, sénescence), ainsi que dans les réponses induites à la suite de stress abiotiques (Bajguz, 2007). Plusieurs études ont été menées

afin de déterminer s'ils interviennent dans les mécanismes de défense lors de stress biotiques (Nakashita *et al.*, 2003)

2.5.5. Interconnexions entre les voies de signalisation

Les mécanismes de régulation de la balance hormonale ont récemment été décrits par Kuppusamy *et al.* (2009). Les interactions peuvent se faire selon trois modèles.

Régulation primaire. Ce concept est peu présent chez les plantes. Il s'agit de deux voies distinctes qui ont pour produit final la même molécule signal. Le meilleur exemple de régulation primaire positive est l'interaction entre l'AJ et l'ET.

Régulation secondaire. Elle consiste dans le fait qu'une voie de signalisation régule les taux ou la perception des molécules transitoires d'une seconde voie.

Régulation tertiaire Dans ce cas, ce sont les produits finaux de deux voies distinctes qui interagissent ensemble.

3.6. Les résistances systémiques

En plus des barrières physiques et chimiques préformées, les plantes possèdent des systèmes de reconnaissance et de réponses de défense induites qui sont déclenchées immédiatement après le premier contact avec des molécules étrangères et sont renforcées par l'interaction prolongée avec les agents pathogènes (Göhre et Robatzek, 2008). Les plantes ont la capacité d'induire des réponses de défense qui vont arrêter ou ralentir la croissance de l'agent pathogène (Jones et Dangl, 2006). L'ensemble de ces mécanismes de défense induite permet à la plante de résister plus ou moins à l'agent pathogène qui les déclenche. Mais une conséquence de cette première réaction peut être une protection ultérieure contre d'autres agresseurs. On parle alors de résistance induite.

Les deux formes les mieux définies de résistance systémiques sont la résistance systémique acquise (SAR) et la résistance systémique induite (ISR). Ces deux types de résistance peuvent être différenciés par la nature de l'agent inducteur et les voies régulatrices impliquées (Schenk *et al.*, 2000).

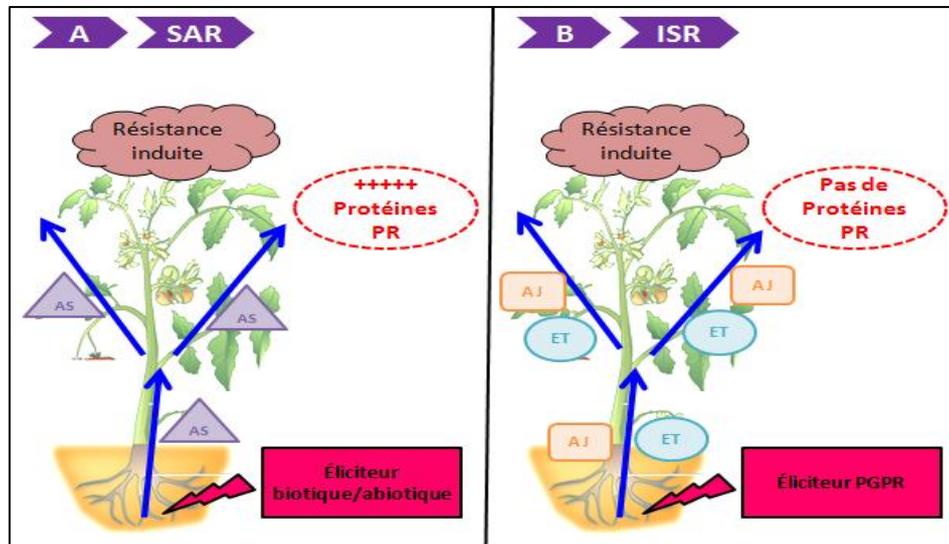


Figure 14 : Comparaison des deux formes de résistance induite caractérisées chez les plantes. (Vallad et Goodman, 2004).

La résistance systémique acquise (A) est induite par l'exposition des racines ou des tissus foliaires aux éliciteurs abiotiques ou biotiques, est dépendante de l'acide salicylique et associée à l'accumulation de protéines PR. La résistance systémique induite (B) est induite par l'exposition de racines aux souches de rhizobactéries stimulant la croissance des plantes, est dépendante des phytohormones éthylène et acide jasmonique, indépendante de l'acide salicylique et n'est pas associée à l'accumulation de protéines PR.

3.6.1. La SAR

La SAR peut être déclenchée en exposant la plante aux microorganismes avirulents, non virulents ou bien artificiellement avec des produits chimiques comme l'acide salicylique, ou l'acide 2,6 -dichloro-isonicotinique (INA) (Sticher *et al.*, 1997). Une réaction d'hypersensibilité est souvent observée localement, mais n'est absolument pas nécessaire. La SAR est associé à une accumulation de protéines de défense du groupe

des PR protéines dépendant de l'acide salicylique. Selon la plante et l'éliciteur, un certain temps est nécessaire pour établir la SAR, qui correspond au temps nécessaire pour l'accumulation simultanée des protéines PR et de l'acide salicylique dans toute la plante.

3.6.2. L'ISR

La résistance ISR est induite par le contact des racines de la plante avec des bactéries bénéfiques, les « Plant Growth Promoting Rhizobacteries, PGPR », notamment du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*. On n'observe pas de synthèse de protéines de défense mais la plante est préparée à des attaques ultérieures et réagit plus rapidement par des mécanismes de défense, c'est le phénomène du « priming ». La signalisation à distance ne dépend pas de l'acide salicylique mais implique l'éthylène et le jasmonate (Pieterse et *al.*, 1998).

4. Dynamique des ROS dans les cellules végétales

4.1. La toxicité de l'oxygène : les espèces réactives de l'oxygène

Bien que l'oxygène soit nécessaire à la vie aérobie, son métabolisme peut entraîner des effets négatifs sur l'organisme, effets associées aux perturbations de l'équilibre oxydo-réducteur. La réduction partielle de l'oxygène fait apparaître des intermédiaires biochimiques hautement réactifs, qui peuvent endommager, voire être létaux pour les organismes (Gutteridge and Halliwell, 2000). Contrairement au dioxygène relativement peu réactif, du fait de ses deux électrons (spin parallèle) non appariés, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) possèdent une configuration électronique spécifique les rendant très réactives. Il existe des radicaux primaires, qui dérivent de l'oxygène par des réductions monoélectroniques, tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), les peroxydes (ROO^{\cdot}) ou les alkoxydes (RO^{\cdot}). Un radical est une substance chimique (atome ou molécule) qui possède un électron non apparié, ce qui lui confère une grande instabilité et une forte réactivité. D'autres espèces dérivées de l'oxygène, dites espèces actives non radicalaires de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O_2), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'ozone (O_3), sont aussi réactives et

peuvent être des précurseurs de radicaux. L'oxygène singulet résulte d'une inversion de spin d'un électron périphérique non apparié de l'oxygène moléculaire par transfert d'énergie, notamment avec les chlorophylles triplet (Noguchi, 2002; Krieger-Liszkay, 2005). $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , et OH^{\cdot} sont issus de réductions faisant intervenir un transfert d'électron.

Ces ROS possèdent des caractéristiques bien distinctes. Le H_2O_2 est caractérisé par une stabilité et une concentration dans les tissus cellulaires plus élevées que les autres ROS, de l'ordre de micromolaire au millimolaire en fonction des différents compartiments cellulaires (Cheeseman, 2006). Au contraire, les autres formes ont une durée de vie très courte et présentent des concentrations plus faibles. Leur réactivité avec les autres constituants cellulaires, directement corrélée à leur différence de structure électronique, est, elle aussi, variable, avec une oxydation rapide de tous les types de composés cellulaires par OH^{\cdot} , alors que $O_2^{\cdot-}$ agit préférentiellement sur les protéines de types Fe-S et 1O_2 sur les liaisons doubles des acides gras polyinsaturés. Par ailleurs, la chimie de l'azote peut aussi donner lieu à la formation d'espèces réactives nitrées (RNS, ReactiveNitrogenSpecies), correspondant à des formes radicalaires (l'oxyde nitrique (NO^{\cdot}), le dioxyde de nitrogène (NO_2^{\cdot})) ou non radicalaires (anion nitroxyde (NO^-), peroxydinitrite ($ONOO^-$)). Les RNS peuvent aussi être la cause de dommages oxydatifs, cependant les travaux présentés dans ce manuscrit se focaliseront sur le cas des ROS (Moller et *al.*, 2007).

4.2. Production de ROS

Chez les plantes, les ROS sont continuellement produites par différentes voies métaboliques, particulièrement au niveau des chloroplastes, des mitochondries, des peroxyosomes, et du réticulum endoplasmique. La réponse des plantes aux ROS dépend à la fois de la nature du ROS, de sa concentration, de son site de production, ainsi que de son interaction avec le contexte cellulaire.

4.2.1. Formation de ROS dans les chloroplastes

Le chloroplaste est le siège de la photosynthèse, processus qui permet aux plantes de synthétiser des glucides en exploitant l'énergie lumineuse et le CO₂ atmosphérique. Toutefois, ce processus indispensable à une vie photo-autotrophe est également producteur d'espèces réactives de l'oxygène.

La première source de ROS se situe au niveau du photosystème II (PSII). Au niveau du centre réactionnel, l'absorption d'un photon par la chlorophylle a, permet d'augmenter son énergie et libérer ainsi rapidement un électron, qui sera ensuite transférés vers une chaîne de transporteurs d'électrons de la membrane des thylakoïdes. La chlorophylle se retrouve à l'état triplet excité (Chl*) et peut ainsi réagir avec l'oxygène moléculaire pour former de l'oxygène singulet (¹O₂) fortement oxydant (Telfer et *al.*, 1994).

En plus de l'oxygène singulet, l'anion superoxyde (O₂⁻) est produit dans les chloroplastes au niveau du photosystème I (PSI) (Asada, 2006) et du photosystème II (PSII) (Zhang et *al.*, 2003). Normalement, le flux d'électrons provenant du centre réactionnel PSI est dirigé vers l'accepteur NADP⁺, qui, une fois réduit, participe à la réduction du CO₂ au niveau du cycle de Calvin. Lorsque ce flux d'électrons est trop important, il est redirigé vers la Ferrédoxine (Fdx) qui utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, ce qui conduit à la formation importante d'anion superoxyde au niveau du site de réduction du PSI (réaction de Mehler) (Asada, 1999). Une production de superoxyde est également possible au niveau du PSII, avec la réduction de l'oxygène moléculaire par les plastoquinones QA (Navari-Izzo et *al.*, 1999), et QB (Zhang et *al.*, 2003). Bien que cette source de O₂⁻ au niveau du PSII ne cause pas de dommage direct aux protéines D1 et D2 (les deux sous unités majeures du centre réactionnel du PSII) ni aux pigments (Liu et *al.*, 2004), il est possible que cela influence d'autres sous unités du PSII. Le PSI est généralement considéré comme la source majeure d'O₂⁻. Une fois produit, ce superoxyde se transforme, spontanément ou par l'action de superoxyde-dismutases, en H₂O₂ dans le stroma (Edreva, 2005). Ce H₂O₂ pourra à son tour être transformé en OH⁻ en présence de Fe²⁺ par la réaction de

Fenton, ou bien entrer dans le cycle de l'ascorbate-glutathion et être transformé en H₂O et O₂ (Asada, 1999; Dat et *al.*, 2000).

4.2.2. Formation de ROS dans les mitochondries

Les mitochondries jouent un rôle primordial dans la bioénergétique des cellules, grâce au processus de respiration situé au niveau de leur membrane interne. Ce processus, rassemblant des complexes protéiques qui assurent un transfert de protons et/ou d'électrons, est appelé chaîne respiratoire.

Les mitochondries représentent néanmoins une source significative de ROS dans les cellules, même lors du fonctionnement normal de l'organisme. En effet, une part de l'oxygène consommé par les cellules est convertie en ion superoxyde. Becker (2004) a montré qu'environ 5% de l'O₂ absorbé était transformé en superoxyde, alors que le restant était consommé par la respiration et réduit en eau.

Cette production est causée par la fuite des électrons inhérente au fonctionnement même de la chaîne respiratoire et à leur fixation sur l'oxygène moléculaire (O₂), qui conduit à la réduction incomplète de l'O₂ et à la formation de ROS (Brookes, 2005). Cette fuite d'électrons se fait au niveau de la NADH déshydrogénase appartenant au complexe I, ainsi qu'au niveau du cytochrome *bc1* du complexe III. Cette production de ROS est indissociable du processus respiratoire et fortement modulée par les conditions environnementales (Moller, 2001). Le superoxyde formé sera ensuite rapidement transformé en H₂O₂ par dismutation spontanée ou par action de la SOD mitochondriale.

4.2.3. Formation de ROS dans les peroxysomes

Les peroxysomes sont impliqués, selon leur localisation tissulaire, dans un grand nombre de fonctions cellulaires essentielles (del Rio et *al.*, 2002). Les peroxysomes situés dans les tissus de stockage et les graines (appelés glyoxysomes) sont spécialisés dans la dégradation des lipides de réserves et dans leur transformation en acides organiques pour la respiration et la néoglucogénèse. Ceux présents au niveau des feuilles sont plutôt spécialisés dans la photorespiration (Douce and Heldt, 2000). Les

peroxysomes sont également responsables de la détoxification de substances organiques toxiques par l'action d'oxydases, ou de molécules de peroxyde d'hydrogène *via* des catalases (Schrader and Fahimi, 2006). En effet deux sites de production de superoxyde ont été identifiés. Le premier concerne le catabolisme de la xanthine, essentiel au turnover des nucléotides, de l'ARN et de l'ADN. Le superoxyde est produit lors de l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine en acide urique par la xanthine oxydase. Le second site de production de O_2^- implique une chaîne de transport d'électrons située au niveau des membranes peroxysomales, permettant la régénération de NAD^+ et $NADP^+$, essentiels au métabolisme oxydatif présent dans les peroxysomes (del Rio et *al.*, 2003).

Il existe également plusieurs sources de H_2O_2 dans les peroxysomes. La première résulte de la photorespiration active à la lumière, et dont l'intensité est fonction de l'activité photosynthétique de la plante. L'enzyme Rubisco, qui permet la fixation du CO_2 dans le cycle de Calvin, peut en effet réagir avec l' O_2 présent dans les chloroplastes. Le produit de cette oxygénation (phosphoglycolate) est ensuite exporté dans les peroxysomes et impliqué dans des réactions qui entraînent la production de H_2O_2 , au cours de la transformation du glycolate en glyoxylate par la glycolate oxydase. Chez les plantes, les peroxysomes jouent également un rôle primordial dans la β -oxydation des acides gras, En effet, la β -oxydation peroxysomale est impliquée dans la production de molécules signal, telles que le jasmonate. Ces processus de β -oxydation s'accompagnent de la production de H_2O_2 lors de la réaction catalysée par les acyl-CoA oxydases (Nyathi and Baker, 2006).

4.2.4. Formation de ROS dans le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique assure de multiples fonctions dans les cellules. Il existe deux types de réticulum : le réticulum rugueux recouvert sur sa surface externe de ribosomes, et le réticulum lisse, qui joue un rôle important dans la synthèse des lipides et des stéroïdes, dans le métabolisme des glucides, ainsi que dans la détoxification des cellules. Cette fonction de détoxification fait intervenir de nombreux

processus oxydants, tels que des oxydations, des hydroxylations, des déalkylations, des déaminations, des déhalogénations et des désaturations. La majorité des réactions d'oxydation sont catalysées par des cytochromes P450 mono-oxygénases, fonctionnelles seulement en présence de NADPH-cytochrome réductases, flavoprotéines à FAD ou FMN, qui assurent le transfert d'électrons du NADPH au cytochrome. Ces réactions génèrent des ROS (Coleman et *al.*, 1997).

4.3. Production de ROS dans les interactions cellule-environnement

Parallèlement aux ROS résultant de l'activité intrinsèque de nombreuses voies métaboliques, les plantes génèrent également des ROS lors de l'activation de diverses oxydases ou peroxydases, en réponse à des fluctuations environnementales. Ces contraintes externes peuvent être soit biotiques, c'est-à-dire imposées par un autre organisme, soit abiotiques, c'est-à-dire dues à des fluctuations de l'environnement physique ou chimique (Ramel, 2009).

4.3.1. Production de ROS dans les interactions biotiques

Les plantes sont constamment exposées à des bio-agresseurs, insectes, microorganismes potentiellement pathogènes ou herbivores. Leur survie est donc associée à une multitude de stratégies afin de dissuader les herbivores ou limiter la nocivité des microorganismes. Même si les stratégies de défense varient en fonction de la nature du bioagresseur, il existe des caractéristiques communes telles que le « burst oxydant », qui correspond à une accumulation précoce, rapide et importante de ROS au niveau du site d'invasion. Les principaux ROS produits dans ce pic de réponse au stress biotique sont le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, et le radical hydroxyle. Ces derniers sont essentiels à la transduction du signal à l'origine de changements physiologiques majeurs, tels que la polarité membranaire, l'acidification du pH intracellulaire ou encore l'activation d'enzymes telles que des kinases ou phospholipases. L'ensemble de ces réponses de défense sont généralement accompagnées de lésions nécrotiques au niveau du site d'infection, qui réduisent la pénétration de l'agresseur et constituent les mécanismes de résistance locale définie

sous le terme de réaction d'hypersensibilité, ou HR (Holub et *al.*, 1994). Il existe, en situation de stress biotiques, de nombreuses enzymes capables de produire du H₂O₂, telles que les peroxydases pH-dépendantes de la paroi cellulaire (Bestwick et *al.*, 1997), qui fonctionnent uniquement en présence de molécules réductrices, comme les cystéines et le glutathion. En condition normale, les peroxydases permettent de dissiper le H₂O₂ or, au cours d'une alcalinisation de l'apoplaste caractéristique de l'infestation d'un pathogène, elles peuvent devenir productrices de H₂O₂.

4.3.2. Dynamique des ROS en situation de stress abiotique

L'équilibre entre la production et la dégradation des ROS peut également être perturbé par un grand nombre de facteurs de stress environnementaux abiotiques, qui peuvent être de nature chimique (lumière, température) ou xénobiotique ou physico-chimique (sécheresse, salinité).

Ainsi, dans les tissus photosynthétiques sous conditions de forte intensité lumineuse, le taux d'absorption de l'énergie lumineuse par les pigments photosynthétiques excède le taux de fixation du CO₂ dans le cycle de Calvin. Ces conditions entraînent une régulation de la chaîne de transport d'électrons des thylakoïdes avec une réduction de la photolyse de l'eau et le maintien à l'état réduit des photosystèmes PSI et PSII, qui aboutissent à l'inactivation du PSII par photoinhibition. Lorsque l'énergie lumineuse est en excès, les plastoquinones QA et QB ont donc un état sur-réduit empêchant la séparation complète de charge entre la chlorophylle P680 et la phéophytine. Ceci conduit à la formation de chlorophylle triplet, et par transfert d'énergie, à celle d'oxygène singulet. Ces fortes intensités lumineuses peuvent donc endommager directement le PSII et inhiber les réparations en produisant des ROS (Takahashi and Murata, 2008).

Les faibles et fortes températures, la sécheresse, ainsi que les fortes salinités, limitent fortement la fixation de CO₂ et sont, par conséquent, également responsables de l'induction du processus de photoinhibition (Murata et *al.*, 2007). Ce processus

réduit le transport d'électrons dans la chaîne photosynthétique et accroît la quantité de superoxyde, d'oxygène singulet et de peroxyde d'hydrogène dans les chloroplastes. Les fortes températures sont responsables de l'inactivation de la Rubiscoactivase, essentielle à l'activité de la Rubisco. La réaction de carboxylation catalysée par cette Rubisco est alors réprimée, car la spécificité de la Rubisco pour le CO₂ est réduite. L'accumulation de ROS après une hausse de température a été démontrée chez la moutarde ou le tabac (Dat et *al.*, 2000). Le froid limite la mobilité de la plastoquinone en diminuant la fluidité des membranes, et donc en réduisant la vitesse de réaction des enzymes de la phase obscure. Ces inductions de ROS ont majoritairement lieu au niveau des chloroplastes, mais également au niveau des mitochondries. L'acclimatation des plantes aux conditions de sécheresse ou de forte salinité leur permet de réguler leur transpiration à l'aide du système de fermeture des stomates. Cependant, cette fermeture réduit également l'apport de CO₂ aux cellules, qui conduit à l'inhibition de la photosynthèse, et par voie de conséquence, à la production de ROS dans les chloroplastes (Leprince et *al.*, 1994).

4.4. Dualité fonctionnelle des ROS

Longtemps considérés comme des molécules toxiques responsables de multiples dommages cellulaires, les ROS se sont aussi révélés essentiels dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, ainsi que dans les voies de signalisation cellulaire (Scandalios, 2005). Les ROS sont donc maintenant considérés à la fois comme des produits des métabolismes aérobie et comme des régulateurs du métabolisme et des systèmes de défenses. Ainsi, la production basale et maîtrisée de ROS lors d'un fonctionnement normal des processus métaboliques n'a pas nécessairement d'effet néfaste ou délétère sur le fonctionnement de l'organisme. Par contre, en présence de perturbations, cette production peut devenir incontrôlée et générer un stress oxydatif. Le terme de stress oxydatif est aussi employé lorsque le contenu cellulaire en ROS dépasse les capacités de défense antioxydantes, soit par une augmentation de la production de ROS, soit par une diminution de ses capacités de défense, soit par les

deux mécanismes combinés. Cette rupture de l'équilibre redox est à l'origine de dommages au niveau des structures et des fonctions biologiques (Ramel, 2009).

4.4.1. Toxicité des ROS

4.4.1.1. Oxydation des acides nucléiques

L'importance informationnelle de l'ADN impose aux cellules de tolérer le moins de dommages possibles, afin d'assurer la survie et la fitness de l'organisme. De plus, contrairement aux lipides et aux protéines, une fois endommagée, la molécule d'ADN ne peut pas être remplacée et doit être réparée. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent induire de nombreuses lésions à la molécule d'ADN, en causant des délétions, des mutations et d'autres modifications génétiques létales. L'attaque d'un radical peut produire des cassures de brin, mais aussi de nombreuses modifications au niveau des bases puriques ou pyrimidiques ainsi qu'au niveau du désoxyribose. Ces modifications peuvent entraîner la formation de pontages covalents ADN-ADN ou ADN-protéines. L'oxydation de l'ADN peut également conduire à des modifications de méthylation des cytosines, pouvant avoir des conséquences sur la régulation de l'expression des gènes (Halliwell, 2006). Toute modification de la structure chimique de l'ADN risque d'entraîner un changement dans l'information génétique. Les protéines synthétisées pourront alors être non-fonctionnelles dans la cellule initialement endommagée, mais aussi dans toute la descendance. Le radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) présente la plus importante réactivité avec les bases et les sucres constituant la molécule d'ADN (Evans et *al.*, 2004), tandis que l'oxygène singulet attaque en priorité la guanine pour la convertir en thymine. Au contraire, le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde ne semblent pas avoir d'effet (Moller et *al.*, 2007).

4.4.1.2. Oxydation des lipides

Les acides gras polyinsaturés entrent dans la composition des membranes galactolipidiques (membrane thylakoïdienne) et phospholipidiques des plantes. Ces acides gras sont particulièrement sensibles à l'attaque par l'oxygène singulet et par les

radicaux hydroxyles, donnant des hydroperoxydes lipidiques (Halliwell et Gutteridge, 1999).

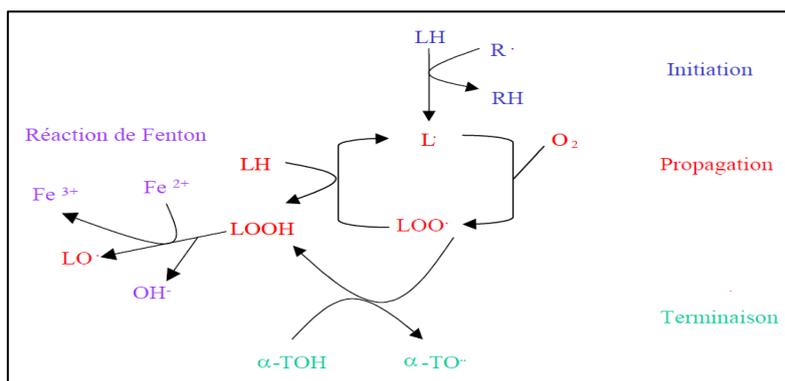


Figure 15 : Réactions du cycle de peroxydation lipidique
(basé sur Waldeck and Stocker, 1996)

L'attaque oxydative par OH^\cdot , des lipides membranaires est un processus de réactions radicalaires en chaîne, appelé «peroxydation lipidique», au cours duquel les acides gras polyinsaturés entrant dans la composition des phospholipides membranaires sont oxydés. La peroxydation des lipides se fait en trois étapes distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison. La réaction d'initiation entre un acide gras polyinsaturé (LH) et le radical hydroxyl (R^\cdot) conduit à une déshydrogénation de l'acide gras formant ainsi un nouveau radical libre carboné possédant un électron libre (L^\cdot). La réaction de propagation permet ensuite à l'oxygène moléculaire de réagir avec le radical précédent pour former le radical peroxyde (LOO^\cdot). Ce dernier arrache à son tour un atome d'hydrogène à un nouvel acide gras pour former un hydroperoxyde (LOOH). Une fois que le radical hydroxyle initie la réaction, il crée un produit radicalaire capable de réagir en chaîne avec l'oxygène moléculaire. L'hydroperoxyde est relativement instable et peut, en présence de fer, participer à la réaction de Fenton responsable de la formation du radical hydroxyl (OH^\cdot). La formation de dérivés d'oxydation dans la bicouche lipidique, tels que le 4-hydroxy-2-nonenal, le malondialdéhyde (MDA) ou les phytostanes, entraînent des perturbations de la micro-architecture des membranes, altère leur perméabilité et peut réagir avec les fonctions amines des lipides, des protéines et de l'ADN, ainsi qu'avec les fonctions thiols des protéines. En effet, ces produits de peroxydation lipidiques sont

des espèces électrophiles réactives (RES) qui peuvent se lier de façon covalente aux protéines et ainsi les endommager (Farmer et Davoine, 2007).

4.4.1.3. Oxydation des protéines

L'attaque oxydante des protéines cause de nombreuses modifications allant de la simple oxydation d'un acide aminé jusqu'à la fragmentation des chaînes peptidiques (Moller et *al.*, 2007). Presque tous les acides aminés sont susceptibles d'être oxydés, mais les acides aminés soufrés (cystéine, méthionine), ainsi que les acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane), sont les plus sensibles. En effet, l'addition d'oxygène singulet à ces résidus sensibles conduit à la formation de multiples endo et hydroperoxydes, bien connus dans le cas des résidus Trp et Tyr, et encore mal connus pour His, Met et Cys (Davies, 2004).

4.4.1.4. Marqueurs biochimiques du stress oxydatif

En fonction de l'espèce réactive considérée ($^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot) et de la cible moléculaire (protéines, lipides, glucides, acides nucléiques), qui peut présenter des sensibilités marquées (lipides insaturés, acides aminés et composés aromatiques, fonctions -SH et $\text{CH}_3\text{-S-}$), les modes d'action des ROS et les produits terminaux d'oxydation formés seront différents. Parmi les produits terminaux obtenus, certains sont souvent utilisés comme marqueurs du stress oxydatif. C'est le cas du malondialdéhyde (MDA) et des phytoprostanes pour les lipides, des protéines carbonylées pour les protéines et de la 8-oxo-guanine ou 8-oxo-désoxyguanosine pour l'ADN. La signature des différents produits de peroxydation lipidique présents dans les cellules peut également donner des indications sur le type de ROS responsable des dommages et du stress oxydatif. Ainsi, Triantaphylides et *al.*, (2008) ont réussi, par HPLC-MS, à discriminer quantitativement les peroxydations lipidiques causées par les radicaux libres ou par l'oxygène singulet. Toutefois, il existe un grand nombre de produits d'oxydation autres que ceux précédemment cités, ce qui rend difficile le choix de marqueurs caractéristiques (Ramel, 2009).

4.4.2. Implication des ROS dans les processus de transduction de signal

L'accumulation de ROS intracellulaires en situation de stress environnementaux conduit à l'activation de mécanismes de défense, par augmentation d'activités enzymatiques antioxydantes ou de mécanismes de réparation des dommages oxydatifs. L'activation de tels mécanismes de défense n'est possible qu'après des étapes de détection, de propagation et de transduction de signaux provoquant une réponse cellulaire appropriée. Cette réponse prendra naissance au niveau du noyau avec la modification de l'expression de gènes-clés de défense, essentiels à l'adaptation des plantes aux milieux fluctuants. Or, les ROS sont aussi des acteurs importants de ces relations stress-réponse (Ramel, 2009).

4.4.2.1. Régulation de l'expression des gènes par les ROS

Par l'utilisation de multiples techniques moléculaires, il a été mis en évidence chez les plantes l'activation et la répression d'un grand nombre de gènes liés à la production de ROS (Scandalios, 2005). Cependant, sous des conditions environnementales de stress, différents ROS peuvent être produits simultanément, et par conséquent, il est difficile de tester les effets de chacun d'eux séparément. Mais des stratégies expérimentales ont permis de définir des conditions permettant d'étudier les effets différentiels des caractéristiques chimiques des ROS, ainsi que leur site de production cellulaire, ont des effets signalétiques distincts qui permettront d'activer des réponses spécifiques au stress afin d'optimiser l'efficacité de la défense (Gechev *et al.*, 2006).

4.4.2.2. Mécanismes de transduction des signaux ROS

Parmi les différents ROS, le H₂O₂ semble être le mieux adapté à jouer le rôle de molécule signal, du fait d'une stabilité et une durée de vie supérieures aux autres ROS, et de sa capacité de diffusion à travers les membranes. Malgré les certitudes concernant les capacités du H₂O₂ à affecter le transcriptome, les travaux actuels ne sont pas en mesure de démontrer que le H₂O₂ est réellement une molécule signal ou si ce sont les molécules oxydées par les ROS qui initient le signal intracellulaire

(Desikan et *al.*, 2004). D'autres études ont également montré l'existence de voies de signalisation spécifiques de l'oxygène singulet et du superoxyde (Kim et *al.*, 2007). Malgré l'importance démontrée des ROS dans la signalisation cellulaire, de nombreux aspects restent donc mal connus. Cependant, il existerait au moins trois modes de transmission de signal permettant aux cellules de détecter la présence de ROS: des protéines réceptrices, des facteurs de transcription sensibles aux variations de l'état redox des cellules, ou des protéines phosphatases sensibles à l'inhibition par les ROS (Ramel, 2009).

5. Mécanismes de régulation et de détoxification des ROS

Les caractéristiques propres à chaque plante, et notamment leur génotype, conditionnent le niveau de toxicité du xénobiotique (Ramel et *al.*, 2009b). La majorité des xénobiotiques génèrent *in planta* un stress oxydatif.

De nombreuses études ont mis en évidence que la lutte contre les effets délétères des ROS est assurée par différents systèmes de défense, chargés non seulement de capter et de neutraliser les ROS, mais aussi d'éliminer et de remplacer les molécules endommagées (Foyer et Noctor, 2005). Ces systèmes de défense sont présents dans le cytosol, mais également dans les différents organites, tels que les chloroplastes (Asada, 2006), les mitochondries (Moller et *al.*, 2007), les peroxysomes (Del Rio et *al.*, 2006) et le réticulum endoplasmique (Ozgun et *al.*, 2014). Les systèmes antioxydants assurent trois fonctions majeures. La première consiste à empêcher la formation ou l'amplification des ROS par "quenching" (désactivation de molécule) de biomolécules excitées telles que les chlorophylles ou l'oxygène singulet, afin d'éviter la surexcitation et le transfert d'énergie à l'O₂. La seconde fonction repose sur le processus de "scavenging" (détoxification chimique) par des molécules antioxydantes impliquées dans des processus enzymatiques ou non-enzymatiques. Les molécules antioxydantes majoritairement utilisées dans les cellules sont le glutathion et l'ascorbate (Foyer et Noctor, 2011 ; Noctor et *al.*, 2012). Le glutathion et l'ascorbate interviennent en particulier dans le cycle de Halliwell-Asada pour la dégradation du

H₂O₂ (Foyer et Noctor, 2009). La troisième fonction des systèmes antioxydants assure la réparation des dommages oxydants et l'élimination des molécules endommagées.

5.1. Molécules antioxydantes

Le rôle et la localisation subcellulaire de l'ensemble des molécules antioxydantes ont été récapitulés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Rôles et localisations subcellulaires des principales molécules antioxydantes (Ramel, 2009).

Molécule antioxydante	Rôle	Localisation
Ascorbate	* Désactivation de O ₂ ⁻ et OH. * Régénération d'antioxydants	Chloroplaste, mitochondrie, peroxyosome, apoplaste, cytosol
α-tocophérol	* Détoxification des radicaux peroxydes et alkoxydes * Désactivateur de 1O ₂ * Elimination des déchets de la peroxydation lipidique	Membrane plasmique et chloroplastique
Glutathion	* Piégeur de ROS * Détoxification des xénobiotiques * Stabilisation des membranes * Elimination des déchets d'oxydation	Chloroplaste, mitochondrie, peroxyosome, apoplaste, cytosol
Caroténoïdes	* Désactivateur de 1O ₂ * Quencher de chlorophylle triplet	Chloroplaste, plaste
Flavonoïdes	* Désactivateur de 1O ₂ * Piégeur H ₂ O ₂ et HO.	Cytosol, vacuole
Polyamines	* Désactivateur de 1O ₂ * Piégeur O ₂ ⁻ et OH.	Noyau, plaste, mitochondrie, cytosol
Proline	* Stabilisation des membranes et des protéines * Désactivateur de 1O ₂ * Piégeur de ROS	Cytosol
Thiorédoxines	* Désactivateur de 1O ₂ * Piégeur H ₂ O ₂ * Réduction des résidus Cys oxydés	Chloroplaste, cytosol, mitochondrie, réticulum endoplasmique
Résidus méthionine	* Piégeur de ROS	
Polyols	* Piégeur de OH [·]	
Sucres solubles	* Piégeur de OH [·]	

5.2. Voies métaboliques antioxydantes

En parallèle avec la diversité des molécules antioxydantes, il existe un réseau complexe et hautement régulé d'enzymes antioxydantes, présentes dans plusieurs compartiments cellulaires, afin de maintenir un niveau de ROS viable pour l'organisme (Ramel, 2009).

5.2.1. Superoxyde dismutase

Les superoxyde-dismutases (SOD) jouent un rôle central dans la défense contre les ROS. Elles éliminent, par une réaction de dismutation, l'ion superoxyde, formant à partir de deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme permet ainsi de diminuer le risque de formation de radical hydroxyle généré à partir du superoxyde au cours de la réaction de Haber-Weiss catalysée par des ions métalliques comme le fer ou le cuivre (Ramel, 2009).

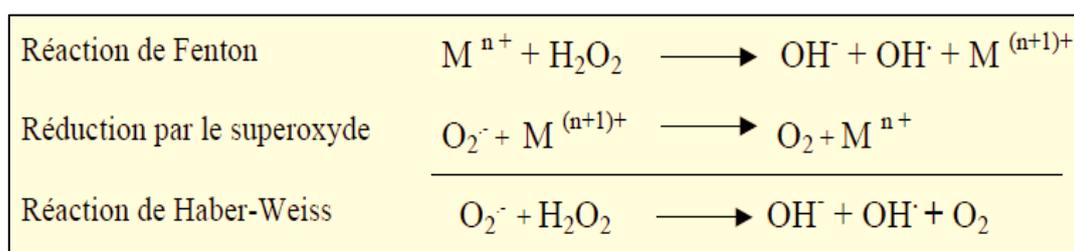


Figure 16 : Formation de radicaux hydroxyles par la réaction de Haber-Weiss (Ramel, 2009).

5.2.2. Catalase

La catalase (CAT) est une enzyme importante dans la protection face au stress oxydant chez tous les organismes aérobies. Elle catalyse, de façon extrêmement rapide, la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, protégeant ainsi les cellules des effets oxydants causés par une augmentation de H_2O_2 . Les catalases sont les seules enzymes capables de dégrader le H_2O_2 sans molécule réductrice, limitant ainsi la consommation d'énergie. Comme dans le cas des SOD, de nombreuses

isozymes de CAT sont retrouvées chez les plantes, contrairement aux animaux qui souvent en présentent qu'une seule forme (Guan and Scandalios, 1996).

5.2.3. Enzymes du cycle de Halliwell-Asada

Le cycle de Halliwell-Asada, ou cycle de l'ascorbate-glutathion, est un système de défense extrêmement efficace pour limiter les ROS. Il conduit à la dégradation du H_2O_2 en H_2O et en O_2 sans production secondaire d'un autre ROS. Bien que ce cycle ait été bien étudié dans les chloroplastes, il est également présent dans le cytoplasme, les peroxysomes et les mitochondries (Jimenez et al., 1997).

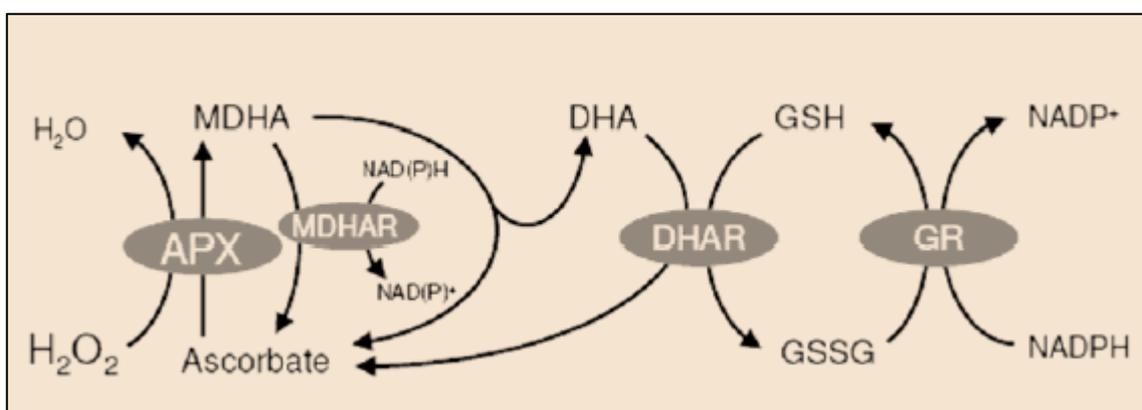


Figure 17 : Réactions centrales de la dégradation du H_2O_2 par le cycle de Halliwell-Asada (Foyer and Noctor, 2008).

L'enzyme principale est l'ascorbate peroxydase. Elle est localisée dans les chloroplastes et est hautement spécifique de l'ascorbate. Elle réduit le H_2O_2 en H_2O , produisant également des radicaux monodéhydroascorbate (MDHA) à partir de l'ascorbate (Asc). Bien qu'elles détoxifient aussi le H_2O_2 , les APX ne sont pas complètement redondantes avec les CAT. En effet, l'absence de l'une n'est pas totalement compensée par l'autre, et se traduit par une augmentation de la sensibilité des plantes au stress environnemental ou à l'attaque d'un pathogène (Mittler et al., 1999). De plus, en dessous d'une certaine concentration d'ascorbate, l'APX s'inactive irréversiblement, perdant la capacité d'éliminer le H_2O_2 . Cela met en évidence le rôle essentiel joué par le système de régénération de l'ascorbate réduit. Ce système est

composé de trois enzymes qui sont la monodéhydroascorbate réductase, la déshydroascorbate réductase et la glutathion réductase.

5.2.4. Glutathion-peroxydase

Les glutathion-peroxydases (GPX) sont des enzymes-clés des mécanismes de détoxification chez les animaux. Elles catalysent la réduction du H_2O_2 , des hydroperoxydes, et des peroxydes lipidiques en utilisant le glutathion (GSH) comme cofacteur. Dans certains cas, les GPX peuvent interagir spécifiquement avec des protéines et fonctionner comme des senseurs et des piègeurs de peroxyde d'hydrogène chez les levures. Des activités enzymatiques GPX similaires à celles détectées chez les animaux ont également été identifiées chez les plantes (Jung et *al.*, 2002).

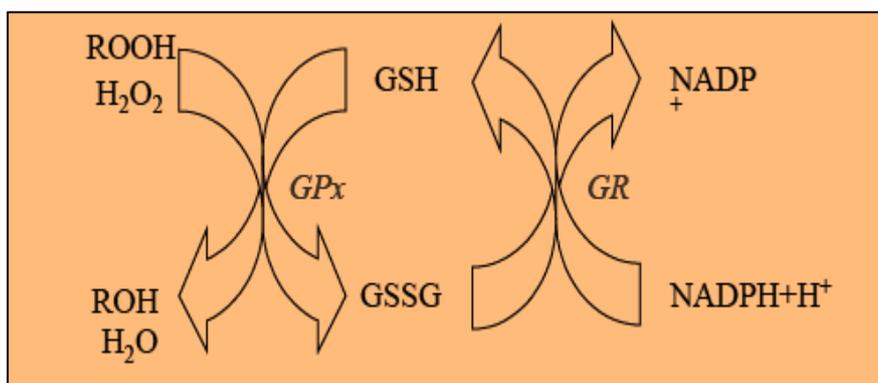


Figure 18 : Action antioxydante des glutathion-peroxydases (d'après Mittler, 2002)

5.2.5. Autres mécanismes impliqués dans les défenses antioxydantes

Les multiples localisations cellulaires, les propriétés biochimiques et antioxydantes des différentes enzymes, la régulation différentielle de leur activité enzymatique ou de leur expression génétique ainsi que le couplage avec des systèmes non-enzymatiques rendent le système antioxydant des plantes très polyvalent et efficace aussi bien au niveau du contrôle de l'accumulation temporelle qu'au niveau du contrôle spatial des ROS. L'étude de la tolérance au stress oxydatif montre cependant qu'il existe aussi des mécanismes et des voies encore inconnus (Ramel, 2009).

6. Objectif de la thèse

Le blé peut être attaqué par de nombreuses maladies à différents stades de son développement. Ces attaques peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles et les conditions de l'environnement sont favorables à l'expansion des maladies cryptogamiques, comme c'est le cas dans la région d'EL-Tarf.

Ces maladies induites peuvent être contrôlées efficacement si elles sont identifiées à temps. La tache auréolée, maladie foliaire du blé, est largement distribuée dans la région productrice du blé en Algérie. Les attaques sont importantes dans les régions à forte pluviométrie, plus particulièrement au Nord Est du pays. En effet, l'agent pathogène responsable de cette maladie provoque des symptômes qui lui sont spécifiques.

Les pertes de rendement causées par cette maladie varient avec les conditions climatiques, la sensibilité de la variété et le stade de la culture au moment de l'attaque. De ce fait, il est important de reconnaître ces symptômes afin d'identifier cette maladie et la connaissance des facteurs de son développement qui sont importants dans le raisonnement de la lutte chimique.

La contamination des sols due à l'activité agricole, aux épandages de boues d'épuration et aux déchets d'origine industriels devient aujourd'hui un problème préoccupant. Ces produits contiennent des éléments qui ne sont pas tous dégradables qui peuvent donc rester in situ et agir directement sur les activités dépendantes du sol ou indirectement sur la santé humaine et les écosystèmes. Parmi ces produits, les ETM sont les plus dangereux pour la plante et leur toxicité se manifeste par un retard de la croissance et un dysfonctionnement cellulaire.

Le cuivre, oligoélément, est un élément trace potentiellement toxique, peut induire des symptômes de toxicité (réduction de la biomasse, inhibition de la croissance racinaire, chlorose, perte de l'intégrité du chloroplaste, etc.) à des expositions supérieures à son homéostasie cellulaire.

C'est dans ce contexte que notre étude a été réalisée afin de déterminer d'une part la toxicité induite par les deux types d'interaction biotique (Plante/Pathogène) et abiotique (Plante/métal) et d'autre part de comprendre les stratégies adaptatives de la plante vis-à-vis de ces deux types de stress, provoquées par l'agent pathogène « *Pyrenophora tritici-repentis* » d'une maladie cryptogamique « la tache auréolée » et un métal lourd : Le cuivre.



MATERIEL ET METHODES

Notre travail s'est déroulé au laboratoire Pédagogique de Physiologie Végétale du département de Biologie de l'Université d'Annaba et à l'Exploitation Agricole Collective Hallala Aissa, à Echatt (wilaya d'EL-Tarf).

1. Présentation du matériel biologique

La présente étude a porté sur une variété de blé dur ; *Triticum durum* Desf (Var, Siméto). C'est une variété d'origine Italienne, à paille peu épaisse, et des grains moyens demi-allongés. Elle présente un pourcentage moyen de germination très élevé, et un rendement élevé. (OAIC, 2012).

Embranchement	Angiospermes
Sous embranchement	Spermaphytes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Glumiflorales
Super ordre	Comméliniflorales
Famille	Graminae et/ou Poaceae
Tribu	Triticeae
Sous tribu	Triticinae
Genre et espèce	<i>Triticum durum</i> Desf.

2. L'agent pathogène étudié

Pour notre expérimentation, une partie s'est déroulée au sein de l'Exploitation Agricole Collective Hallala Aissa, à Echatt (wilaya d'EL-Tarf) situé au nord Est de l'Algérie connu pour son climat humide associé à une forte pluviométrie favorisant le développement des maladies cryptogamiques. Le pathogène responsable de la maladie (la tache auréolée) est : *Pyrenophora tritici repentis*. Elle se manifeste par des taches nécrotiques ovales sur les feuilles (Boulal H et al., 2007).

2.1. Site d'échantillonnage

Nous avons choisi la région de EAC (exploitation agricole collectif) Hallala Aissa, Echatt, wilaya d'EL-Tarf, et ce en raison de son climat humide et de sa pluviométrie importante.



Figure 19 : Le site d'échantillonnage

2.2. Méthode d'échantillonnage

Concernant le stress biotique (maladie cryptogamique) en plein champ, nous avons pris aléatoirement ; Des plants témoin (équivalents à zéro tache) ; Des plants faiblement atteints ($\approx 15\%$ de taches) ; Des plants moyennement atteints ($\approx 30\%$ taches) ; Des plants gravement atteints ($>50\%$ de la feuille infestée).

L'observation de la maladie se fait par une observation à l'œil nu en se basant sur les symptômes de la maladie, ainsi que par une confirmation au laboratoire de microbiologie de L'INPV, la méthode consiste à couper les feuilles du blé en petits morceaux contenant les taches, les déposer dans des boîtes de pétris stériles sur lesquelles on dépose du papier buvard imbibé avec de l'eau distillée, Après l'incubation (à 23°C) chaque fragment est déposé sur une lame durant quelques secondes afin de libérer l'eau qu'il contient, cette goutte d'eau est colorée par du bleu de méthylène, l'observation microscopique des colonies de *Pyrenophora tritici-repentis* se fait à l'objectif 40.



Figure 20 : Niveau de l'atteinte des plants de blé par la maladie.

3. Le traitement étudié

La deuxième partie de notre travail est déroulée au Laboratoire Pédagogique de Physiologie Végétale du département de Biologie. Université Badji Mokhtar Annaba. Les graines de blé dur utilise dans notre expérimentation proviennent du marché local de l'Office Algérienne Interprofessionnelle des céréales (OAIC) d'EL Hadjar Annaba.

3.1 Conduite de l'essai

Pour le stress abiotique (stress métallique: Cu) in vitro, les graines de blé dur choisies sont désinfectées à l'eau de javel à 3% pendant 30 minutes, puis rincées abondamment avec de l'eau distillée. Pour faciliter et accélérer le processus de germination les graines sont vernalisées durant 24h, ensuite mises à germer dans des boites de Pétri tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillée. Au stade 2-3 feuilles, les plantes sont soumises à différentes concentrations de sulfate de cuivre (0, 200, 400, et 800 μmol) pendant une semaine. L'irrigation est assurée en moyenne de trois (03) fois par semaine pour tous les traitements.

3.2. Le dispositif expérimental

Pour chaque essai on a utilisé 10 boites de Pétri, Le dispositif expérimental utilisé est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Protocol expérimental de l'essai.

Témoin	T1	T2	T3	T4	T5
	T6	T7	T8	T9	T10
200 μMol Cu	C1 R1	C1 R2	C1 R3	C1 R4	C1 R5
	C1 R6	C1 R7	C1 R8	C1 R9	C1 R10
400 μMol Cu	C2 R1	C2 R2	C2 R3	C2 R4	C2 R5
	C2 R6	C2 R7	C2 R8	C2 R9	C2 R10
800 μMol Cu	C3 R1	C3 R2	C3 R3	C3 R4	C3 R5
	C3 R6	C3 R7	C3 R8	C3 R9	C3 R10

3.3. La fertilisation

Elle est à base d'une solution nutritive (Hoshang, 1988), apportée tous les 15 jours. Sa composition est résumée dans le tableau suivant :

Sels	Poids (g /l)	Quantité (ml/l)
KNO ₃	100,1	5
KH ₂ PO ₄	136,09	1
Citrate de fer	38,91	1
ZnSO ₄	0,28	1
H ₃ BO ₃	1,85	1
MgSO ₄	246,4	1
CaCl ₂	147	1
CuSO ₄	0,25	1
MnSO ₄	0,84	1

4. Techniques analytiques

4.1. Paramètres physiologiques

4.1.1. Teneur en eau des feuilles

La quantité d'eau que contiennent les feuilles de blé est calculée à partir de leur poids frais (PF) déterminé juste après leur prélèvement, et de leur poids sec (PS) déterminée après séchage à l'étuve à 105°C (Harrièche, 2004). La teneur moyenne en eau est calculée selon la formule de Monneveux et Nemmar (1986) :

$$\text{TEF (\%)} = (\text{PF} - \text{PS}) / \text{PF} \times 100$$

4.1.2. Dosage des chlorophylles

L'extraction des chlorophylles est effectuée selon la méthode de Holden (1975), qui consiste en une macération du végétal dans de l'acétone. Le traitement des échantillons se fait comme suit :

On pèse 1 g de feuilles de blé coupées en petits morceaux et broyées dans un mortier avec 25 ml d'acétone à 80% et une pincée de bicarbonate de calcium. Après le 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 645nm et 663nm, après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin d'acétone à 80%. Les teneurs en chlorophylles totales, sont exprimés en mg/g de PF. Les équations ci-dessous nous permettent de calculer les valeurs des chlorophylles (Arnon, 1949):

$$\text{Chl } a = 12,70 \cdot \text{DO}(663) - 2,69 \cdot \text{DO}(645)$$

$$\text{Chl } b = 22,90 \cdot \text{DO}(645) - 4,60 \cdot \text{DO}(663)$$

$$\text{Chl } (a+b) = 8,02 \cdot \text{DO}(663) + 20,2 \cdot \text{DO}(645)$$

4.2. Paramètres biochimiques

4.2.1. Dosage des protéines totales

Les protéines sont dosées par colorimétrie selon la méthode de Bradford, (1976) qui consiste à mesurer la concentration des protéines en solution par analyse spectroscopique et ce on broyant 0,1g de feuille de végétal avec 10 ml d'eau distillée. Après filtration on prélève 0,2 ml du surnageant auquel on ajoute 2 ml de BBC (réactif de Bradford). Le principe de la méthode est basé sur la fixation du Bleu de Comassie sur les protéines au niveau de résidus basiques et aromatiques, la présence de protéines se révèle par une coloration bleue. L'Absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595nm.

4.2.2. Dosage de la proline

La technique de dosage de la proline utilisée est celle de Troll et Lindsley (1955), modifiée par Dreier et Goring (1974). Elle est réalisée comme suit :

Mettre 0,1 g de feuilles du blé dans des tubes à essai et ajouter 2 ml de Méthanol à 40%. Les tubes sont portés à l'ébullition au bain-marie à 85 °C pendant 60 min. Après refroidissement, 1 ml de la solution a été prélevé de chaque tube et mis dans de nouveaux tubes auxquels, on a ajouté 1 ml d'acide acétique, 1ml d'un mélange contenant ; (120 ml d'eau distillée, 300 ml d'acide acétique, 80 ml d'acide orthophosphorique) et 25mg de ninhydrine.

Les tubes sont reportés au bain marie pendant 30 min, la solution vire au rose. Après refroidissement, ajouter 5ml de Toluène et une pincée de Na₂SO₄. Après agitation au vortex deux phases apparaissent : une phase supérieure (qui contient la proline) et une phase inférieure (ne contient pas de la proline). L'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 528 nm. La proline foliaire a été quantifiée d'après une courbe de référence, dont l'équation de la droite de régression a été déterminée.

4.2.3. Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux est réalisé selon la méthode de Schields et Burnet (1960) qui utilise l'Anthrone comme réactif (200 mg d'Anthrone, 100 ml d'acide sulfurique).

On pèse 100 mg de matière fraîche à laquelle on rajoute 3 ml d'éthanol à 80%. Laisser le tout à une température ambiante pendant 48h, évaporer ensuite l'éthanol. On rajoute par la suite 20 ml d'eau distillée. Prélever 2 ml d'extrait auquel on rajoute 4 ml d'Anthrone et on place les tubes dans un bain marie à une température de 62C° pendant 8 minutes. Dès que la solution vire au vert ou au bleu vert on arrête l'opération et on laisse les tubes refroidir dans un bain de glace, après repos à l'obscurité pendant 30 minutes. Les absorbances sont mesurées au spectrophotomètre

à une longueur d'onde de 585nm. Les sucres totaux ont été quantifiés d'après une courbe de référence, dont l'équation de la droite de régression a été déterminée.

4.2.4. Dosage de lipides

Les lipides totaux sont dosés selon la méthode (Goldsworthy et *al.*, 1972). Chaque échantillon constitué de 0.5g de matière fraîche foliaire, est découpé et macéré dans 10ml de l'acide trichloroacétique acide TCA (20%). Après broyage et filtration dans des tubes à essai, 1ml de l'extrait est prélevé et centrifugé à 5000 t/min pendant 10min. On verse le surnageant et on garde, dans le même tube, le culot qui contient les lipides. On ajoute à ce dernier 1ml du mélange Ether/Chloroforme (1/1), puis on procède à une deuxième centrifugation (5000 t/min pendant 10min) qui donne deux phases : un culot (contenant les protéines) et un surnageant (contenant les lipides). On prélève 100µl du surnageant auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et on met, après agitation, les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, on prélève encore une fois, 200µl de l'extrait, auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfo-phospho-vanillinique à 85% (0.38g Vanilline + 195ml acide orthophosphorique + 55ml H₂O). Cette réaction développe une couleur rose. Ainsi, la lecture spectrophotométrique est réalisée à une longueur d'onde 530nm.

4.3. Les Biomarqueurs enzymatiques

4.3.1. Préparation de l'extrait enzymatique.

La méthode utilisée afin d'obtenir l'extrait enzymatique des feuilles de blé dur est celle de Loggini et *al.*, (1999). L'extrait sera utilisé pour la mesure de l'activité catalase (CAT), et l'activité ascorbate-péroxydase (APX).

Les feuilles fraîches (1g) sont broyées à froid à l'aide d'un mortier dans 5ml de tampon phosphate (50mM phosphate, pH=7,5). L'homogénat est ensuite filtré à l'aide d'une toile adéquate avant de procéder à une centrifugation à froid de 12000g pendant 20min (centrifugeuse Sigma 3-16K). Le surnageant obtenu sera utilisé comme extrait pour la détermination des différentes activités enzymatiques.

La formule suivante est utilisée afin de quantifier les mesures spectrophotométriques, suite au dosage enzymatique de la catalase, de l'APX, et de la GST (Servais, 2004).

$$Act = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot L \cdot V_e \cdot p}$$

Act : Activité enzymatique en nmol /min / μ g de protéines.

ΔA : différence moyenne de l'absorbance

ϵ : Coefficient d'extinction linéique molaire en M.

V_t : Volume total du mélange réactionnel en ml.

t : temps de culture en min.

V_e : Volume de l'extrait enzymatique en ml.

p : teneur en protéines.

4.3.2. Dosage l'activité Ascorbate-peroxydases (APX)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate-peroxydase est réalisé suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987). Le volume réactionnel final de 3ml contient : 100 μ l d'extrait enzymatique, 50 μ l d'H₂O₂ à 0,3% et 2850 μ l de tampon phosphate NaK-Ascorbate (50mM NaK, et 0,5mM ascorbate, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture est effectuée à 290nm (spectrophotomètre GeneSys 8) pendant 1min et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 2800M^{-1}.cm^{-1}$. L'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

4.3.3. Dosage de l'activité catalase (CAT)

Le dosage de l'activité catalase (CAT) est réalisé suivant la méthode de Cakmak et Horst., (1991). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant une minute pour une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 39400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{L}$. Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μl de l'extrait enzymatique brut, 50 μl de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,1% et 2850 μl de tampon phosphate (50mM, pH= 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée.

4.3.4. Dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GST)

Le dosage de la glutathion S-transférase est réalisé par la méthode de (Habig et *al.*, 1974) les échantillons sont homogénéisés dans un tampon phosphate à pH 6,5 et à 100mM et centrifugés à 9000g pendant 30 min. La méthode consiste à faire réagir les GSTs sur un mélange CDNB (20mM)-GSH (100mM) la variation de la densité optique due à l'apparition du complexe CDNB-GSH est mesurée toutes les 15 secondes pendant 1 minute à 340nm. Les concentrations de la GST sont exprimées en nmol /min/ mg de protéines.

4.4. Les Biomarqueurs non enzymatiques

4.4.1. Le Glutathion (GSH)

L'extrait enzymatique est homogénéisé dans une solution de Tris/EDTA et subit une déprotéinisation par l'acide sulfo-salicylique à 0,25%. Après centrifugation à 2000 g pendant 10 minutes le surnageant est utilisé pour le dosage spectrophotométrique avec le réactif DTNB à 0,01M à 412nm. Les concentrations du GSH sont dosées par la méthode de (Weckbecker et Cory, 1988) et exprimées en μM / mg de protéines.

4.4.2. Dosage du malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation des lipides est estimée par l'évolution de la teneur en MDA effectué selon la méthode de Draper et Hadley (1990). L'homogénéisation du tissu

végétale dans l'acide trichloroacétique (TCA 5%) à raison de 10 ml pour 1g de tissu végétal est suivie d'une centrifugation pendant 15min à 12000g, le surnageant est ajoutée à un volume égale d'acide thiobarbiturique (TBA) à 0.5% dans le TCA à 20%, puis le mélange est incubé pendant 30 min à 100°C. L'absorbance du surnageant obtenu après centrifugation à 10000g pendant 5min est lue à 532 nm. La concentration de MDA est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire, $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

5. Analyse statistique des données

Les résultats obtenus sont exprimées par la moyenne plus ou moins l'écart type standard ($m \pm sd$). Les moyennes de la même série ont été comparées entre eux, en utilisant le test statistique, analyse de la variance à un facteur contrôlé (ANOVA) et ce en fonction du degré d'infestation des feuilles de blé et/ou en fonction des concentrations croissante du sulfate de cuivre avec un seuil de signification (P).

Si $p \leq 0,05$ \longrightarrow il existe des différences significatives *

Si $p \leq 0,01$ \longrightarrow il existe des différences hautement significatives **

Si $p \leq 0,001$ \longrightarrow il existe des différences très hautement significatives ***



RESULTATS

Dans ce chapitre nous allons vous étayer l'ensemble des résultats obtenus concernant l'effet de la tache auréolée et le cuivre sur certains paramètres physiologiques (teneur en eau et en chlorophylles), biochimique (protéines, proline, lipides et sucres totaux) et certains biomarqueurs de stress (GSH, MDA, CAT, APX, GPX et GST).

1. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur la teneur en eau des feuilles

D'après la figure 21, qui représente la variation de la teneur en eau chez les feuilles de blé dur en fonction de leur degré d'infestation par l'agent pathogène de la tache auréolée, on constate une diminution significative de la teneur en eau chez les feuilles faiblement infestées (61,82%), moyennement infestées (61,11%), et gravement infestées (59,68%) par rapport aux feuilles témoins (62,28%).

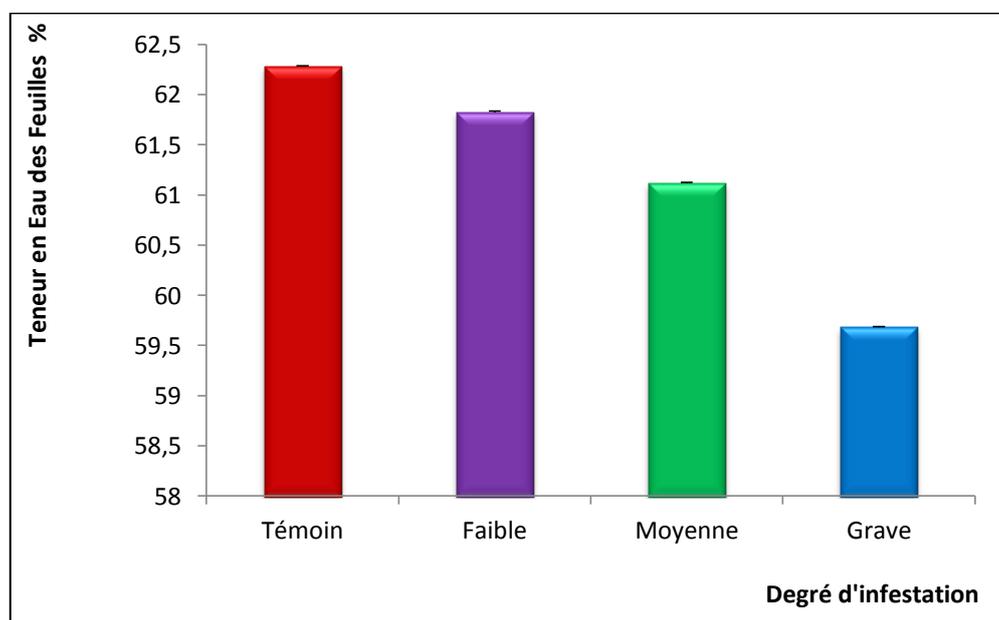


Figure 21 : Effet de la tache auréolée sur la teneur en eau des feuilles de blé

Cette diminution atteint son maximum chez les feuilles gravement infestées soit une perte en eau de 2,6%. Chez les feuilles de blé faiblement et moyennement contaminées la perte en eau est équivalente successivement à 0,46% et 1,17%.

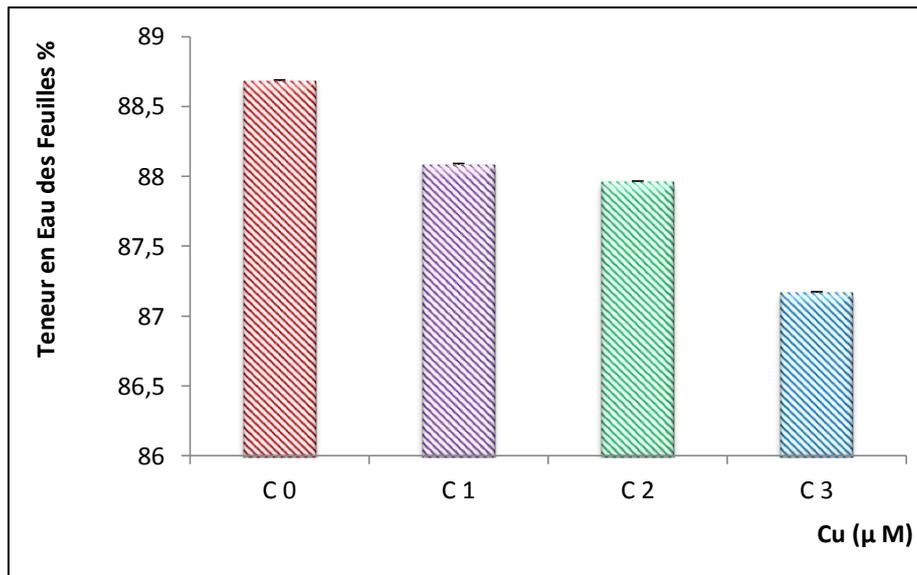


Figure 22 : Effet du cuivre sur la teneur en eau des feuilles de blé.

De même, la teneur en eau chez les feuilles de blé (figure 22) traitées par des concentrations croissantes de cuivre diminue significativement ($p \leq 0,001$) comparée au contrôle. Plus le stress est prononcé plus la perte en eau des feuilles est importante. La plus faible valeur (87,16%) est observée pour la plus forte concentration (800µmole) soit une perte de 1,5%, inférieur à la valeur enregistrée lors de l'attaque du pathogène (2,6%) chez les feuilles gravement infestées.

2. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur le taux des chlorophylles

L'effet de la tache auréolée (a) et du cuivre (b) sur la teneur en chlorophylles est représenté dans le tableau 7 qui montre une augmentation significative du taux de *chl_a*, *chl_b*, et *chl (a+b)* chez les feuilles de blé dur contaminées par le pathogène (faiblement et moyennement) ou par le cuivre (200 et 400µM). Les plus fortes valeurs de *chl_a* sont observées chez les feuilles faiblement infestées (7,45mg/g de MF) et pour la plus faible concentration de cuivre (22,30mg/g de MF)

Tableau 7 : Effet de la tache auréolée (a) et du cuivre (b) sur les chlorophylles.

		Chlorophylle <i>a</i>	Chlorophylle <i>b</i>	Chlorophylle <i>a+b</i>
Degré d'infestation par la tache auréolée (a)	Témoin	5.132 ± 0.149	4.950 ± 0.101	10.04 ± 0.183
	Faible	7.450 ± 0.121	22.95 ± 1.059	28.96 ± 0.519
	Moyenne	5.647 ± 0.775	10.52 ± 0.118	17.90 ± 0.049
	Grave	2.134 ± 0.130	2.528 ± 0.111	4.645 ± 0.092
Traitement par le cuivre (b)	Témoin	20.53 ± 0.048	8.776 ± 0.354	29.16 ± 0.309
	C1	22.30 ± 0.155	11.20 ± 0.420	33.31 ± 0.368
	C2	20.84 ± 0.173	13.45 ± 0.213	34.54 ± 1.004
	C3	20.56 ± 0.043	16.01 ± 0.485	36.42 ± 0.457

De même, une augmentation significative du taux de chlorophylle *b* et *a+b* est observée en fonction des concentrations croissantes du cuivre comparé aux feuilles témoins (tableau 7.b). Contrairement, l'interaction plante/pathogène provoque un effet drastique sur la teneur en chl (*a+b*) qui diminue significativement pour atteindre 4,645mg/g de MF soit une perte de 5,39mg/g de MF équivalent à 54% comparée à la valeur témoin (10,04mg/g de MF).

3. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur la teneur en protéines totales

La figure 23, qui représente la variation du taux de protéines en fonction du degré d'infestation des feuilles de blé par l'agent pathogène de la tache auréolée, montre une augmentation très hautement significative de la quantité de protéines chez les feuilles faiblement (1,96mg/g MF) et moyennement infestées (2,20mg/g MF) alors que ce même taux diminue pour les feuilles gravement infestées par rapport aux feuilles témoins pour atteindre 1,023mg/g de MF équivalent à 40%.

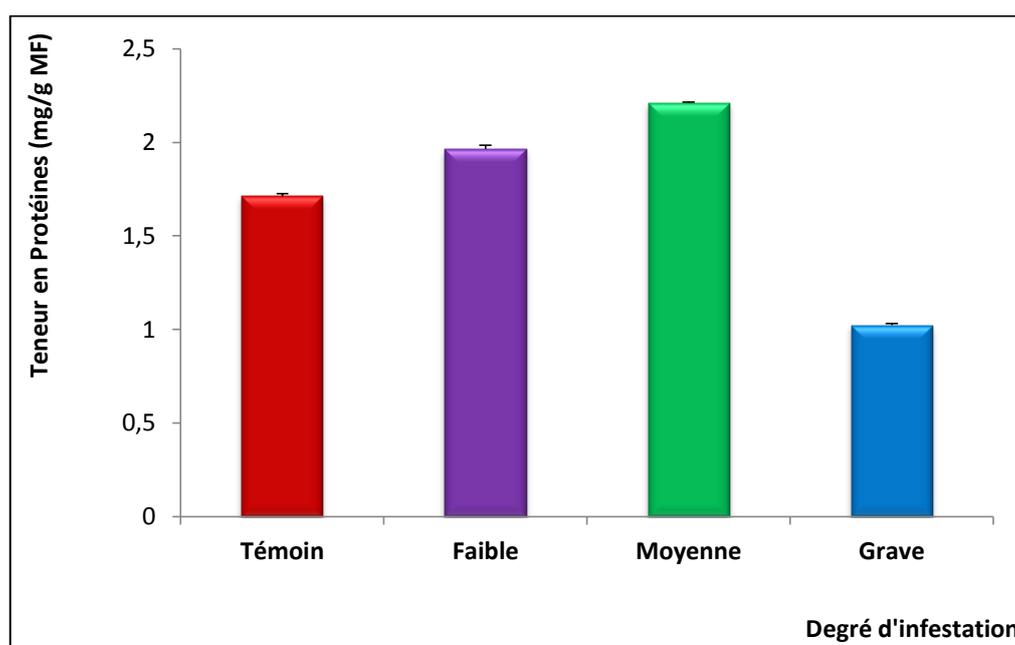


Figure 23 : Effet de la tache auréolée sur la teneur en protéines chez les feuilles de blé.

La figure 24, qui représente la variation du taux de protéines en fonction du traitement par le cuivre, montre une augmentation significative de la teneur en protéines totales en fonction des concentrations croissantes de cuivre comparé aux feuilles témoins.

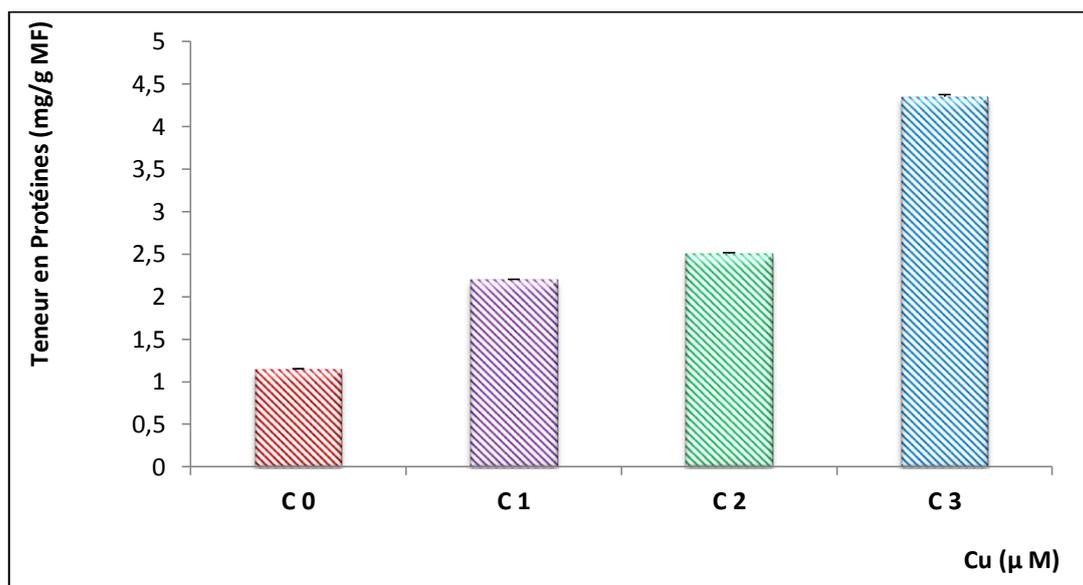


Figure 24: Effet du cuivre sur la teneur en protéines chez les feuilles de blé.

La plus forte valeur (4,35mg/g MF) est observée pour la plus forte concentration équivalente à cinq fois (≈ 5) la valeur du témoin (1,14mg/g MF).

4. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur la teneur en proline

La proline, acide aminé, connu depuis longtemps pour son rôle d'osmoprotecteur et plus récemment comme osmorégulateur.

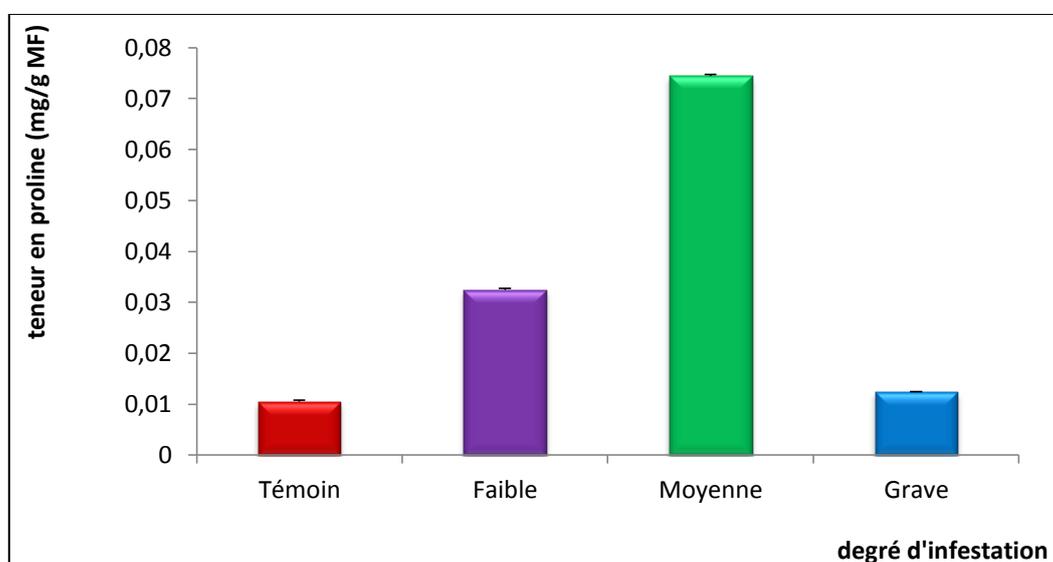


Figure 25 : Effet de la tache auréolée sur la teneur en proline chez les feuilles de blé

Le dosage de la proline (figure 25) a montré une augmentation significative de sa teneur chez les feuilles de blé contaminées par *Pyrenophora tritici-repentis*. Plus le degré d'infestation par l'agent pathogène s'accroît plus on observe une augmentation de ce taux qui atteint la plus forte valeur (0,074 mg/g de MF) chez les feuilles moyennement atteintes alors qu'il diminue chez les feuilles gravement infestées (0,012mg/g de MF).

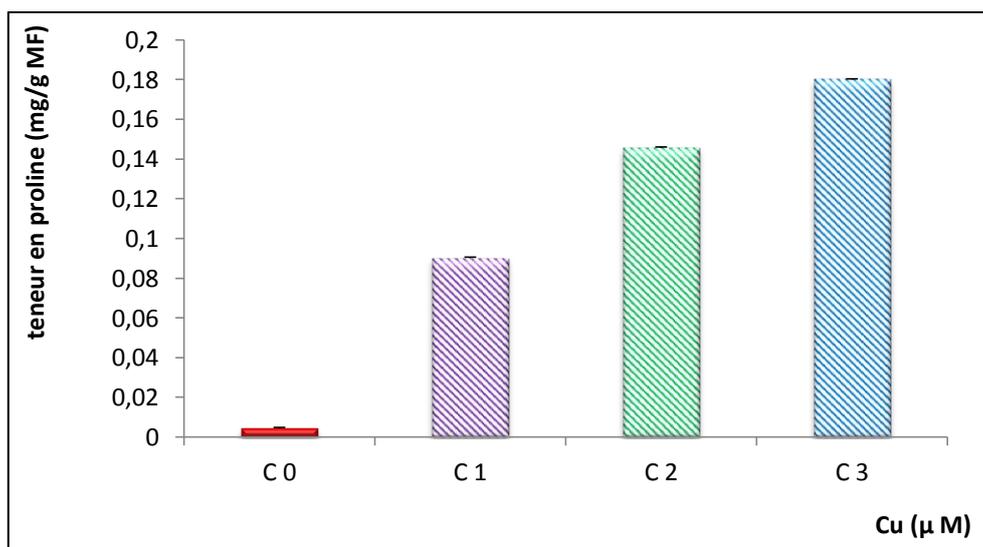


Figure 26 : Effet du cuivre sur la teneur en proline chez les feuilles de blé.

En revanche, le dosage de la proline chez les feuilles de blé traitées par le cuivre (figure 26) montre une augmentation très hautement significative de la teneur en proline de manière dose dépendante chez les feuilles de blé comparés aux feuilles témoins. Cette augmentation atteint son maximum (0,18 mg/g MF) à la plus forte concentration (C3 : 800 μ M) soit une augmentation de 75%.

5. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur la teneur en sucres totaux

Concernant l'effet de la tache auréolée sur la variation du taux des sucres totaux chez les feuilles de blé qui est représenté dans la figure 27, une augmentation très hautement significative de la quantité des sucres chez les feuilles faiblement (0,37

mg/g MF), moyennement (0,41 mg/g MF) et gravement infestées (0,44 mg/g MF) par apport aux témoins.

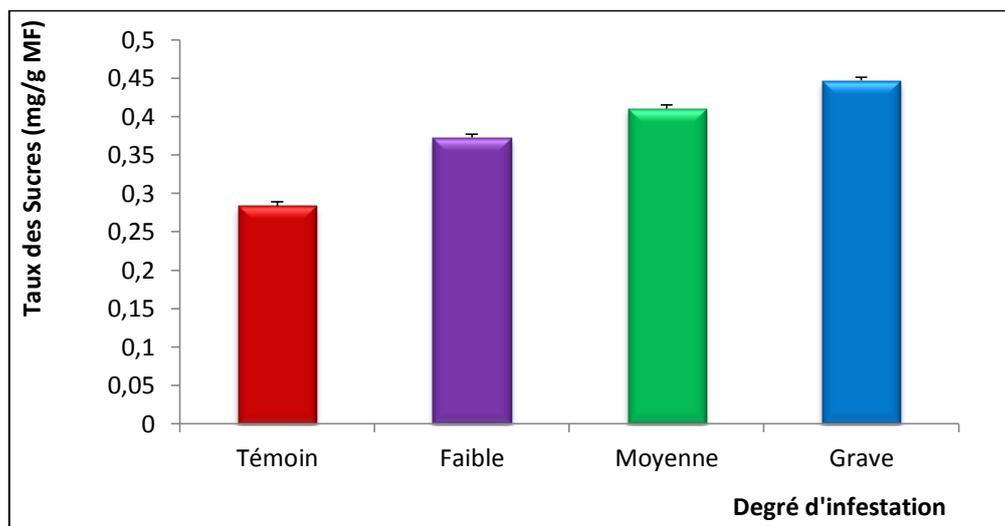


Figure 27 : Effet de la tache auréolée sur le taux des sucres totaux chez les feuilles de blé.

De même, une augmentation significative de la quantité des sucres totaux en fonction des concentrations croissantes de cuivre comparé aux feuilles témoins (figure 28). La plus forte valeur (0,86 mg/g MF) est observée pour la plus forte concentration (800 μ mole) équivalente à trois fois la valeur témoin (0,26 mg/g MF).

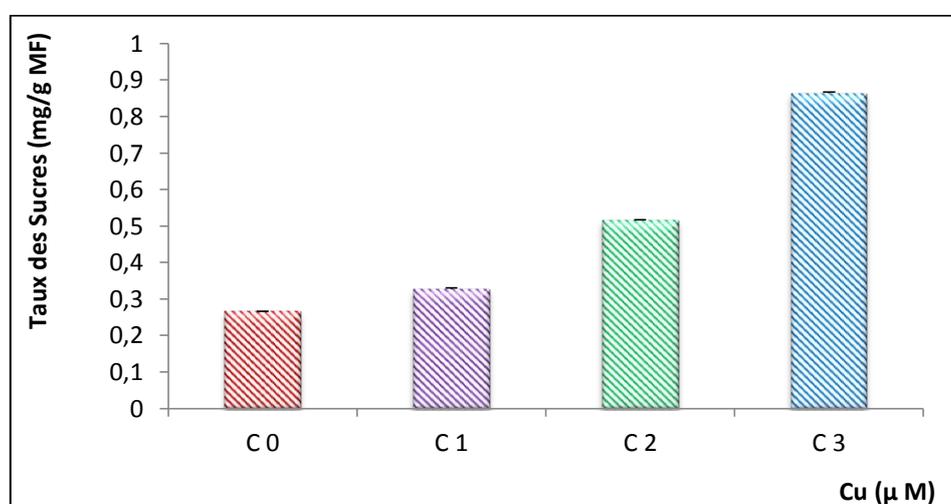


Figure 28 : Effet du cuivre sur le taux des sucres totaux chez les feuilles de blé.

6. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur le taux des lipides

Le dosage des lipides a révélé une diminution très hautement significative de sa teneur chez les feuilles de blé contaminées par *Pyrenophora tritici-repentis*. Plus le degré d'infestation par l'agent pathogène augmente plus on observe une diminution de ce taux qui atteint la plus faible valeur (0,055mg/g de MF) au plus fort degré d'infestation (Grave). Cette diminution est équivalente à 58% comparé au témoin.

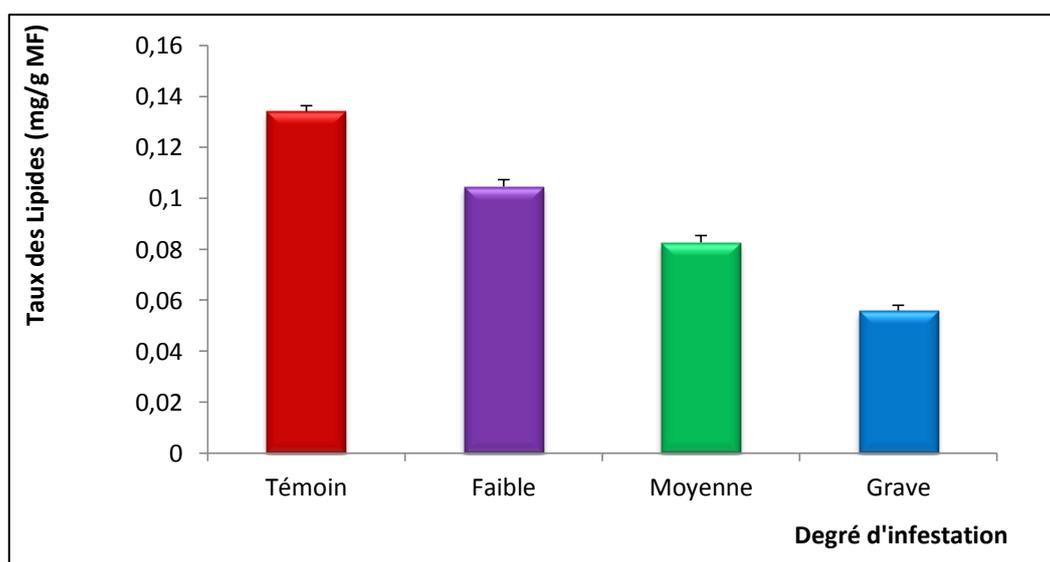


Figure 29 : Effet de la tache auréolée sur le taux des lipides chez les feuilles de blé.

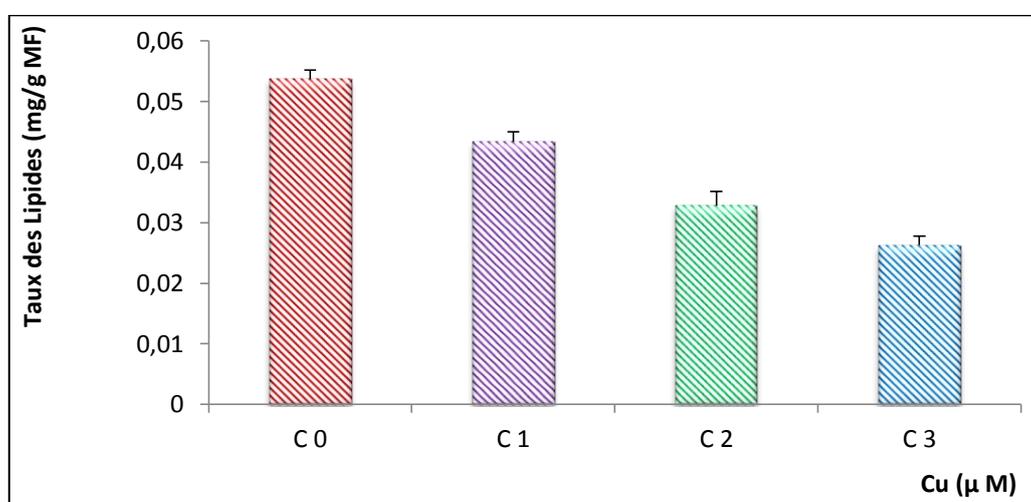


Figure 30 : Effet du cuivre sur le taux des lipides chez les feuilles de blé.

Le dosage des lipides (figure 30) a révélé une diminution significative ($p \leq 0,001$) de la teneur des lipides de manière dose dépendante chez les feuilles de blé traitées par le cuivre comparés aux feuilles témoins. Cette diminution atteint son maximum (0,026mg/g MF) à la plus forte concentration équivalent à 50% la valeur des feuilles témoins (0,053mg/g MF).

7. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur l'activité APX

La mesure de l'activité enzymatique APX, responsable de l'élimination de l'eau oxygénée (H_2O_2) formée suite aux stress appliqués, montre une induction très significative ($P \leq 0.000$) de l'activité APX chez les feuilles de blé dur infestées par *Pyrenophora tritici-repentis* par rapport au témoin. Cette activité augmente en fonction du degré d'infestation passant de 0,000028nmole/min/mg Prot pour la faible infestation, à 0,000074nmole/min/mg Prot pour la grave infestation.

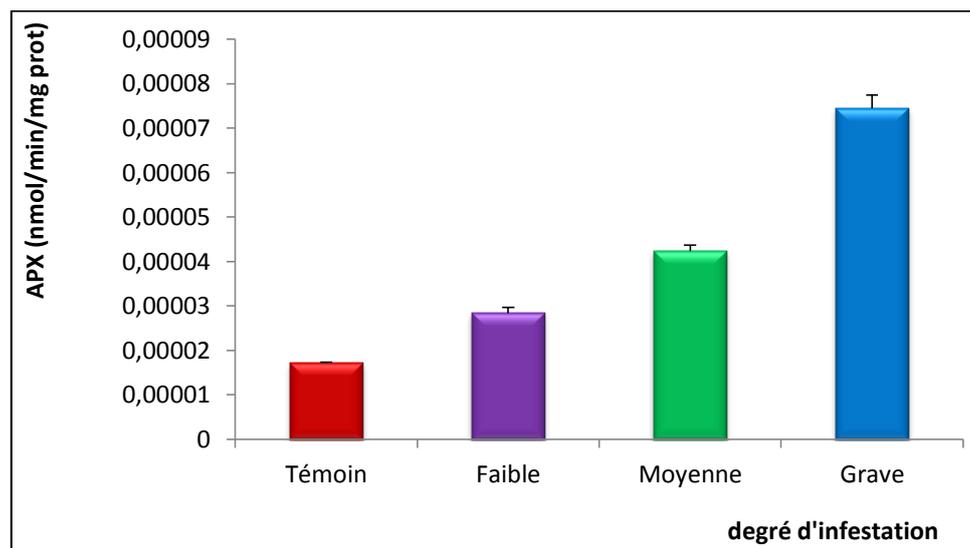


Figure 31 : Effet de la tache auréolée sur l'activité APX chez les feuilles de blé.

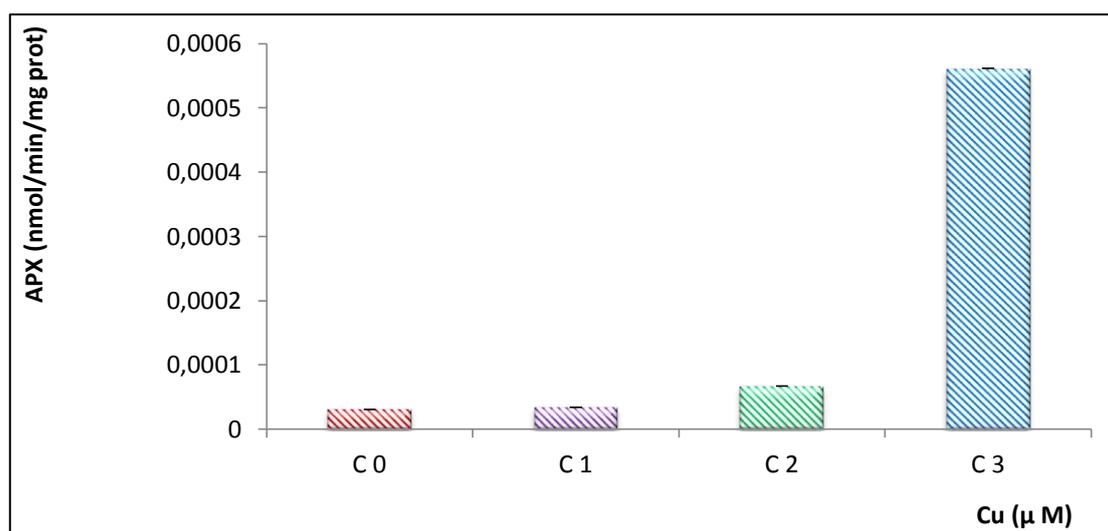


Figure 32 : Effet du cuivre sur l'activité APX chez les feuilles de blé.

La mesure de l'activité enzymatique APX (figure 32) pour le traitement des plants de blé par le cuivre, montre une augmentation de cette activité pour les feuilles traitées par le cuivre par rapport aux feuilles témoins. Un pic (0,00056nmole/mn/mg Prot) est observé chez les feuilles de blé traitées par la plus forte concentration de cuivre (C3).

8. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur l'activité CAT

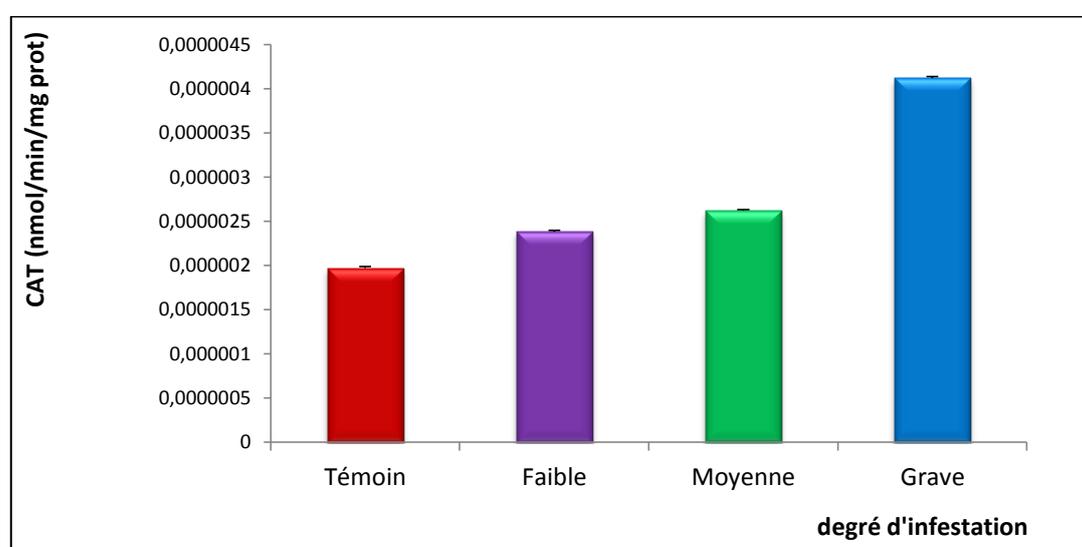


Figure 33 : Effet de la tache auréolée sur l'activité CAT chez les feuilles de blé.

La mesure de l'activité enzymatique CAT présentée dans la figure 33, a révélé une augmentation très significative de l'activité CAT chez les feuilles de blé dur infestées par *Pyrenophora tritici-repentis* par rapport au témoin. Cette activité augmente en fonction du degré d'infestation passant de 0,00000238 n mole/min/mg Prot (Faible infestation), jusqu'à 0,00000412 n mole/min/mg Prot (Grave infestation).

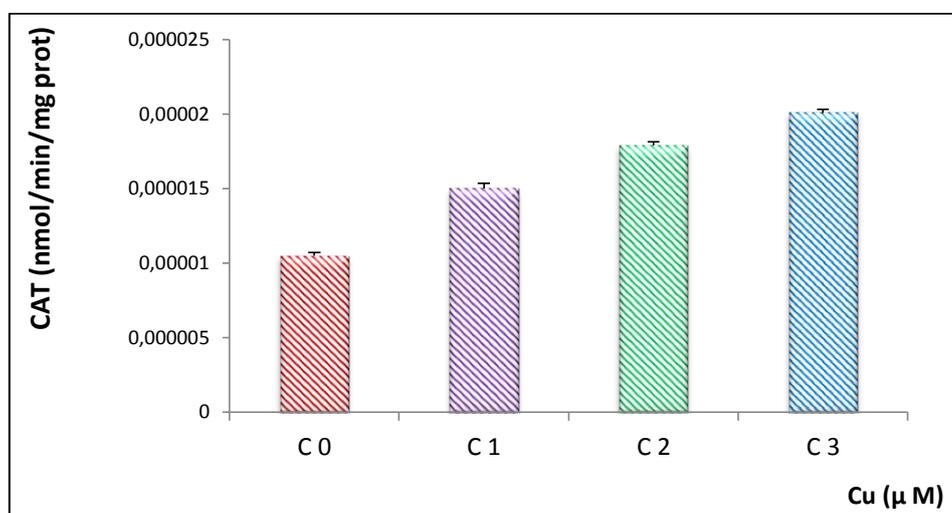


Figure 34 : Effet du cuivre sur l'activité CAT chez les feuilles de blé.

La mesure de l'activité enzymatique CAT présentée dans la figure 34, a révélé une augmentation très significative de l'activité CAT chez les feuilles traitées par le cuivre en fonction des concentrations croissantes par rapport aux feuilles témoins.

9. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur l'activité GST

D'après la figure 35, qui représente l'effet de la tache auréolée sur la variation de l'activité enzymatique GST, illustre une induction très significative de cette activité en fonction des degrés d'infestation par rapport au témoin. Cette augmentation est plus importante chez les feuilles moyennement et gravement infestées qui atteignent successivement les valeurs de 0,00335 et 0,0034 nmole/min/mg Prot.

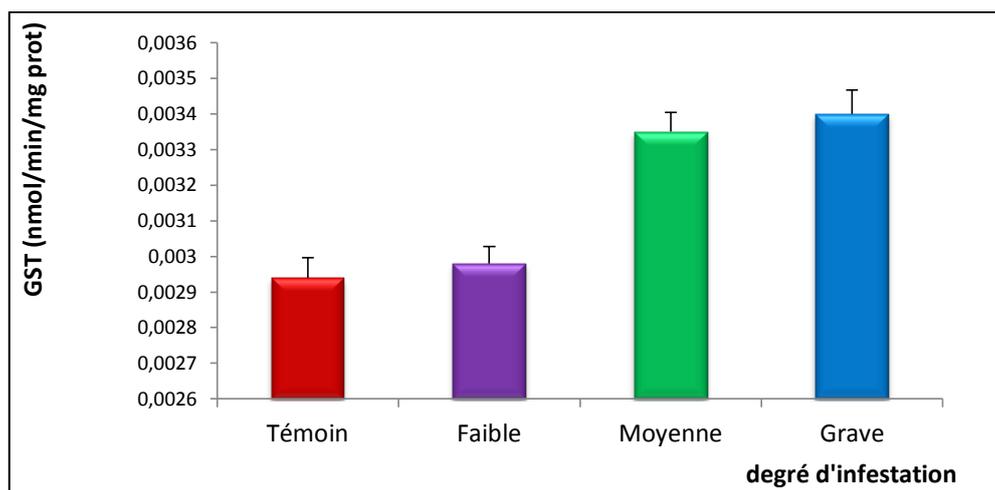


Figure 35 : Effet de la tache auréolée sur l'activité GST chez les feuilles de blé.

D'après la figure 36, qui représente l'effet de traitement par le cuivre sur la variation de l'activité enzymatique GST, illustre une augmentation très significative ($p \leq 0.001$) de l'activité GST des feuilles traitées par le cuivre comparé à celle des feuilles témoins. La plus grande valeur (0,0214 nmole/min/mg Prot) est observée chez les feuilles de blé traitées par 800 μM de Cu.

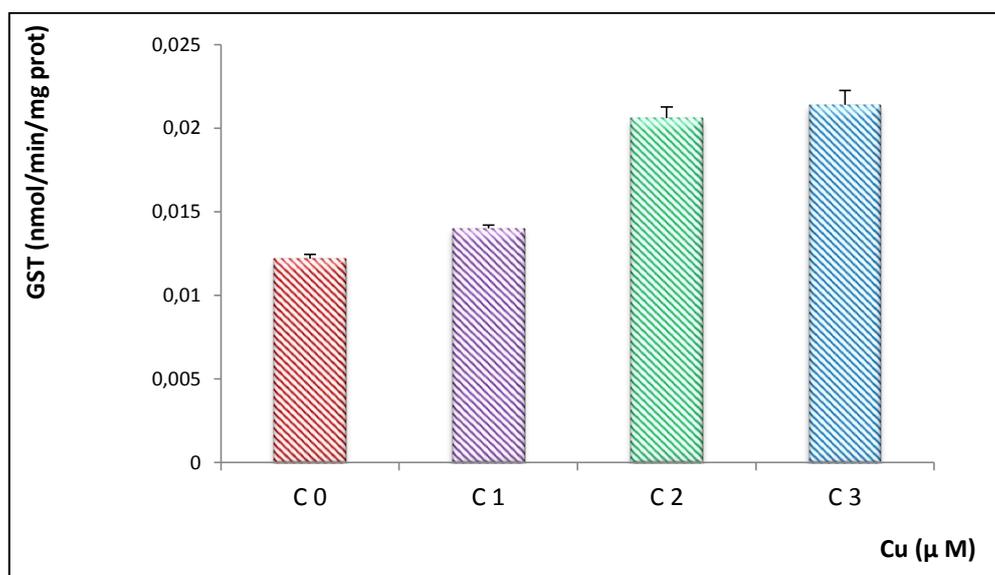


Figure 36 : Effet du cuivre sur l'activité GST chez les feuilles de blé.

10. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur le Glutathion

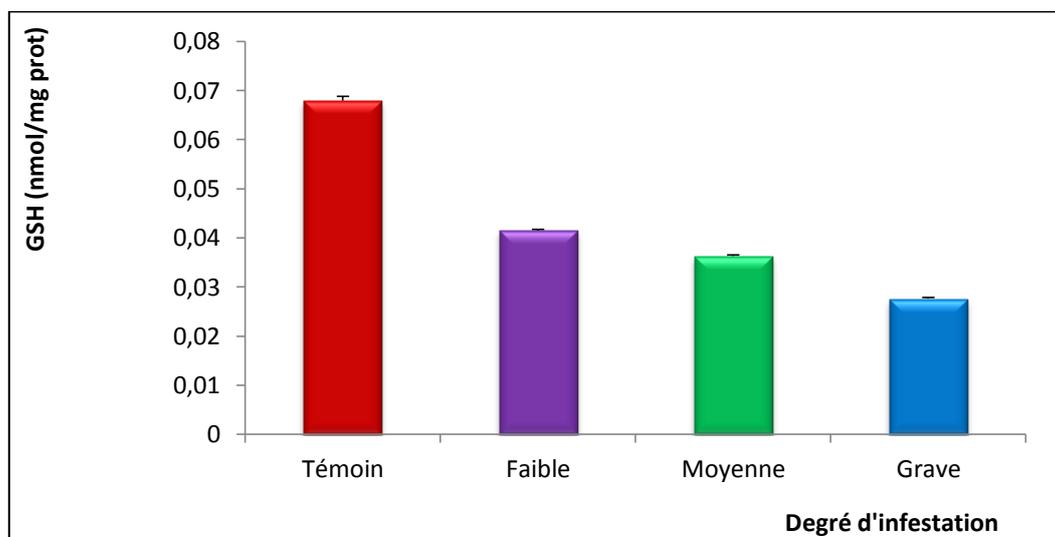


Figure 37 : Effet de la tache auréolée sur le taux de GSH.

Les résultats obtenus concernant l'effet de la contamination par l'agent pathogène sur le taux du glutathion montrent sa diminution ($P \leq 0.000$) en fonction des différents degrés d'infestation comparée au témoin. L'ensemble des valeurs du GSH sont inférieures à celle du témoin (0,0679 nmole/min/mg Prot) et la plus faible valeur (0,0276 n mole/min/mg Prot) est observée chez les feuilles de blé gravement infestées.

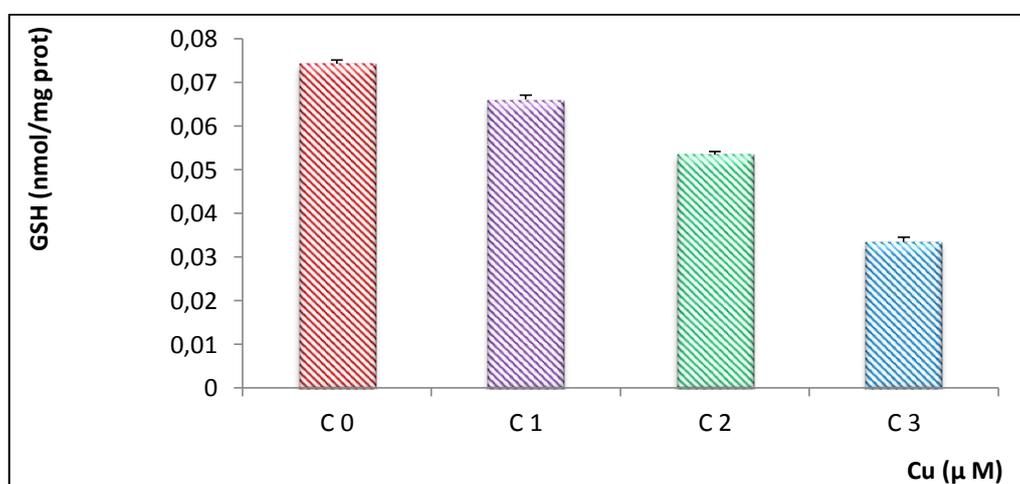


Figure 38 : Effet du cuivre sur le taux de GSH chez les feuilles de blé.

La figure 38 présente l'effet du traitement par le cuivre sur le taux du glutathion, les résultats montrent une diminution très significative du taux de glutathion. Cette diminution atteint son maximum (0,0334nmole/mn/mg Prot) a la plus forte concentration du traitement comparée aux feuilles témoins (0,0743nmole/mn/mg Prot) et qui est équivalent à 50% de réduction.

11. Effet de la tache auréolée et du cuivre sur le taux de MDA

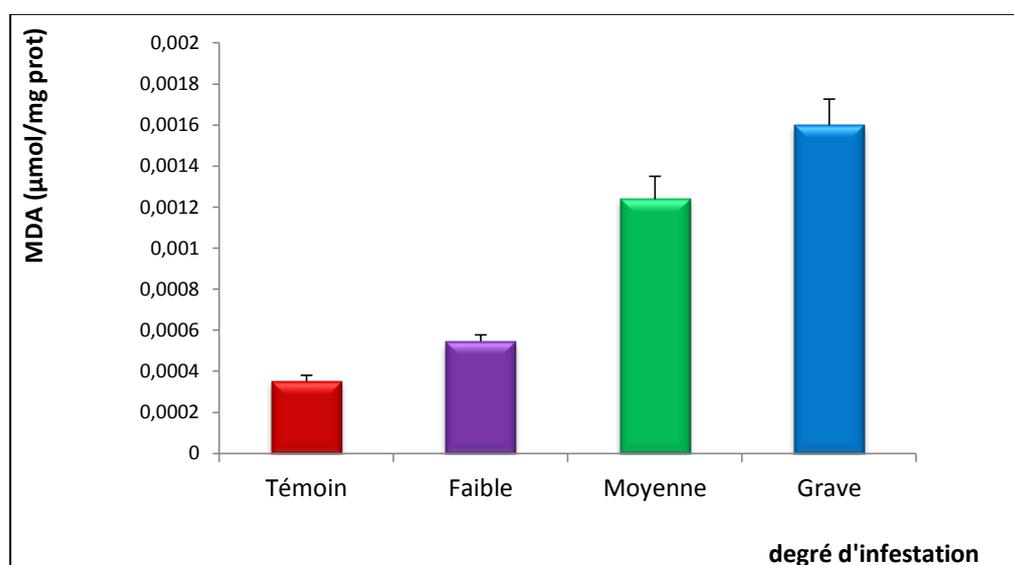


Figure 39 : Effet de la tache auréolée sur le taux de MDA chez les feuilles de blé.

Le suivi de la variation de malondialdéhyde (MDA) en fonction du degré d'infestation par l'agent pathogène montre que ce taux augmente très significativement en fonction du degré d'infestation des feuilles de blé par rapport au témoin. Le plus fort taux de MDA est observé chez les feuilles de blé gravement infestées (0,016μmole/mg Prot) qui est équivaux a cinq fois (≈ 5) la valeur du témoin (0,00035μmole/mg Prot).

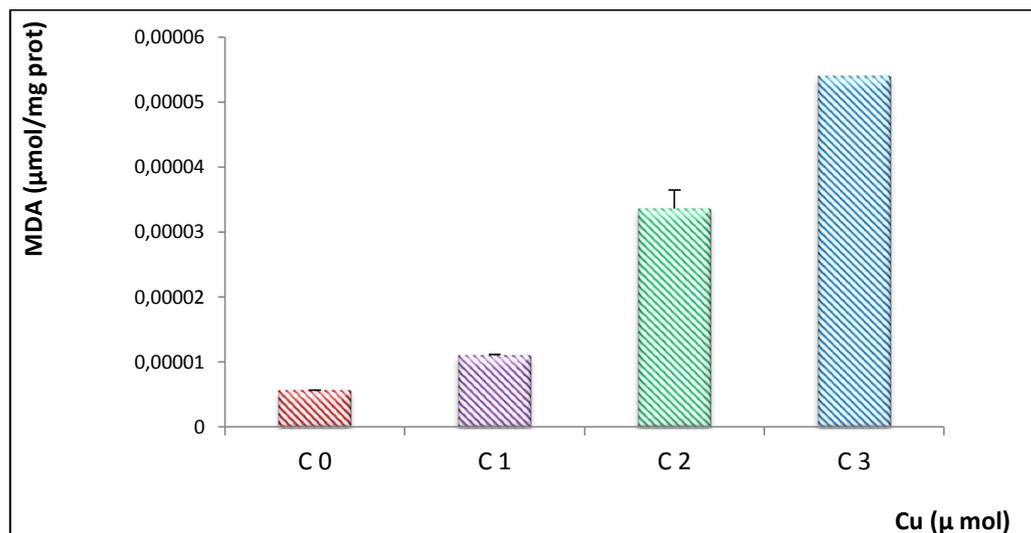


Figure 40 : Effet du cuivre sur le taux de MDA chez les feuilles de blé.

La figure 40 présente le suivi de la variation de malondialdéhyde (MDA) en fonction du traitement par le cuivre, ce taux augmente très significativement ($P \leq 0,000$) de manière dose dépendante chez les feuilles de blé soumises aux concentrations croissantes de cuivre, et ce par rapport aux feuilles témoins. Cette variation du taux de MDA passe de $0,0000056 \mu\text{mole/mg Prot}$ chez les feuilles témoins à deux (≈ 2) fois sa valeur ($0,000011 \mu\text{mole/mg Prot.}$) chez les feuilles traitées par $200 \mu\text{M}$ de Cu et à six (≈ 6) fois sa valeur ($0,0000336 \mu\text{mole/mg Prot}$) chez les feuilles traitées par $400 \mu\text{M}$ de Cu et enfin à neuf (≈ 9) fois sa valeur ($0,000054 \mu\text{mole/mg Prot}$) chez les feuilles traitées par $800 \mu\text{M}$ de Cu par rapport au feuilles témoins.



DISCUSSION

Les données recueillies dans cette étude ont abouti à des propositions qui sont tantôt en accord avec de nombreuses études similaires et tantôt différentes. Ces résultats se résument en un effet drastique du stress biotique « *Pyrenophora tritici-repentis* » comparé au stress abiotique « cuivre » qui a été évalué par la mesure de certains biomarqueurs de stress, intervenant dans le système de détoxification, qui sont synthétisés en réponse au burst oxydatif généré par les deux types de stress.

La diminution des teneurs en eau au niveau des feuilles résulte de la réduction de la perte en eau par la fermeture stomatique, cette action est un moyen d'adaptation des plantes aux facteurs défavorables du milieu (Djekoun et Planchon., 1992). De même, la teneur en eau des feuilles de blé dur diminue proportionnellement avec la réduction d'eau contenue dans le sol (Bajji et al., 2001). Alors que, Sbartai et al., (2012) rapporte que la présence du Cd dans le sol perturbe l'absorption de l'eau et des oligo-éléments par des phénomènes de compétition (synergie ou antagonisme) et qui peut aboutir à l'arrêt total de l'absorption. En plus, certains auteurs attribuent cette diminution à la sensibilité de l'espèce. D'après, Scofield et al., (1988) la diminution de TRE est plus rapide chez les variétés sensibles que chez les variétés résistantes. Autrement dit, les génotypes tolérants sont ceux qui maintiennent une TRE élevée sous stress hydrique (Martin et al., 1989; Nouri, 2002) comme pour le soja en condition de stress (Raissac, 1984 ; Zeghida et al., 2004) et une bonne ouverture stomatique contrairement aux variétés sensibles dont la fermeture stomatique est intense (El jaafari, 1993 ; Nouri, 2002). Ce n'est pas le cas de notre étude puisque nous avons enregistré une réduction de la teneur en eau chez les feuilles de *Triticum durum* traitées par le cuivre qui concordent avec les résultats de Mouellef, (2010) ; Issaad et al., (2013) (stress hydrique), Alayat et al., (2015) (stress métallique), Benderradji et al., (2016) (stress salin) qui explique que la fermeture stomatique rapide est la meilleure adaptation au manque d'eau en présence ou pas du métal. Donc L'ensemble de ces résultats nous permet de dire que la variété (Siméto) est sensible aux fortes concentrations de cuivre.

Parallèlement, les stomates sont couramment utilisés comme point d'entrée par les parasites foliaires. Certaines phytohormones, comme l'ABA ou le JA, ou certaines toxines comme la fusicoccine, affectent l'ouverture des stomates et peuvent être manipulées par les agents pathogènes dans le but de faciliter leur pénétration (McAinsh et al., 1990; Hossain et al., 2011; Turner and Graniti, 1969). Donc la diminution de la teneur en eau observée chez les feuilles de blé infestées par *Pyrenophora tritici-repentis* est liée au maintien des stomates ouvertes par les toxines libérées par ce champignon suite à l'interaction plante/pathogène comme chez la bactérie phytopathogène *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* qui produit un analogue du JA, la coronatine, qui entraîne la ré-ouverture des stomates et optimise sa pénétration à l'intérieur des tissus foliaires. Cette molécule est requise pour la virulence optimale de ce parasite (Zeng et al., 2010 ; Chanclud, 2016).

La quantité de la chlorophylle des feuilles, peut être influencée par beaucoup de facteurs tels que l'âge des feuilles, la position des feuilles, et les facteurs environnementaux (lumière, température et disponibilité en eau) (Hikosaka et al., 2006). Plusieurs auteurs rapportent une dégénération fréquente de la quantité de chlorophylles chez les plantes exposées à différentes concentrations de métaux (Moustakas et al., 1997 ; Singh et al., 2004 ; khaldi, 2012 ; Nedjah, 2014 et Alayat et al., 2015). Bousba et al., (2009) explique cette diminution comme étant une conséquence de la réduction de l'ouverture des stomates, visant à limiter les pertes en eau par évapotranspiration et par augmentation de la résistance à l'entrée du CO₂ atmosphérique nécessaire, à la photosynthèse. Une telle dégénérescence est également observée dans notre étude particulièrement chez les plantes de blé dur gravement infestées par *Pyrenophora tritici-repentis* où cette diminution est liée à la réduction du nombre des stomates ouvertes afin de limiter la propagation du pathogène.

Parallèlement, l'augmentation du taux des chlorophylles observée chez plusieurs espèces (Havaux et *al.*, 1988 ; Karoun et *al.*, 2011) s'explique par la stimulation de la photosynthèse. Schehata et *al.*, (1999) et Devriese et *al.*, (2001) rapportent une augmentation des teneurs en chlorophylles en présence de métaux ainsi que d'autres xénobiotiques. En effet, les plantules de blé dur ont besoin d'une certaine quantité de matières organiques, durant les premières phases de croissance, où elles utilisent les métaux en tant que source d'énergie et de carbone. Nos résultats viennent appuyer cette hypothèse puisque la présence du cuivre dans le milieu de culture augmente la synthèse de ces pigments ceci pourrait s'expliquer soit par le fait que les concentrations de cuivre, oligoélément indispensable à plusieurs cycles vitaux de la plante particulièrement la photosynthèse, restent insuffisantes pour provoquer un stress oxydant, soit que les plantes, au début du stress, vont activer leur métabolisme pour maintenir l'homéostasie de la cellule d'où l'augmentation des teneurs en chlorophylles. Concernant l'interaction plante/pathogène, les faibles et moyennes contaminations augmentent également la synthèse des chlorophylles car à ce stade le pathogène va libérer des toxines analogues aux phytohormones qui stimulent la réouverture des stomates.

Plusieurs études rapportent une augmentation ou une diminution des protéines totales quel que soit le type de stress (Tran, 2016). Il faut savoir que dix-sept (17) familles de protéines PR (Pathogenesis-Related) ont été identifiées chez de nombreuses espèces végétales (sels et *al.*, 2008) à la suite de divers stress (Tuzun & Somanchi, 2006). Dans notre étude, l'augmentation proportionnelle du taux de protéines observée en fonction des concentrations croissantes de l'agent pathogène et du métal chez les feuilles de blé confirme cette hypothèse et met en évidence leurs rôles majeurs dans le système de défense de la plante vis-à-vis des deux stress (Biotique et abiotique). Cette augmentation est due d'une part à l'activation des gènes comme pour la synthèse des protéines de défense du type PR et des protéines G qui sont associés à des récepteurs membranaires ainsi que les protéines du métabolisme secondaire (Ponchet et *al.*, 2000) et d'autre part à l'induction de la réponse

d'hypersensibilité RH qui est souvent observée localement (Pedley & Martin, 2005). Cette activation est liée au déclenchement de la phosphorylation ainsi que les protéines kinases (MAPKs) impliquées dans la transduction du signal et l'induction des réactions de défense de la plante (Zhao et Davis 2005).

En revanche, une diminution du taux des protéines totales est observée chez les feuilles de blé gravement infestées. Cette diminution est attribuée au burst oxydatif générer suite à l'interaction entre le parasite et la plante hôte où on observe une forte accumulation de ROS. Leur action aboutit à des lésions directes des molécules biologiques par oxydation tel l'oxydation des protéines qui a été reportée par plusieurs auteurs (Parent et *al.*, 2008 ; Van Loon et *al.*, 2008; Sbartai et *al.*, 2015). En plus, les lésions nécrotiques localisées aux sites de pénétration du champignon observées chez les feuilles de blé gravement infestées démontrent que la réponse d'hypersensibilité (RH) est stimulée limitant ainsi le développement du pathogène en réduisant l'accès aux nutriments (Carole, 2010) et par conséquent l'activation de la mort cellulaire programmée (PCD) d'où la réduction du taux de protéines.

La proline, acide aminé synthétisé à partir du glutamate ou de l'ornithine (Bartels et Nelson, 1994), qui a été proposée comme stabilisateur de protéines et de complexes macromoléculaires (osmoprotecteur) (Stewart et Lee, 1974), piègeur de radicaux libres et régulateur du potentiel redox cellulaire (Khedr et *al.*, 2003 ; Demiral et Turkan, 2004 ; Ma et *al.*, 2006 ; Molinari et *al.*, 2007). La concentration intracellulaire de la proline dépend d'une régulation fine entre sa biosynthèse et sa dégradation. Cependant le rôle exact de la proline et les voies de signalisation impliquées dans la régulation de son métabolisme ne sont pas encore complètement élucidés. L'étude du métabolisme de la proline chez les plantes modèles permettrait d'acquérir des informations quant aux mécanismes différentiels mis en œuvre par les plantes pour faire face aux contraintes environnementales. Elle est également considérée comme un biomarqueur métabolique de stress chez les végétaux (Singh et *al.*, 1973). Plus le niveau de stress appliqué augmente plus les teneurs en proline deviennent marquées (Savouré et *al.*, 1995 ; Toumi et *al.*, 2014).

En effet, la relation entre le stress hydrique et l'accumulation de cet acide aminé est établie depuis longtemps (Cechin et *al.*, 2006). L'accumulation de la proline est l'une des manifestations les plus remarquables du stress salin (Monneveux et Nemmar, 1986 ; Thomas et Bohnert, 1993). En plus de son rôle d'osmoprotecteur, la proline pourrait également intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique (Pesci et Beffagna, 1984) ou constituer une réserve d'azote utilisée par la plante après la période du stress (Tal et Rosenthal, 1979). Dans notre étude, les stress appliqués (biotique et abiotique) provoquent une forte accumulation de proline chez les feuilles de blé. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Bouchelaghem et *al.*, 2011 ; Khaldi, 2012 ; Meksem et *al.*, 2007 ; Hennouni, 2012 ; Issaad et *al.*, 2013 ; Gheraibia et *al.*, 2014, 2016 ; Alayat et *al.*, 2015, Souahi et *al.*, 2016 ; Ferfar, 2017 ; chez le blé et Tlidjen et *al.*, 2012 chez des plantes aquatiques épuratrices des eaux usées.

Concernant les teneurs en sucres totaux quantifiées dans notre étude nous avons noté leur augmentation lors des différents stress appliqués (biotique et abiotique). On pense que cette accumulation de carbohydrates n'est pas due à une surproduction des assimilats, mais reflétant plutôt une réduction de leur translocation du site de synthèse, les feuilles, via le reste de la plante, particulièrement le système racinaire dont la croissance est tributaire. Cette augmentation n'est en réalité qu'une forme d'adaptation aux conditions de stress (Tahri et *al.*, 1998) permettant ainsi de constituer une garantie pour le maintien d'une intégrité cellulaire élevée (Mefti et *al.*, 1998). En effet, la capacité des plantes à répondre aux variations des niveaux de sucres solubles peut servir de mécanisme de contrôle intégrant les conditions environnementales externes comme la lumière, les nutriments et les stress abiotiques et biotiques avec le programme de développement intrinsèque (Rammel, 2009). En plus, les sucres peuvent protéger les membranes et les protéines contre la déshydratation en incitant la formation d'une sorte de verre aux températures physiologiques (David et *al.*, 1998). Ce type de tolérance, permet à la plante d'assurer normalement ses fonctions physiologiques, malgré une dégradation de son état interne (Hellmann et *al.*, 2000).

Loretti et *al.*, (2001) et Meksem et *al.*, 2007 suggèrent que l'accumulation des sucres solubles est un moyen adopté par les plantes en cas de stress afin de résister aux contraintes du milieu. Il est à signaler que les processus régulés par les sucres ont, en particulier, été étudiés chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ces études ont suggéré l'existence de plusieurs systèmes de détection des sucres (Xiao et *al.*, 2000): une voie de signalisation hexokinasedépendante, une voie de signalisation hexokinase-indépendante, une voie de signalisation métabolisme-dépendante et enfin une voie de signalisation saccharose-spécifique. Donc le sucre est connu non seulement, comme un puissant moteur de la croissance des plantes, mais aussi comme une molécule de signalisation efficace (Rolland et *al.*, 2006).

Le signal lipidique systémique est parmi les premiers événements impliqués dans la réponse défensive et dans les mécanismes de transmission du signal. La signalisation par les phospholipides est un composant important dans les voies signalétiques chez l'Eucaryote. Elle joue un rôle principal dans la croissance des plantes et le développement aussi bien qu'en réponse systémique aux stress environnementaux, y compris l'attaque par des agents pathogènes (Song et Goodman 2002; Profotová et *al.*, 2006 ; Akram, 2008). Dans notre étude, le dosage des lipides a révélé une diminution très hautement significative de sa teneur chez les feuilles de blé contaminées par *Pyrenophora tritici-repentis*, et de même pour les feuilles traitées par le cuivre ; Nos résultats vont à l'encontre de la littérature qui suppose que le signal mobile pour la SAR pourrait être une molécule de nature lipidique (Durrant et Dong 2004; Mosher et *al.*, 2006) alors qu'on se retrouve dans une situation où ce taux diminue progressivement prouvant ainsi que ce type de résistance (SAR) est déjà enclenché (accumulation observé de protéines) en faisant intervenir différents mécanismes de défenses vis-à-vis des deux stress soit par la production de ROS induisant ainsi un stress oxydatif qui aboutit à une peroxydation lipidique suite à une attaque oxydante par l'oxygène singulet ou le radical hydroxyle soit par l'implication d'autres voies de signalisation tels que l'acide jasmonique (JA) et l'acide méthylejasmonate (MEJA) qui sont des molécules signales dérivées d'acide gras et leurs biosynthèse implique des enzymes comme la lipase, lipoxygénase (LOX), ... etc.

Il existe de nombreuses enzymes capables de produire du H_2O_2 en cas de stress biotique telles que les peroxydases pH-dépendantes de la paroi cellulaire (Bolwell; 1996; Bestwick *et al.*, 1997) qui fonctionnent uniquement en présence de cystéine et de glutathion. En condition normale, les peroxydases permettent de dissiper le H_2O_2 alors qu'au cours d'une alcalinisation de l'apoplaste caractéristique de l'infestation d'un pathogène, elles peuvent devenir productrices de radicaux hydroxyle $OH\cdot$ (Salzer *et al.*, 1996). Ces ROS sont impliqués dans les mécanismes de défense des plantes, soit de façon directe par action de leur forte toxicité sur les pathogènes, soit par activation de nombreuses voies métaboliques (Sbartai *et al.*, 2015) ce qui explique l'induction de l'activité APX observée dans notre travail chez les feuilles de blé infestées par *Pyrenophora tritici-repentis*. De même, le traitement par le cuivre stimule cette activité chez les feuilles de blé avec un pic observé pour la plus forte concentration prouvant encore son effet drastique dans la cellule. L'induction de l'activité APX en réponse au stress oxydatif engendré par la présence du champignon ou du Cu montre bien son rôle dans l'élimination de l'eau oxygénée (H_2O_2).

La catalase est une enzyme importante dans le système de défense (antioxydant) de la plante. Elle catalyse, de façon extrêmement rapide, la dismutation du peroxyde d'oxygène en oxygène et en eau, protégeant ainsi les cellules des effets oxydants (Sanchezcasas and Klessig, 1994). L'augmentation des ROS, en réponse à des stress biotiques et abiotiques chez des plantes transgéniques privées de catalase, a révélé l'importance de ces enzymes dans la tolérance des plantes au stress oxydant (Willekens *et al.*, 1997). Chez les céréales, le comportement de la catalase a été étudié en présence de conditions de stress.

Ainsi Kim *et al.*, (2005) et Khosravinejad *et al.*, (2008), ont prouvé que l'activité de la catalase augmentait dans les racines de l'orge lors d'un stress salin, et cela par rapport aux autres enzymes antioxydantes étudiées en même temps (APX, SOD et POX). Ce résultat indique que la catalase est une enzyme majeure dans la détoxification des hydrogènes de peroxydes. Les rapports sur l'activité de la catalase

sous condition de stress sont hétérogènes. Il a été établi que l'activité CAT augmente chez le maïs (Kolarovic et *al.*, 2009), le blé (Luna et *al.*, 2004) et reste inchangé ou diminuent sous stress hydrique chez le tournesol (Zhang et Kirkham, 1992). Luna et *al.*, (2004) ont rapporté que la teneur d' H_2O_2 des feuilles augmente, même si les activités totales de CAT doublent dans les semis de blé, en conditions de stress sévère.

Les GST sont connues pour jouer un rôle important dans la détoxification de certaines molécules en les conjuguant au glutathion. Le complexe, moins toxique que la molécule libre, peut être séquestré dans la vacuole ou exporté vers le milieu extérieur. Certaines études attribuent à certaines GST particulières un rôle dans la régulation de plusieurs enzymes et facteurs de transcriptions par des interactions non-catalytiques protéine-protéine. Cependant cette fonction ne semble liée à aucun mécanisme de détoxification (Calmes, 2011). L'analyse biochimique de l'activité GST met en évidence une stimulation à différents traitements et différentes concentrations traduisant un phénomène de résistance des cellules de feuilles de Blé. En effet inhibition du GSH observée dans notre étude confirme une fois de plus que le mécanisme de défense en question est dépassé et remplacé par un système de défense enzymatique antioxydant plus performant la GST en réponse au burst oxydatif généré par le champignon ou le métal.

Quant au dosage des biomarqueurs de stress, le glutathion (GSH) est considéré parmi les plus importants puisqu'il intervient dans le système de défense antioxydant de la plante. Partant du fait que tout stress engendre un burst oxydatif entraînant une rupture de l'équilibre redox qui est à l'origine d'un dommage oxydatif qui peut être régulé par le glutathion qui participe à la réduction des composés issus de la peroxydation lipidique (LOOH) ou du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Parent et *al.*, 2008). Nos résultats vont à l'encontre de cette hypothèse ou on observe une diminution du taux du glutathion chez l'ensemble des plantes de blé contaminés par le champignon ou par le cuivre prouvant que ce biomarqueur de stress n'est pas sollicité dans ces deux cas puisque toutes les valeurs mesurées sont inférieures aux valeurs témoins. En revanche, Gara et *al.*, (2003) rapporte que l'inhibition de la synthèse du glutathion est due à la production d' H_2O_2 et de NO suite à une attaque de pathogènes

qui dérègle le cycle glutathion/ascorbate. Ainsi, la forme oxydée du glutathion prédomine et conduit à une modification de l'état redox de la cellule qui participe à la mise en place de la RH. Ces deux hypothèses nous permettent de conclure que l'inhibition n'est pas due à la nature du stress mais aux degrés de contamination puisque les fortes concentrations inhibent totalement le glutathion chez les feuilles de blé prouvant ainsi que le système en question est dépassé et remplacé par un système de défense antioxydant plus performant (enzymatique) en réponse au burst oxydatif généré par ces deux types de stress. Donc le glutathion intervient indirectement dans la régularisation de l'équilibre redox soit par la synthèse des phytochélatines dans le cas de stress métallique soit par conjugaison à l'éliciteur ou au Cu par des GST dans leur détoxification.

La peroxydation lipidique est une oxydation des lipides due dans les plus part des cas à la présence des espèces réactives à l'oxygène (ROS). Le taux élevés de MDA constatés lors de notre étude est due à l'oxydation lipidique enclenchée suite au stress oxydatif installé en réponse de l'infestation par le champignon et/ou l'augmentation du taux du cuivre chez les feuilles de blé.

En effet, en cas de burst oxydatif lors de l'interaction entre parasite et sa plante hôte, le stress est relativement important et son impact s'étend à l'échelle cellulaire provoquant des dégâts aussi bien chez le parasite que dans la cellule végétale. L'excès de ROS provoque des lésions directes (oxydation de l'ADN, protéines, lipides, glucides) mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Farmer et Davoine, 2007 ; Mueller et *al.*, 2008). Nos résultats confirment cette hypothèse qui décèlent des taux très élevés de MDA équivalent à cinq fois la valeur du témoin prouvant ainsi l'ampleur du stress induit. De même, l'augmentation du taux de MDA est attribuée à l'excès de ROS libéré suite à l'ajout des fortes concentrations de cuivre dans le milieu de culture. Lin et *al.*, (2005) rapporte que le cuivre en excès dans les cellules fait augmenter la concentration en H₂O₂ qui peut induire un stress oxydant

perturbant ainsi l'homéostasie des autres éléments (Cuypers, 2000). Ces résultats vont dans le sens de notre étude qui détermine la valeur maximale de MDA à neuf fois la valeur du témoin prouvant une fois de plus l'importance du stress appliqué.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

La grande variété des types de stress suppose la mobilisation de multiples mécanismes de production des EROs qui sont impliqués dans les stratégies de défense des plantes, soit de façon directe par action de leur forte toxicité sur l'agent pathogène ou le métal, soit par activation de nombreuses voies métaboliques. Ce sont également des molécules signales qui, diffusant rapidement à travers les membranes, régulent de nombreux gènes de défenses : protéines chaperonnes, enzymes antioxydantes, ascorbate peroxydase (APX), glutathion-S-transférase (GST), gènes liés à la pathogénèse (PR) via l'acide salicylique (SA) ou la synthèse de phytoalexines. Dans la majorité des cas, les dommages occasionnés par cet excès d'EROs, s'ils ne sont pas rapidement limités, conduisent à la mort puis la lyse des cellules concernées.

Les travaux réalisés ont permis de traduire l'effet des deux stress biotique (*Pyrenophora tritici-repentis*) et abiotique (le cuivre) sur le développement du blé dur via la mesure de certains paramètres physiologiques, biochimiques ainsi que certains biomarqueurs de stress afin de mieux comprendre les stratégies de défense entreprises par cette plante vis-à-vis ces deux types de stress. En effet, les fortes contaminations par la tache auréolée et le cuivre provoquent des effets néfastes sur le développement de *Triticum durum*, qui se manifeste par la diminution de la teneur en eau des feuilles et une perturbation au niveau des pigments photosynthétiques. De même, une importante activation de la biosynthèse des protéines, des sucres totaux, de la proline, la peroxydation lipidique représentée par le taux de MDA et l'induction de certaines activités enzymatiques (CAT, APX et GST) intervenant dans le système de défense antioxydant. En revanche, une diminution drastique du taux des lipides et du GSH chez les feuilles de blé dur contaminées par l'agent pathogène et le métal.

L'ensemble de nos résultats nous permet de conclure que lors de l'interaction de *Pyrenophora tritici-repentis* ou le cuivre avec les feuilles de blé, un burst oxydant est induit qui ne dépend pas du type de stress mais de la concentration des contaminants. Il semble que le blé est sensible à la présence du champignon et tolère un peu plus la présence du cuivre dans le milieu de culture. Cette sensibilité a été évaluée par la quantification de certains biomarqueurs prouvant ainsi une réponse cellulaire plus importante en cas de stress biotique comparé au stress abiotique.

Perspectives

Au terme de cette étude, plusieurs points importants restent à préciser. Il serait en effet intéressant de compléter ces résultats par :

- L'isolement de *Pyrenophora tritici-repentis* chez le blé dur
- Réaliser l'infestation dans des conditions contrôlées afin d'estimer la plus faible concentration pouvant induire un stress oxydant.
- Le dosage des molécules de signalisation telles : Les EROs, l'acide salicylique et l'Ethylène.
- Détermination de la CMI et CMF de l'acide salicylique vis-à-vis du pathogène.
- Dosage d'autres biomarqueurs enzymatiques de stress tels que : SOD, GPX et les LOX (spécifique à la peroxydation lipidique).
- Elargir la gamme de concentration du cuivre afin déterminer la plus faible concentration pouvant induire un stress oxydant.
- Réalisation d'une étude in vitro pour l'interaction pathogène/cuivre et la détermination de la CMI et CMF du champignon.

Une telle étude devrait aussi être réalisée sur d'autres variétés de blé ou d'autres céréales en utilisant d'autres métaux afin de réaliser une évaluation de risque de leur transfert dans la chaîne alimentaire et par conséquent leur répercussion sur la santé humaine.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

« A »

- * Aboukhaddour R & Strelkov SE, Exploring de novo specificity: the *Pyrenophora tritici-repentis*–barley interaction, *The Journal of Plant Pathology*, Vol 65 (8), 2016, 1347-1357. DOI : 10.1111/ppa.12500.
- * Achard P, Renou JP, Berthome R, Harberd NP & Genschik P, Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species, *Current Biology*, 18, 2008, 656-660.
- * Adriano DC, Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals, 2nd ed, Springer, Verlag, 2001.
- * AFNOR, Le Dictionnaire de l'environnement, Les termes normalisés, Ed, AFNOR, Paris La Défense, 1994, 307 p.
- * Ahn YH, Lee SJ, Shin KM, Park EJ, The Vegetation and Flora of Village Groves in Paengseong-eup, Pyongtaek City, Gyonggi-Do, Korea, *Journal of Korean institute of Environment Ecology*, 21 (6), 2007, 515-525.
- * Akram A. Elicitation de la résistance systémique induite chez la tomate et le concombre et activation de la voie de la lipoxygénase par des rhizobactéries non-pathogènes [Thèse]. Belgique, Université de Liège (2008) 165p.
- * Alayat A, Souiki L, Djebbar MR, Boumedris ZE, Moumeni O and Berrebbah H, Cadmium Stress Induced Changes in Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation and Hydrogen Peroxide Contents in Barley Seedlings. *Advance Journal of Food Science and Technology*, Vol 9(7), 2015, 507-513.
- * Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, et al, Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* , vol 90, 1993, 7327-7331.
- * Amborabé BE, Rossard S, Pérault JM, and Roblin G, Specific perception of ergosterol by plant cells, *CR Biol*, 326, 2003, 363–370.

- * Amirouche Leila. Etude du pouvoir de sorption du Cuivre (II), du Zinc (II) et des polyphénols par les bentonites sous l'effet des irradiations micro-ondes. [Mémoire de magister]. Chimie de l'environnement, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou (2011).
- * Anonyme 1, 2017 : <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>
- * Anonyme 2 : Vo A, Saidnattar A et Sauvêtre M, TPE : Les plantes et leurs défenses, Webmasters, ©Copyright 2006. <http://tpe-vegetaux.pagesperso-orange.fr>
- * Aouali S, Douici-Khalfi A, Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie:symptômes, développement et moyens de lutte, ITGC, EL-Harrach, Alger, 2009, 56p.
- * Asada K, Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions, *Plant Physiology* 141, 2006, 391-396
- * Asada K, The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 1999, 601-639
- * Azizi N, Djebar MR, Sbartai H, Effect of Mg, Cu, Cd and Mg/Cd, Cu/Cd on Stress biomarkers in durum wheat, *Vol 9 (4)*, 2016, 102-113. DOI: 10.12692/ijb/9.4.102-113.
- * Azoui H. Etude du comportement d'une collection de blés cultivés en Algérie vis-à-vis de quelques stress biotiques [Mémoire de Magister]. Univ EL Hadj Lakhdar Batna, (2015) 109p.

« B »

- * Baize D, Les Éléments Traces Métalliques (ETM) dans les SOLS, INRA – Orléans Ed, 2007, 16 p.
- * Bajguz A, Metabolism of brassinosteroids in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 2007, 95-107.

- * Bajji M, Lutts S & Kinet JM, Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.* Vol 160, 2001, 669 -681.
- * Banci L, Bertini I, Calderone V, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A, Kallergi E, Lionaki E, Pozidis C, Tokatlidis K, Molecular recognition and substrate mimicry drive the electron-transfer process between MIA40 and ALR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (12), 2011, 4811–4816. DOI: 10.1073/pnas.1014542108 ; PMID: 21383138.
- * Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier M, Gagnon J, Triantaphlides C, Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells, *Plant J*, Vol 13 (4), 1998, 519–527. PMID: 9680997.
- * Bari R, Jones JD, Role of plant hormones in plant defence responses, *Jour Plant Mol Biol*, Vol 69 (4), 2009, 473–488. DOI: 10.1007/s11103-008-9435-0 ; PMID: 19083153.
- * Bartels D, & Nelson D, Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics. *Plant Cell and Environment* 17, 1994, 659-667.
- * Bayer, 2017 : www.bayer.com
- * Becker LB, New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion *Physiology, Cardiovascular Research* 61, 2004, 461-470
- * Bégos P, 2005, Reconnaître les maladies des céréales, dossier fongicide, paysan Breton, 1p.
- * Benbelkacem A, Bendif N, Résultats des enquêtes maladies et insectes des céréales en région Est de l'Algérie, *Bilan PNAB 2009/2010, Céréaliculture N°45*, 2010, 12-19.
- * Benderradji L, Hadji N, Kellou K, Benniou R and Brini F, Effet du NaCl et PEG 6000 sur le comportement morpho-physiologique et biochimique des variétés de blé

dur et tendre cultivées in vitro en milieu hydroponique, *Revue Agriculture*, Num spécial 1, 2016, 278-286.

* Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH, Mansfield JW. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell*. Vol 9 (2), 1997, 209–221. PMID: 9061952 ; PMCID: PMC156912.

* Birch SAJ, Vauthier SA, & Bloom P, Three- and four-yearolds spontaneously use others' past performance to guide their learning. *Cognition*, 107, 2008, 1018 –1034.

* Blamey RK, Principles of Ecotourism, In *The Encyclopaedia of Ecotourism*, Oxon, UK, New York, NY, CABI Pub, 2001, 5-22.

* Bleecker AB, and Kende H, Ethylene: A gaseous signal molecule in plants, *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 2000, 1-18. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.16.1.1 ; PMID: 11031228.

* Boller T, Felix G, A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors, *Annual Review of Plant Biology*, Vol 60, 2009, 379-406. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346 ; PMID: 19400727.

* Bolwell GP, The origin of the oxidative burst in plants, *Biochemical Society Transactions*, Vol 24(2), 1996, 438–442. PMID: 8736779.

* Bouarab K, Potin P, Correa J, and Kloareg B, Sulfated oligosaccharides mediate the interaction between a marine red alga and its green algal pathogenic endophyte, *Plant Cell* 11(9), 1999, 1635–1650. PMID: 10488232.

* Bouchelaghem S, Djebbar Berrebbah H and Djebbar MR, The impact of dust emits by the steel complex of El Hadjar (ANNABA) on two biological models: Mousses and lichens. *African Journal of Biotechnology*, Vol 10(18), 2011, 3574-3578.

* Boudreau A, et Ménard G, 1992, *Le Blé: éléments fondamentaux et transformation*, Ed Dominique Johnson, Université Laval, Canada, 1992, p439.

- * Boulal H, Zaghouane O, El Mourid M, Rezgui S, Guide pratique de la conduite des céréales d'automne (blés et orge) dans le Maghreb (Algérie, Maroc, Tunisie), Ed, ITGC, INRA, ICARDA, Algérie, 2007, 117-126.
- * Boulif, Gestion intégrée des maladies du blé, Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès BP, S/40, Meknès, 2012, 12p.
- * Bousba R, Ykhlef N and Djekoun A, Water use efficiency and flag leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum* Desf), World journal of agricultural sciences Vol 5(5), 2009, 609- 616.
- * Bradford M M, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, Journal of Analytical Biochemistry, Vol 72, 1976, 248-254. DOI : org/10.1016/0003-2697(76)90527-3 ; PMID: 94205.
- * Bravin MN, Processus rhizosphériques déterminant la biodisponibilité du cuivre pour le blé dur cultivé en sols à antécédent viticole [thèse]. Ecole doctorale (SIBAGHE), Montpellier SupAgro (2008) 237p.
- * Briat et Lebrun, 1999 Briat JF, Lebrun M, Plant responses to metal toxicity, C R Acad Sci III, 322 (1), 1999, 43–54. PMID: 10047953
- * Brink M, et Belay G, Céréales et légumes secs, Ed PROTA, Backhuys, 2006, p327.
- * Broekaert WF, Delauré SL, De Bolle MF, Cammue BP, The role of ethylene in host pathogen interactions, Annu Rev Phytopathol 44, 2006, 393–416. DOI:10.1146/annurev.phyto.44.070505.143440 ; PMID: 16602950.
- * Brookes PS, Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple, Free Radical Biology and Medicine 38, 2005, 12-23
- * Brun JP, Biron C, Martel J, et Ivers H, Évaluation de la santé mentale au travail : une analyse des pratiques de gestion des ressources humaines. Études et recherches / Rapport. IRSST, Montréal, 2001.

* Burkhead JL, Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Pilon M, Copper homeostasis, *Journal of New phytologist*, Vol 182 (4), june 2009, 799-816. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x ; PMID: 19402880.

« C »

* Cakmak I, & Horst JH, Effects of Aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*), *Physiologia Plantarum*, 83, 1991, 463-468.

* Calmes B. Reponses adaptatives d'*alternaria brassicicola* au stress oxydatif lors de l'interaction avec les brassicacees : Rôle du métabolisme du mannitol et des Glutathion-S-transférases [thèse]. France, Université d'Angers (2011) 201p.

* Cechin I, Rossi SC, Oliveira VC, Fumis TF, Photosynthetic responses and praline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit, *Photosynthetica* 44, 2006, 143–146. DOI: 10.1007/s11099-005-0171-2

* Chaignon V, Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides [Thèse], Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement, Université d'Aix-Marseille. France, (2001).

* Cheeseman JM, Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions, *Journal of Experimental Botany* 57, 2006, 2435-2444

* Chellali B, 2007, *Marché mondial des céréales : L'Algérie assure sa sécurité alimentaire.*

* Chinnusamy V, Schumaker K, and Zhu JK, Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, *J Exp Bot*, Vol 55(395), 2004, 225–236. DOI: 10.1093/jxb/erh005 ; PMID: 14673035.

* Chisholm ST, Coaker G, Day B, and Staskawicz BJ, Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response, *Cell*, Vol 124 (4), 2006, 803–814. DOI:10.1016/j.cell.2006.02.008 ; PMID: 16497589.

* Clemens S, Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis, *Planta*, Vol 212, 2001, 475–486.

* Colcombet J, and Hirt H, *Arabidopsis* MAPKs: A complex signalling network involved in multiple biological processes, *Biochem J*, Vol 413 (2), 2008, 217–226. DOI:10.1042/BJ20080625 ; PMID: 18570633.

* Coleman JOD, BlakeKalff MMA, Davies TGE, Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation, *Trends in Plant Science* 2, 1997, 144-151.

* Creelman RA, Mullet JE, Biosynthesis and action of jasmonates in plants, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48, 1997, 355–381. DOI: 10.1146/annurev.arplant.48.1.355 ; PMID:15012267.

* Cuypers C, Grotenhuis T, Joziasse J, & Rulkens W, Rapid persulfate oxidation predicts PAH bioavailability in soils and sediments. *Environmental science & technology*, Vol 34(10), 2000, 2057-2063.

« D »

* Dahmani-Muller H, van Oort F, Gélie B, Balabane M, Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter, *Environmental Pollution* 109, 1999, 1-8.

* Dangl JL, Dietrich RA, and Richberg MH, Death don't have no mercy: cell death programs in plant–microbe interactions, *Plant Cell* 8, 1996, 1793–1807.

* Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM, Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco, *Journal of Plant Physiology* 156, 2000, 659-665.

* David R, Joos TO, Dreyer C, Anteroposterior patterning and organogenesis of *Xenopus laevis* require a correct dose of germ cell nuclear factor (xGCNF) *Mech Dev*, Vol 79(1-2), 1998, 137–52. PMID: 10349627.

- * Davies MJ, Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen, *Photochem Photobiol* 3, 2004, 17-25.
- * De Vleeschauwer D, Höfte M, Rhizobacteria-induced systemic resistance, *Adv Bot Res*, 51, 2009, 223–281.
- * Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB, Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *J Exp Bot* 53, 2002, 1255-1272
- * Demiral T, Türkan I, Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment, *J Plant Physiol*, Vol 161, 2004, 1089-1100.
- * Dempsey DA, Shah J, and Klessig DF, Salicylic acid and disease resistance in plants, *Crit Rev Plant Sci*, Vol 18, 1999, 547–575.
- * Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells, *Journal of Experimental Botany* 55, 2004, 205-212.
- * Devriese M, Tsacalond V, Garboyo IJ, Leon R, Vilchez C, Vigala J, Effect of heavy metals on nitrate assimilation in eukaryotic microalga, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol Biochem*, Vol 39, 2001, 443- 448.
- * Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MS, & Wang L, The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular plant pathology*, 3(5), 2002, 371-390.
- * Dixon RA, Natural products and plant disease resistance, *Nature*, Vol 411(6839), 2001, 843-847
- * Djekoun A, & Planchon C, Stomatal conductance photosynthesis and acetylene reduction rate in Soybean genotypes, *Can J Plant sci*, Vol 72, 1992, 383-390.

* Donaldson MM, Tavares AA, Ohkura H, Deak P, and Glover DM, Metaphase arrest with centromere separation in polo mutants of *Drosophila*, *J Cell Biol.* Vol 153, 2001, 663-676.

* Dorey S, Kopp M, Fritig B, Kauffmann S, Induced defense mechanisms in plant-fungus interactions: differences between cells in culture and leaf tissue. In: Altman A, Izhar S, Ziv M, editors, *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture: Plant Biotechnology and in Vitro Biology in the 21st Century*, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, Vol 36, 1999, 473–476.

* Douce R, Heldt HW, Photorespiration, In STD Leegood RC, von Caemmerer S, eds, ed, *Photosynthesis: physiology and metabolism*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000, 115–136.

* Draper HH, Hadley M, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Meth Enzymol*, Vol 186, 1990, 421-431. DOI: [org/10.1016/0076-6879\(90\)86135-I](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I) ; PMID: 2233309.

* Dreier W, Goring M, Der einfluss hoher salzkonzentrationen auf verschiedene physiologische parameter von maissprossen, *Win Z, der HU Berlin, Natw.Naturwiss R*, 23, 1974, 641-644.

* Dubreuil C. mode d'action de l'acide β -aminobutyrique chez la vigne : un inducteur de résistance aux pathogènes et étude des mécanismes impliqués dans la sensibilité aux pathogènes du mutant *pad2* d'*Arabidopsis* déficient en glutathion [thèse]. France, Université de Bourgogne (2010) 265p.

* Durrant WE, Dong X, Systemic acquired resistance, *Annu Rev Phytopathol*, Vol 42, 2004, 185-209. DOI: [10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421) ; PMID: 15283665.

« E »

* El Jaafari S, Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé [Thèse]. Univ Gembloux. Belgique (1993) 214p.

- * Ellis C, Telling secrets, revealing lives: Relational ethics in research with intimate others. *Qualitative Inquiry*, Vol 13(1), 2007, 3-29.
- * Espinosa A, Alfano JR, Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity, *Cell Microbiol*, Vol 6 (11), 2004, 1027–1040. DOI:10.1111/j.1462-5822.2004.00452.x ; PMID: 15469432.
- * Evans MCW, Nugent JHA, Ball RJ, Muhiuddin I, Pace RJ, Evidence for a direct manganese-oxygen ligand in water binding to the S-2 state of the photosynthetic water oxidation complex, *Biochemistry* 43, 2004, 989-994.
- * Ezzahiri B, Les maladies du blé, Programme national de transfert de technologie en agriculture (PNTTA) N0 77 IAVH II, 2001.

« F »

- * Farmer EE, Davoine C, Reactive electrophile species, *Curr Opin Plant Biol*, Vol 10 (4), 2007, 380–386. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.04.019 ; PMID: 17646124.
- * Feldman M, Origin of Cultivated Wheat, In Bonjean AP et WJ, Angus (Éd), *The World Wheat Book: a history of wheat breeding*, Intercept Limited, Andover, Angleterre, p3-58.
- * Ferfar M. Toxicité et Bioaccumulation de Pesticides sur quelques Variétés de Blé dur (*T.durum* Desf) [thèse]. UBMA (2017) 372p.
- * Ferrer M, Lucas D, Battista M, Frenette PS, Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations, *Nature* 452, 2008, 442–447. DOI:10.1038/nature06685.
- * Fest E, Temminghoff EJM, Comans RNJ, Van Riemsdijk, WH, Partitioning of organic matter and heavy metals in a sandy soil: Effects of extracting solution, solid to liquid ratio and pH, *Geoderma*, vol 146 (1-2), 2008, 66-74.
- * Feuillet P, *Le grain de blé (composition et utilisation)*, INRA ed, Paris, 2000, 308p.
- * Flor HH, *Phytopathology*, Vol 45, 1955, 680–685.

- * Forrer HR, Hecker A, La maladie des taches auréolées: susceptibilité des variétés de blé et lutte, Recherche Agronomique, Suisse, vol 10(3), 2003, 98-103.
- * Foyer CH, and Noctor G, Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. Plant Physiol, Vol 155, 2011, 2-18. DOI: 10.1104/pp.110.167569
- * Foyer CH, and Noctor G, Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications, Antioxid. Redox Signal, Vol 11, 2009, 861-905. DOI: 10.1089/ars.2008.2177
- * Foyer CH, Noctor G, Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses, Plant Cell, Vol 17, 2005, 1866-1875.
- * Foyer CH, Noctor G, Redox regulation in photosynthetic organisms: signalling, acclimation and practical implications, Antioxid Redox Signal, Epub ahead of print, 2008.
- * Fry R, Barrett F, Seiling J, & Whitney D, Appreciative Inquiry And Organizational Transformation: Reports From The Field, Westport, CT: Quorum, 2002.
- * Garcia B A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A, Early signaling events induced by elicitors of plant defenses, Mol Plant-Microbe Interact, Vol 19(7), Jul 2006, 711-724. DOI: 10.1094/MPMI-19-0711 ; PMID: 16838784.

« G »

- * Garcion C, Lamotte O, Métraux JP, Mechanisms of defense to pathogens: biochemistry and physiology, in Induced Resistance for Plant Defence, eds Walters DR, Newton AC, Lyon GD, editors. (Oxford: Blackwell Publishing;), 2007, 109–132 DOI : 10.1002/9780470995983.ch6
- * Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C, Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, Bioessays 28, 2006, 1091-1101.

- * Gerber IB, & Dubery IA, Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry*, 65(22), 2004, 2957-2966.
- * Gheraibia H, Souiki L, Bennoua S, and Djebbar MR, Comparative Study of the Biochemical and Physiological Mechanisms of Two Varieties of Durum Wheat (*Triticum durum* L.) Subject to Salt Stress, *Indian Journal of Science and Technology*, Vol 9(7), 2016. DOI: 10.17485/ijst/2016/v9i7/84670.
- * Gheraibia H, Souiki L, Derbel N, Berrebbah H, and Djebbar MR, Tolerance to salt stress applied on two local varieties of Durum Wheat, Benbachir, and Sémito, *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, Vol 4(1), 2014, 54-58.
- * Giorcelli A, Sparvoli F, Mattivi F, Tava A, Balestrazzi A, Vrhovsek U, Calligari P, Bollini R, Confalonieri M, Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides, *Transgenic Research*, Vol 13(3), 2004, 203–214. PMID: 15359598.
- * Glazebrook J, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, Vol 43, 2005, 205–227. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923 ; PMID: 16078883
- * Glazebrook J, Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*: 2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol* Vol 4(4), 2001, 301–308. PMID: 11418339.
- * Göhre V, Robatzek S, *Annu Rev Phytopathol*, 46, 2008, 189-215.
- * Goldsworthy GJ, Mordue W, Guthkelch J, Studies on insect adipokinetic hormones, *Gen Comp Endocrine*, Vol 18, 1972, 545-551.
- * Govrin E.M., Rachmilevitch S., Tiwari B.S., Solomon M., Levine A. An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology*, Vol 96(3), 2006, 299–307. DOI:10.1094/PHYTO-96-0299 ; PMID: 18944445.

- * Govrin EM, Levine A, The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*, *Curr Biol*, Vol 10(13), 2000, 751–757. PMID:10898976.
- * Graham DW, Corliss BH, Bender ML, & Keigwin LD, Carbon and oxygen isotopic disequilibria of recent deep-sea benthic foraminifera. *Marine micropaleontology*, Vol 6 (5-6), 1981, 483-497.
- * Grant S, Contoreggi C, London DC, Drug abusers show impaired performance in a laboratory test of decision-making, *Neuropsychologia*, 38(8), 2000, 1180-1187. PMID:10838152.
- * Gravot A, La réponse de stress chez les végétaux, UMR 118-APBV INRA-Agrocampus Ouest-Université de Rennes 1, 2009, 34p.
- * Greenberg JT, and Yao N, The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions, *Cell Microbiol*, Vol 6(3), 2004, 201–211. PMID: 14764104.
- * Guan LQ, Scandalios JG, Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases, *Journal of Molecular Evolution* 42, 1996, 570- 579.
- * Gutteridge JMC, Halliwell B, Free radicals and antioxidants in the year 2000 – A historical look to the future. In *Reactive Oxygen Species: from Radiation to Molecular Biology*, Vol 899, 2000, 136-147.

« H »

- * Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, Glutathione S-transferases, The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 249 (22), 1974, 7130-7139. PMID: 4436300
- * Hall DE, MacGregor KB, Nijssen J, Bown AW, Footsteps from insect larvae damage leaf surfaces and initiate rapid responses, *Eur J Plant Pathol*, Vol 110, 2002, 441–447.

- * Halliwell B, Gutteridge JMC, Free Radicals in Biology and Medicine, Ed 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.
- * Halliwell B, Reactive species and antioxidants, Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiology* 141, 2006, 312-322.
- * Hamiduzzaman M, Jakab G, Barnavon L, Neuhaus J, Mauch-Mani B, beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling, *Mol Plant Microbe Interact*, Vol 18(8), 2005, 819–829. DOI: 10.1094/MPMI-18-0819 ; PMID: 16134894.
- * Hammerschmidt R, Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol 55, 1999, 77–84.
- * Hammond-Kosack KE, Kanyuka K, Resistance genes (R genes) in plants, En: *Encyclopedia of Life Sciences*, J W Sons, ed, Londres, 2007, 1-21.
- * Harrièreche, Étude des effets du cadmium et de combinaisons cadmium- calcium sur la germination et le métabolisme respiratoire du blé dur (*Triticum durum* Desf). [Mémoire de magistère]. U.B.M.A, (2004) 63pages.
- * Havaux M, Effects of temperature on the transitions between state 1 and 2 in intact maize leaves, *Plant Physiol.Biochem*, Vol 26, 1988, 245-251.
- * Hawkins S, Boudet A, Defence lignin and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii*, *Forest Pathology* 33, 2003, 91-104.
- * Heath MC, Non-host resistance and non-specific host defense, *Current Opinion in Plant Biology*, Vol 3(4), 2000, 315–319. PMID: 10873843.
- * Heitefuss R, Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example, *Naturwissenschaften* Vol 88, 2001, 273-283.

- * Hellman H, Funck D, Rentsch D, and Frommer WB, Hypersensitivity of an arabidopsis sugar signaling mutant toward exogenous proline application, *Plant Physiology*, Vol 122, 2000, 357-367.
- * Hematy K, Cherk C, Somerville S, Host-pathogen warfare at the plant cell wall, *Curr Opin Plant Biol*, 12(4), 2009, 406-413. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.06.007 ; PMID: 19616468.
- * Hennouni N. Evaluation du métabolisme respiratoire et enzymatique des racines de blé dur (*Triticum durum* Desf) issues de plantes infectées par les maladies cryptogamiques et de plantes traitées avec un fongicide (ARTEA EC 330) [Thèse]. Université Badji Mokhtar Annaba (2012).
- * Hikosaka K, Ishikawa K, Borjigidai A, Muller O, and Onoda Y, Temperature acclimation of photosynthesis: mechanisms involved in the changes in temperature dependence of photosynthetic rate, *J Exp Bot*, Vol 57, 2006, 291-302.
- * Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120, *Nat Med*, Vol 11(1), 2005, 90-94. DOI: 10.1038/nm1168 ; PMID: 15619630.
- * Hofius D, Tsitsigiannis DI, Jones JD, Mundy J, Inducible cell death in plant immunity, *Seminars in Cancer Biology*, Vol 17(2), 2007, 166-187. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.12.001 ; PMID: 17218111.
- * Holden M, Chlorophylls and biochemistry, 2nd Ed, Academic press, New York, 1975, p133.
- * Holub EB, Beynon JL, Crute IR, Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*, *Mol, Plant-Microbe Interact* 7, 1994, 223–239.
- * Hoshang, Etude de l'adaptation à la sécheresse et à la salinité de deux variétés d'orge (*Hordeum Vulgare L*) [thèse] D.A.A.INRA, Montpellier (1988).

* Hossain MK, Strezov V, Chan KY, Ziolkowski A, & Nelson PF, Influence of pyrolysis temperature on production and nutrient properties of wastewater sludge biochar, *Jour of Env Management*, Vol 92(1), 2011, 223-228.

* Hu X, Reddy AS, Cloning and expression of a PR5-like protein from Arabidopsis: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein *Plant Mol Biol*, Vol 34, 1997, 949-959.

* Hu Y, Reduction of Htt inclusion formation in strains of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in certain DNA repair functions: a statistical analysis of phenotype, *Exp Cell Res*, Vol 291(1), 2003, 46-55. PMID: 14597407.

« I »

* Issaad G, Djebbar MR, and Berrebbah H, ROS and redox signaling in the response of stems of wheat durum to abiotic stress. *International Journal of Biosciences* 3 (10), 2013, 298-305.

* Iwasaki S, Miyata K, Fine structure of the dorsal epithelium of the mongoose tongue, *J. Anat*, Vol 172, 1990, 201-212. PMID: 1703142.

« J »

* Jack L, Hayes SC, Jeanfreau SG, Stetson B, Jones-Jack NH, Valliere R, LeBlanc C, Appraising quantitative research in health education: Guidelines for public health educators. *Health Promotion Practice*, Vol 2, 2007, 161-165.

* Jacques P, *Les céréales*, 1970, pp49.

* Jalloul A, Clerivet A & Nicole M, La signalisation hormonale dans la résistance des plantes aux bioagresseurs, *Cahiers Agricultures*, 18, 2009, 493-497.

* Jaspard, Macherel, & Hunault, Computational and statistical analyses of amino acid usage and physico-chemical properties of the twelve late embryogenesis abundant protein classes, *PLoS One* 7, e36968, 2011.

* Jeantet R, Croguennec T, Schuck P, & Brulé G, Science des aliments : Biochimie- Microbiologie- Procédés- Produits, V2, Technologie des produits alimentaires, (éd) TEC & DOC, Paris, 2006.

* Jimenez A, Hernandez JA, delRio LA, Sevilla F, Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves, *Plant Physiology* 114, 1997, 275-284.

* Jones JD, Dangl JL, The plant immune system, *Nature*, Vol 444 (7117), 2006, 323–329. DOI: 10.1038/nature05286 ; PMID: 17108957.

* Jung BG, Lee KO, Lee SS, Chi YH, Jang HH, Kang SS, Lee K, Lim D, Yoon SC, Yun DJ, Inoue Y, Cho MJ, Lee SY, A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase, *Journal of Biological Chemistry* 277, 2002, 12572-12578.

« K »

* Kabata-Pendias A and Pendias H (1992) Copper. In: Trace elements in soils and plants, 2nd Edition, CRC Press, pp. 95–108.

* Kabata-Pendias A, Pendias H, Trace elements in soils and plants, 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington DC, 2001.

* Kabata-Pendias A, Trace elements in soil and plants, 4th edn, CRC, Boca Raton, FL, 2010.

* Kazan K & Manners JM, Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14, 2009, 373-382.

* Keen NT, Specific elicitors of plant phytoalexin production: detenninants of race specificity in pathogens?. *Science*, Vol 187(4171), 1975, 74-75.

- * Khaldi F, Mécanismes d'action des polluants chimiques industriels (engrais et NOx) sur des bio-indicateurs de pollution (Mousses et Lichens) [Thèse]. Université Badji Mokhtar Annaba. (2012).
- * Khedr AHA, Abbas MA, Wahid, AAA, Proline induces the expression of salt-stress responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L, to salt-stress, *Journal of Experimental Botany*, Vol 54, 2003, 55-62.
- * Khosravinejad F, Heydari R, and Farboodnia T, Antioxidant responses of two barley varieties to saline stress, *Res J Biol Sci*, Vol 3, 2008, 486-490.
- * Kim MS, Kim HS, Kim YS, Baek KH, Oh HW, Hahn KW, Bae RN, Lee IJ, Joung H, Jeon JH, Superoxide anion regulates plant growth and tuber development of potato, *Plant Cell Reports* 26, 2007, 1717-1725.
- * Kim SY, Lim JH, Park MR, Kim YJ, Park TI, Seo YW, Choi KG, and Yun SJ, Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol 38, 2005, 218-224.
- * Kinraide TB, Perler JF, Parker DR, Relative effectiveness of calcium and magnesium in the alleviation of rhizotoxicity in wheat induced by copper, zinc, aluminum, sodium, and low pH. *Plant Soil*, 259, 2004, 201-208.
- * Klarzynski O, Fritig B, Stimulation des défenses naturelles des plantes, *C. R. Acad. Sci, Paris, Ser. III*. 324, 2001, 953-963.
- * Knight H, & Knight MR, Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in plant science*, Vol 6(6), 2001, 262-267.
- * Kobayashi Y, Kume A, Li M, Doyu M, Hata M, Ohtsuka K, Sobue G, Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem* 275, 2000, 8772-8778.

- * Kolarovic L, Valentovic P, Luxova M, and Gasparikova O, Changes in antioxidants and cell damage in heterotrophic maize seedlings differing in drought sensitivity after exposure to short-term osmotic stress *Plant Growth Reg* Vol 59, 2009, 21-26.
- * Konno D, Yoshimura S, Hori K, Maruoka H, and Sobue K, Involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase/rac1 and cdc42 pathways in radial migration of cortical neurons, *J Biol Chem* 280, 2005, 5082-5088.
- * Kopittke PM, Menzies NW, Effect of Cu toxicity on the growth of Cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil* 279, 2006, 287-296.
- * Krieger-Liszkay A, Singlet oxygen production in photosynthesis, *Journal of Experimental Botany* 56, 2005, 337-346.
- * Kunkel BN, and Brooks DM, Cross talk between signaling pathways in plant defense, *Curr Opin Plant Biol*, Vol 5, 2002, 325-331.
- * Kuppusamy KT, Walcher CL & Nemhauser JL, Cross-regulatory mechanisms in hormone Signalling, *Plant Molecular Biology*, 69, 2009, 375-381.

« L »

- * Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, and Rothstein S, Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 1987, 7542-7546.
- * Lange KW, Sahakian BJ, Quinn NP, Marsden CD, and Robbins TW, Comparison of executive and visuospatial memory function in Huntington's disease and dementia of Alzheimer type matched for degree of dementia, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Vol 58, 1995, 598-606. DOI: 10.1136/jnnp.58.5.598
- * Lecourieux D, Ranjeva R, Pugin A, Calcium in plant defence-signalling pathways, *New Phytol* , 171(2), 2006, 249-269. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01777.x ; PMID: 16866934.

- * Lecourieux-Ouaked F, Pugin A, and Lebrun-Garcia A, Phosphoproteins involved in the signal transduction of cryptogein, an elicitor of defense reactions in tobacco, *Mol Plant-Microbe Interact*, Vol 13(8), 2000, 821-829. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.8.821 ; PMID:10939253
- * Leprince O, Atherton NM, Deltour R, Hendry GAF, The involvement of respiration in free-radical processes during loss of desiccation tolerance in germinating *Zea mays* L - An electron-paramagnetic-resonance study, *Plant Physiology* 104, 1994, 1333-1339
- * Lev-Yadun S, Gopher A, & Abbo S, The cradle of agriculture. *Science*. Vol 288, 2000, 1602-1603.
- * Li J, Brader G & Palva ET, The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate mediated signals in plant defense, *The Plant Cell*, 16, 2001, 319-331.
- * Li Y, Hough CJ, Suh SW, Sarvey JM, and Frederickson CJ, Rapid translocation of Zn⁽²⁺⁾ from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation, *J Neurophysiol*, vol 86(5) , 2009, 2597-2604. PMID: 11698545.
- * Ligterink W, and Hirt H, MAP kinase pathways in plants: Versatile signaling tools, *Int Rev Cytol*, Vol 201, 2000, 209-258. PMID: 11057833.
- * Lin JM, Schroeder A, Allada R, In vivo circadian function of casein kinase 2 phosphorylation sites in *Drosophila* PERIOD, *Journal of Neurosci*, Vol 25(48), 2005, 11175-11183. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2159-05.2005 ; PMID: 16319317.
- * Liu K, Sun J, Song YG, Liu B, Xu YK, Zhang SX, Tian Q, Liu Y, Superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in D1/D2/cytochrome b-559 Photosystem II reaction center complex, *Photosynthesis Research* 81, 2004, 41-47

- * Llorente F, Muskett P, Sanchez-Vallet A, Lopez G, Ramos B, Sanchez-Rodriguez C, Jorda L, Parker J, & Molina A, Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi, *Molecular Plant*, 1, 2008, 496-509.
- * Loake G, Grant M, Salicylic acid in plant defence-the players and protagonists, *Curr Opin Plant Biol*, Vol 10(5), 2007, 466–472. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.08.008 ; PMID: 17904410.
- * Loggini 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* 119, 1999, 1091-1099.
- * Lopez A, et al, Chemical-genetic approaches for exploring the mode of action of natural products, *Prog Drug Res* Vol 66(237), 2008, 239-71.
- * Loretto E, De Bellis L, Alpi A, & Perata P, Why and how do plant cells sense sugars? *Ann Bot* 88, 2001, 803-812.
- * Lou HC, Luber B, Crupain M, Keenan JP, Nowak M, Kjaer TW, Sackeim HA, Lisanby SH, Parietal cortex and representation of the mental Self Proc, *Natl Acad Sci USA*, Vol 101, 2004, 6827-6832.
- * Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, and Foyer CH, Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat, *J Exp Bot*, Vol 56, 2004, 417-23.
- * Lyon D, Surveillance studies: An overview, 2007, Polity.

« M »

- * Ma NL, Rahmat Z, Lam SS, A review of the “omics” approach to biomarkers of oxidative stress in *Oryza sativa*, *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, Vol 14 (4), 2006, 7515-7541.

- * MacDonald JD, Hendershot WH, Modelling trace metal partitioning in forest floors of northern soils near metal smelters, *Environmental Pollution*, Vol 143 (2), 2006, 228-240.
- * Manon Gault, L'homéostasie des métaux chez la bactérie *Escherichia coli* : de l'analyse générale d'un stress sur l'expression des gènes, à la compréhension des mécanismes moléculaires [thèse]. L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon (2014) 218p.
- * Marschner H, *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd Academic Press, San Diego 1995, 889pp.
- * Marschner P, *Mineral nutrition of higher plants*, 3rd ed, Germany, Universitat of Hohenheim, 2011, 672 pp.
- * Martin N, Bureau DP, Marty Y, Kraffe E, & Guderley H, Dietary lipid quality and mitochondrial membrane composition in trout: responses of membrane enzymes and oxidative capacities, *J Comp Physiol B*, 2012. DOI :10.1007/s00360-012-0712-5.
- * Martin WB, Silly L, Murphy CM, Raley TJ and Cotter RJ, Fragmentation of carbohydrates in laser desorption, plasma desorption and fast atom bombardment mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 92, 1989, 243-265.
- * Mauch-Mani B & Mauch F, The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions, *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 2005, 409-414.
- * McAinsh MR, Brownlee C, & Hetherington AM, Abscisic Acid-Induced Elevation of Guard Cell Cytosolic Ca²⁺ Precedes Stomatal Closure, *Nature*, Vol 343(6254), 1990, 186.
- * McBride MB, Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize, *Journal of Environmental Quality*, Vol 30, 2001, 78-84.
- * McDowell et Dangl 2000, McDowell JM, et al, Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in *Arabidopsis* vary in functional requirements for NDR1, EDS1, NPR1, and salicylic acid accumulation, *Plant J*, Vol 22, 2000, 523-529.

- * McLusky SR, Bennett MH, Beale MH, Lewis MJ, Gaskin P, & Mansfield JW, Plant J, Vol 17, 1999, 523–534.
- * Mefti M, Abdelguerfi A, et Chebouti A, Etude de la tolérance à la sécheresse chez quelques populations de *Medicago truncatula* (L.) Gaertn Science, Vol 5, 1998, 173-176.
- * Meksem AL, Etude des effets de deux fongicides : Le Flamenco SC et le Tilt 250EC sur la physiologie, la croissance, et le métabolisme énergétique des racines isolées de *Triticum durum* Desf : Variétés GTA dur et Vitron [Thèse de doctorat d'état]. UBMA, 2007.
- * Melotto M, Underwood W, Kozczan J, Nomura K & He SY, Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion, Cell, 126, 2006, 969-980.
- * Mengel K and Kirkby EA, Soil copper, In: Principles of plant nutrition, 5th Edition, Kluwer Academic Publishers, 2001, 599–611.
- * Michaud A, Interaction entre biodisponibilité, phytotoxicité du cuivre et nutrition en fer de graminées -mécanismes physiologiques et rhizosphériques- [thèse]. Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques, Montpellier SupAgro, (2007).
- * Mittler R, Herr EH, Orvar BL, van Camp W, Willekens H, Inze D, Ellis BE, Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 1999, 14165-14170.
- * Mittler R, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends in Plant Science 7, 2002, 405-410.
- * Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, and Breusegem FV, Reactive oxygen gene network of plants, Trends in Plant Science, Vol 9(10), 2004, 490-498.
- * Moller IM, Jensen PE, Hansson A, Oxidative modifications to cellular components in Plants, Annual Review of Plant Biology 58, 2007, 459-481

- * 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* 52, 2001, 561-591
- * Monneveux P, & Nemmar M, Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf): étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement, *Agronomie*, Vol 6(6), 1986, 583-590.
- * Montesano M, Brader G, and Palva ET, Pathogen derived elicitors: Searching for receptors in plants, *Mol Plant Path*, Vol 4(1), 2003, 73–79. DOI: 10.1046/j.1364-3703.2003.00150.x ; PMID: 20569365.
- * Mortvedt JJ, Mays DA, Osborn G, Uptake by wheat of cadmium and other metal contaminants in phosphate fertilizers, *J Environ Qual*, Vol 10 (2), 1981, 193-197.
- * Mosher RA, Durrant WE, Wang D, Song J, Dong X, A comprehensive structure-function analysis of Arabidopsis SNI1 defines essential regions and transcriptional repressor activity, *Plant Cell*, Vol 18 (7), 2006, 1750–1765. DOI: 10.1105/tpc.105.039677 ; PMID: 16766691.
- * Mouellef A, Caractères physiologiques et biochimiques de tolérance du blé dur (*Triticum durum* Desf.) au stress hydrique [Thèse de magistère]. Université Mentouri Constantine (2010).
- * Moustakas LA, Davis M, Graham JR, Silk J, Peterson BA, & Yoshii Y, Colors and K-band counts of extremely faint field galaxies, *The Astrophysical Journal*, 475(2), 1997, 445.
- * Mueller SC, Early androgen exposure modulates spatial cognition in congenital adrenal hyperplasia (CAH) *Psychoneuroendocrinology*, Vol 33, 2008, 973–80.
- * Muller B & Sheen J, Advances in cytokinin signalling, *Science*, 318, 2007, 68-69.

* Murata N, Takahashi S, Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Photoinhibition of photosystem II under environmental stress, *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1767, 2007, 414-421.

« N »

* Nakashita MA, Nakamura Y, Yamaya T, and Takahashi H, A novel regulatory pathway of sulfate uptake in Arabidopsis roots: Implication of CRE1/WOL/AHK4-mediated cytokinin-dependent regulation, *Plant J*, Vol 38(5), 2003, 779–789. DOI:10.1111/j.1365-313X.2004.02079.x ; PMID: 15144379.

* Nasraoui B, Les champignons parasites des plantes cultivées, Centre de Publication Universitaire, Tunis, 2006, 456p.

* Navari-Izzo F, Pinzino C, Quartacci MF, Sgherri CLM, Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat, *Free Radical Research* 31, 1999, S3-S9

* Nedjah I, 2014. Changements physiologiques chez des plantes (Blé dur *Triticum durum* Desf.) Exposées à une pollution par un métal lourd (plomb) [Thèse]. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie (2014).

* Neill SJ, Desikan D, Clarke A, Hancock JT, Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells, *Plant Physiology*, Vol 128, 2002, 13-16.

* Niderman T, Genetet I, Bruyère T, Gees R, Stinzi A, Legrand M, Fritig B, Möisinger E, Pathogenesis-related PR1-proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14 kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*, *Plant Physiol*, Vol 108(1), 1995, 17-27. PMID: 7784503.

* Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, MarquezGarcia B, Queval G, and Foyer CH, Glutathione in plants: An integrated overview, *Plant Cell Environment*, Vol 35, 2012, 454-484.

- * Noguchi T, Dual role of triplet localization on the accessory chlorophyll in the photosystem II reaction center: Photoprotection and photodamage of the D1 protein, *Plant and Cell Physiology* 43, 2002, 1112-1116
- * Nouri L, Ajustement osmotique et maintien de l'activité photosynthétique chez le blé dur (*Triticum durum*, Desf), en condition de déficit hydrique [Thèse de Magistère] en Biologie végétale, Univ Mentouri, Constantine. (2002) 77p.
- * Nühse TS, Bottrill AR, Jones AM, Peck SC Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses, *Plant J*, 51, 2007, 931-940.
- * Nürnberger T, Kemmerling B, PAMP Triggered basal Immunity in plants, *Advances in Botanical Research*, 51, 2009, 1-38.
- * Nürnberger, T, Brunner F, Kemmerling B, and Piater L, Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences, *Immunol Rev*, 198, 2004, 249–266.
- * Nyathi Y, Baker A, Plant peroxisomes as a source of signalling molecules, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1763, 2006, 1478-1495.

« O »

- * OAIC : Office Algérienne Interprofessionnelle des céréales d'EL Hadjar Annaba. 2012.
- * Onfaa (, Note de conjoncture N=° 07 Avril 2016, Commerce international des céréales, 2016a.
- * Onfaa, Note de conjoncture N=° 03 Mai 2016, Suivre de campagne céréales, 2016b.
- * Ozgur R, Turkan I, Uzilday B, and Sekmen AH, Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Experimental Botany*, 65, 2014, 1377-1390.

« P »

- * Palmer CM, Guerinot ML, Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Journal of Nature Chemical Biology*, Vol 5 (5), April 2009, 333-340. DOI:10.1038/nchembio.166 ; PMID: 19377460.
- * Panter SN, Jones DA, Age-related resistance of plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, Vol 38, 2002, 251-280.
- * Papanov I, Papanov M, Teeale W, Menges M, Chkrabortee S, Muray J & Palme K, Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*, *Molecular Plant*, 1, 2008, 321-337.
- * Parent C, Capelli N, Dat J, Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes, *C R Biologies*, 2008, 331 pages.
- * Pedley KF, Martin GB, Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity, *Curr Opin Plant Biol*. 8, 541 *Current Opinion in Plant Biology*, Vol 8 (5), 2005, 541-547. DOI: 10.1016/j.pbi.2005.07.006 ; PMID: 16043387.
- * Perrono P, Les micropolluants métalliques des boues de stations d'épuration urbaine et l'épandage agricole, *Mém DUESS, DEP, Univ Picardie, Amiens*, 1999.
- * Pesci P, and Beffagna N, Inhibiting effect of fusicoccin on abscisic acid-induced proline accumulation in barley leaf segments, *Plant Science Letters*, 36, 1984, 7-12.
- * Pieterse CMJ, and Van Loon LC, Signalling cascades involved in induced resistance. In Walters D, Newton A, and Lyon G, eds. *Induced Resistance for Plant Defence: A Sustainable Approach to Crop Protection*, Blackwell Publishing, Oxford, 2007, 65-88.
- * Pieterse CMJ, van Loon LC, Salicylic acid-independent plant defence pathways, *Trends in Plant Science*, Vol 4, 1999, 52-58.
- * Pieterse CMJ, van Wees SCM, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, and van Loon LC, A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, Vol 10, 1998, 1571–1580.

* Pitzschke A, Schikora A, and Hirt H, MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, Vol 12(4), 2009, 421-426. DOI: 10.1016/j.pbi.2009.06.008 ; PMID: 19608449.

* Ponchet M, Panabières F, Milat M-L, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycetes communications?, *Cell Mol Life Sci*, Vol 56 (11-12), 2000, 1020-1047. PMID: 11212320.

* Profotová B, Burketova L, Novotna Z, Martinec J, Valentova O, Involvement of phospholipases C and D in early response to SAR and ISR inducers in Brassica napus plants. *Plant Physiol Biochem*, Vol 44 (2-3), 2006, 143-151.

* Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J, Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and pentose phosphate pathway, *Plant Cell*, Vol 9(11), 1997, 2077–2091. DOI: 10.1105/tpc.9.11.2077 ; PMID: 12237354.

* Puig S, Andres-Colas N, Garcia-Molina A and Penarrubia L, Copper and iron homeostasis in Arabidopsis: response to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications, *Plant Cell and Environment*, Vol 30, 2007, 271–290.

« Q »

* Quartacci MF, Pinzino C, Sgherri CLM, Dalla Vecchia F, Navari-Izzo F, Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat, *Physiol Plant*, 108, 2000, 87-93.

« R »

* Rabea EI, Badawy MET, Stevens CV, Smaghe G, Steurbaut W, Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action, *Biomacromolecules*, Vol 4(6), 2003, 1457-1465. DOI:10.1021/bm034130m ; PMID: 14606868.

- * Raïssac M, Réponse physiologique du soja à la sécheresse, étude de la variabilité génétique. [Thèse de docteur-ingénieur] : Sciences Agronomiques : Institut national polytechnique de Toulouse. ENSAT (1984).
- * Ramel F, Implication des sucres solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez *Arabidopsis thaliana* [thèse]. L'Université de Rennes 1, (2009) 307p.
- * Ramel F, Sulmon C, Gouesbet G, Couée I, Natural variation reveals relationships between pre-stress carbohydrate nutritional status and subsequent responses to xenobiotic and oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*, *Annals of Botany*, Vol 104, 2009b, 1323-37, DOI:10.1093/aob/mcp243.
- * Raskin I, Salicylate, A New Plant Hormone, *Journal of Plant Physiol*, Vol 99(3), Jul 1992, 799-803. PMID: PMC1080546.
- * Rejeb S, Effets des eaux usées traitées et des boues résiduelles sur la croissance et la composition chimique de quelques espèces végétales [thèse]. Physiologie Végétale, Faculté des Sciences de Tunis (1990) 153p.
- * Rémus B W, Étude du rôle de la silice chez le blé dans l'induction des molécules de défense lors d'une infection par le blanc [Thèse]. Québec, l'Université de Laval, Québec (2007) 125p.
- * Rengel Z, Heavy Metals as Essential Nutrients, In: Prasad MNV, & Hagemayer J, (Eds), *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*, Springer-Verlag, Berlin, 1999, 231- 251.
- * Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD, Pathological hormone imbalances, *Curr Opin Plant Biol*, Vol 10, 2007, 372-379.
- * Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J, Mitogen-activated protein kinase signaling in plants, *Annu Rev Plant Biol*, Vol 61, 2010, 621-649. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112252 ; PMID: 20441529.

* Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J, Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms, *Annu Rev Plant Biol*, Vol 57, 2006, 675–709. DOI:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105441 ; PMID: 16669778.

* Ruel T, Document sur la culture du blé, édition Educagri, 2006.

* Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, and Hunt MD, Systemic acquired resistance, *Plant Cell*, Vol 8, 1996, 1809-1819.

« S »

* Salt DE, Blaylock M, kumar PBAN, Dushenkov V, Ensley BD, Chet L, Raskin L, Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, *Biotechnology*, Vol 13(5), 1995, 468-474. PMID: 9634787.

* Salzer JL, Charles L, Rosen AF, Struyk AF, GPI-anchored proteins in neural cell adhesion, *Advances in Molecular and Cell Biology Elsevier*, ed Colman DR, Vol16, 1996, 193–222. DOI:org/10.1016/S1569-2558(08)60067-3.

* Sanchez-Casas P, Klessig DF, A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species, *Plant Physiol*, 106, 1994, 1675-1679

* Sanita di Toppi L, Gabbrielli R, Response to cadmium in higher plants, *Environ, Exp Bot*, Vol 41, 1999, 105-130.

* Savouré A, Jaoua S, Hua XueJun, Ardiles W, Van Montagu M, Verbruggen N, Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the DELTA 1- pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Letters* .372, 1995, 13 -19.

* Sayoud R, Les principales maladies des blés en Algérie, SYNGENTA, Diapo, 2008.

* Sbartai H, Djebbar MR, Sbartai I, Berrebbah H, Bioaccumulation of Cd and Zn in Tomato *Lycopersicon esculentum*, *Direct Science C.R. Biologies* 335, 2012, 585-593. DOI:10.1016/j.crv.2012.08.001.

- * Sbartai I, Sbartai H, Yaiche F, Mokhtari H, Berrebbah H, Induction of oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L) following infection by the pathogen of task halo (*Pyrenophora tritici-repentis*), *International Journal of Biosciences*, Vol 6, No 8, 2015, 77-88. Record Number, 20153195976 ; URL, <http://www.innspub.net/wp-content/upl>.
- * Scandalios JG, Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38, 2005, 995-1014
- * Schaller MD, Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase, *Biochim Biophys, Acta* 1540, 2001, 1-21.
- * Schehata SA, Lasheem NR, Kobbro TA, Ali GH, Toxic effect of certain metals mixtures on some physiological and morphological characteristics of freshwater algae, *Water, air and soil pollution*, 1999, 119-135.
- * Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM, Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by cDNA microarray analysis, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 97(21), 2000, 11655-11660. DOI: 10.1073/pnas.97.21.11655 ; PMID: 11027363.
- * Schrader M, Fahimi HD, Peroxisomes and oxidative stress, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1763, 2006, 1755-1766
- * Scoccianti V, Crinelli R, Tirillini B, Mancinelli V, Speranza A, Uptake and toxicity of Cr+3 in celery seedlings. *Chemosphere*. Vol 64, 2006, 1695-1703.
- * Scofield T, Evans J, Cook, MG and Wardlow IF, Factors influencing the rate and duration of grain filling in wheat. *Aust.J. Plant physiol*. Vol 4, 1988, 785 - 797.
- * Sels J, Mathys J, De Coninck B M, Cammue BP, De Bolle MF, Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides, *Journal of Plant Physiol Biochem*, Vol 46 (11), 2008, 941–950. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011 ; PMID: 18674922.

- * Servais S, Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3 [Thèse de doctorat]. Université Claude Bernard-Lyon 1, (2004) pp19-35.
- * Shah J, Automatic for the people: How representations of significant others implicitly affect goal pursuits, *Journal of Personality & Social Psychology*, 84, 2003, 661–681.
- * Shah J, Kachroo P, Klessig DF, The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression SA dependent, *Plant Cell* Vol 11(2), 1999, 191-206. PMID: 9927638.
- * Shah ND, Dunlay SM, Ting HH, Montori VM, Thomas RJ, Wagie AE, *The American journal of medicine*, 122 (10) 961, 2009, 7-961.
- * Sharma DC, Sharma CP, Tripathi RD, Phytotoxic lesions of chromium in maize, *Journal of Chemosphere*, Elsevier, Vol 51(1), April 2003, 63-68. DOI: [org/10.1016/S0045-6535\(01\)003253](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)003253) ; PMID: 12586157.
- * Sheldon A, Menzies NW, The effect of copper toxicity on growth and morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana*) in solution culture, *Plant and Soil*, 278(1-2), 2005, 341-349. DOI: [10.1007/s11104-005-8815-3](https://doi.org/10.1007/s11104-005-8815-3).
- * Shilpi M and Narendra T, “Cold, Salinity and Drought Stresses: An Overview,” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol 444(No2), 2005, 139-158.
- * Siemens J, Keller I, Sarx J, Kunz S, Schuller A, Nagel W, Schmülling T, Parniske M & Müller L, Transcriptome analysis of Arabidopsis clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19, 2006, 480-494.
- * Singh OP, Goswami G, Nanda N, Raghavendra K, Chandra D, & Subbarao SK, An allele-specific polymerase chain reaction assay for the differentiation of members of the *Anopheles culicifacies* complex, *Journal of biosciences*, Vol 29(3), 2004, 275-280.

- * Singh TN, Paleg LG, and Aspinall D, 1973. Stress metabolism 1. Nitrogen metabolism and growth in the barley plant during water stress, *Aust. J Biol Sci*, Vol 26, 1973, 45-46.
- * Song F, Goodman RM, OsBIMK1, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance responses, *Planta*, Vol 215 (6) 2002, 997–1005. DOI: 10.1007/s00425-002-0794-5 ; PMID: 12355160.
- * Souahi H, Meksem Amara L, and Djebar MR, Effects of Sulfonylurea Herbicides on Protein Content and Antioxidants Activity in Wheat in Semi-Arid Region, Vol 2(9), 2016.
- * Souguir D, Modification métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez *Vicia faba* [thèse]. Université Blaise Pascal, France, (2009) 238p.
- * Soylu E M, Soylu S, & Mansfield JW, Ultrastructural characterisation of pathogen development and host responses during compatible and incompatible interactions between *Arabidopsis thaliana* and *Peronospora parasitica*, *Physiological and molecular plant pathology*, Vol 65(2), 2004, 67-78.
- * Soylu S, Baysal Ö, & Soylu EM, Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings, *Plant Science*, Vol 165(5), 2003, 1069-1075.
- * Spaepen S, Vanderleyden J & Remans R, Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling, *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 2007, 425-448.
- * Stange AW, Hilmas DE, Furman FJ, Gatcliffe TR, Beryllium sensitization and chronic beryllium disease at a former nuclear weapons facility, *Appl Occup Environ Hyg*, Vol 16(3), 2001, 405-417. DOI: 10.1080/10473220118317 ; PMID: 11297055.
- * Stewart CR, and Lee JA, The role of proline accumulation in halophytes, *Planta*, 120, 1974, 273-289.

* Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP, Systemic acquired resistance, *Annu Rev Phytopathol*, Vol 35, 1997, 235–270. DOI: 10.1146/annurev.phyto.35.1.235 ; PMID: 15012523.

« T »

* Takahashi S, Murata N, How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science* 13, 2008, 178-182.

* Tal M, and Rosenthal I, Salt tolerance in *Simmondria chenensis* water balance and accumulation of chloride sodium and proline under low and high salinity. *Annals of Botany*, 34, 1979, 701-708.

* Telfer A, Dhimi S, Bishop SM, Phillips D, Barber J, Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem-II reaction centers, *Biochemistry* 33, 1994, 14469-14474

* Thomas Bur, Impact anthropique sur les éléments traces métalliques dans les sols agricoles de Midi-Pyrénées. Implications en termes de limites et de charges critiques, [thèse]. L'université de Toulouse, France, (2008) 399p.

* Thomas HF, and Bohnert HJ, Salt stress perception and plant growth regulators in Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*, *Plant Physiol*, 103, 1993, 1299-1304.

* Thomma B, Tierens KFM, Penninckx I, Mauch-Mani B, Broekaert WF, Cammue BPA Different micro-organisms differentially induce *Arabidopsis* disease response pathways, *Plant Physiol Biochem*, 39, 2001, 673–680.

* Tlidjen S, Meksem Amara L, Bouchelaghem S, Sbartai H, and Djebar MR, Effects of the herbicide Calliofop 36EC on growth, antioxidant enzyme response and respiratory metabolism in two aquatic plant *Elodea canadensis* and *Lemna minor*. *Advances in Environmental Biology*, 6 (9), 2012, 2524-2530.

* Ton J, & Mauch-Mani B, Beta-aminobutyric acid-induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA-dependent priming for callose, *Plant Journal*, 38, 2004, 119-130.

- * Torres MA, Jones JD, Dangl JL, Reactive oxygen species signaling in response to pathogens, *Plant Physiol*, Vol 141, 2006, 373-378.
- * Toumi M, Barris S & Aid F, Effets des stress hydrique et osmotique sur l'accumulation de proline et de malondialdéhyde (MDA) chez deux variétés de colza (*Brassicanaapus L*), *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie*, 2014, n° 36, 2014, 17-24.
- * Tran LSP, Abdellatef AA, Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maie plants to alkaline stress, *Front Plant Sci*, Vol 7 (243) , 2016.
- * Triantaphylides C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F, Mueller MJ, Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants, *Plant Physiol* 148, 2008, 960-968.
- * Troll, & Lindsley, Aphothometric methods for the determination proline, *J Biol Chem*, 215, 1955, 655-660.
- * Trouvelot S, Varnier AL, Allègre M, Mercier L, Baillieul F, Arnould C, et al, A β -1,3 glucan sulfate induces resistance in grapevine against *Plasmopara viticola* through priming of defense responses, including HR-like cell death, *Mol Plant Microbe Interact*, Vol 21(2), 2008, 232-243. DOI: 10.1094/MPMI-21-2-0232 ; PMID: 18184067.
- * Truman JW, Moats W, Altman J, Marin EC, Williams DW, Role of Notch signaling in establishing hemilineages of secondary neurons in *Drosophila melanogaster*. *Development*, 137(1), 2010, 53-61. DOI: 10.1242/dev.041749 ; PMID: 20023160.
- * Turner JG, Ellis C & Devoto A, The jasmonate signal pathway, *The Plant Cell*, 14, 2002, 153-164.
- * Turner, Neil C & GRANITI, ANTONIO, Fusicoccin: afungaltoxinthat opens stomata. *Nature*, 1969, Vol 223(5210), 1969, 1070-1071.

* Tuzun S, Somanchi A, The Possible Role of PR Proteins in Multigenic and Induced Systemic Resistance, In book: Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants, 2006, 112-142. DOI: 10.1007/0-387-23266-4_6.

« U »

* Umemura S, et *al.*, Therapeutic priority of the PI3K/AKT/mTOR pathway in small cell lung cancers as revealed by a comprehensive genomic analysis, J Thorac Oncol, Vol 9(9), 2004, 1324–1331.

« V »

* Vallad GE, Goodman RM, Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture, Crop Sci, Vol 44,2004, 1920–1934.

* Van Loon G, Hove GV, Schalock RL, Claes C, Personal Outcomes Scale: A Scale to Assess an Individual's Quality of Life, Stichting Arduin and Gent: University of Gent, Middelburg, 2008.

* Van Loon LC, Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins, European Journal of Plant Pathology, 103, 1997, 753-765.

* Van Loon LC, Pieterse CM, Ton J, Van Hulten M and Pelsler M, Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol 103 (14), 2006 b, 5602-5607.

* Van Loon LC, Rep M, and Pieterse CMJ, Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, Annu Rev Phytopathol, Vol 44, 2006, 135-162.

* Varnier AL, Sanchez L, Vatsa P, Boudesocque L, Garcia-Brugger A, Rabenoelina F, Sorokin A, Renault JH, Kauffmann S, Pugin A, et al, Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to Botrytis cinerea in grapevine, Plant Cell Environ Vol 32(2), 2009, 178–193. DOI: 10.1111/j.1365-3040.2008.01911.x ; PMID: 19021887.

* Vasyukova NI, Ozeretskoykaya OL, Induced plant resistance and salicylic acid: A review, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol 43(4), 2007, 367–373. DOI: 10.1134/S0003683807040011.

* Verhagen H, Vos E, Francl S, Heinonen M, van Loveren H, Status of nutrition and health claims in Europe, *Arch Biochem Biophys*, Vol 501(1), 2010, 6-15. DOI:10.1016/j.abb.2010.04.012 ; PMID: 20417175.

* Vulkan R, Yermiyahu U, Mingelgrin U, Rytwo G, Kinraide TB, Sorption of copper and zinc to the plasma membrane of wheat root, *Journal of Membrane Biology*, Vol 202(2), 2004, 97-104. DOI: 10.1007/s00232-004-0722-7 ; PMID: 15702373.

« W »

* Waldeck AR, Stocker R, Radical-initiated lipid peroxidation in low density lipoproteins: Insights obtained from kinetic modeling, *Chemical Research in Toxicology* 9, 1996, 954-964.

* Wang GJ, Volkow ND, et al, Enhanced resting activity of the oral somatosensory cortex in obese subjects, *Neuroreport*, Vol 13 (9), 2002, 1151–1155. PMID: 12151759.

* Wasilewskaa A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N & Jeffrey Leung, An update on abscissic acid signalling in plants and more, *Molecular Plant*, 1, 2008, 198-217.

* Weber JR, Angstwurm K, Rosenkranz T, Lindauer U, Bürger W, Einhäupl KM, et al, Histamine (H1) receptor antagonist inhibits leukocyte rolling in pial vessels in the early phase of bacterial meningitis in rats, *Neurosci Lett*, Vol 226 (1), 1997, 17-20. PMID: 9153631.

* Wei Wei, Yuxiu Zhang, Lu Han, Ziqiu Guan, Tuanyao Chai, A novel WRKY transcriptional factor from *Thlaspi caerulescens* negatively regulates the osmotic stress tolerance of transgenic tobacco, *Plant Cell Reports*, Vol 27(4), 2008, 795–803. DOI:10.1007/s00299-007-0499-0.

* Wendehenne D, Lamotte O, Frachisse JM, Barbier-Brygoo H, Pugin A, Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco, *Plant Cell*, Vol 14(8), 2002, 1937–1951. PMID: 12172032.

* Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, and Johnson GL, Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human, *Physiol Rev*, 79(1), 1999, 143-80. PMID: 9922370.

* Wijaya R, Neumann GM, Condrón R, Hughes AB, Polya GM, Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin, *Plant Sci*, Vol 159(2), 2000, 243-255. PMID: 11074277.

* Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inze D, and Van Camp W, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C-3 plants, *EMBO J*, Vol 16(16), 1997, 4806-4816. DOI: 10.1093/emboj/16.16.4806 ; PMID: 9305623.

* Woodward AW & Bartel B, Auxin: regulation, action, and regulation, *Annals of Botany*, 95, 2005, 707-735.

« X »

* Xiao WY, Sheen J, Jang JC, The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development, *Plant MolecularBiology*, 44, 2000, 451-461

* Xiong L, Zhu JK, Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives, *Physiol Plant*, 112(2), 2001, 152–166. PMID: 11454221.

* Xuan Y, Scheuermann EB, Meda AR, Hayen H, Von Wirén N, Weber G, Separation and identification of phytosiderophores and their metal complexes in plants by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *J Chromatogr, A* 1136(1), 2006, 73–81. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.09.060 ; PMID: 17045280.

« Y »

- * Yang SF, and Hoffman NE, Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, Vol 35, 1984, 155–189.
- * Yruela I, Copper in plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* Vol 17, 2005, 145–156.
- * Yruela I, Pueyo JJ, Alonso PJ, Picorel R, Photoinhibition of photosystem II from higher plants: effect of copper inhibition, *Journal of Biological Chemistry*, Vol 27, 1996, 27408-27415.
- * Yves H, et Buyer J, L'origine des blés. Pour les sciences hors-série n° 26, 2000, 60 - 62 pp.

« Z »

- * Zahir S, Farih A, Badoc A, Douira A, importance des septorioses dans les champs de blés marocains , *Bull Soc Pharm, Bordeaux*, 147, 2007, 29-38.
- * Zeghida A, Amrani R, Djennadi F, Ameroun R, Khldoun AA, and Belloucif M, Etude de la variabilité de réponse des plantules de blé dur (*Triticum durum* Desf) à la salinité, *Céréaliculture, ITGC*, 42, Constantine, 2004, 5p.
- * Zeidler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J, Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defence genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101, 2004, 15811–15816.
- * Zeng, Yonghong, LIANG, Ying-Chang, HOANG, Anh Tuan, et al, A review on spectrum sensing for cognitive radio: challenges and solutions. *EURASIP Journal on Advances in Signal Processing*, vol 20(10), no 1, 2010, 381-465.

- * Zhang H, Sreenivasulu N, Weschke W, Stein N, Rudd S, Radchuk V, Potokina E, Scholz U, Schweizer P, Zierold U, et al, Large-scale analysis of the barley transcriptome based on expressed sequence tags, *Plant Cell*, Vol 14, 2002, 559-574.
- * Zhang J, Kirkham MB, Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings, *New Phytol*, Vol 132, 1992, 361-73.
- * Zhang M, et al, Creation of a hyperpermeable yeast strain to genotoxic agents through combined inactivation of PDR and CWP genes, *Toxicol Sci*, 113(2), 2010, 401-11.
- * Zhang SP, Weng J, Pan JX, Tu TC, Yao S, Xu CH, Study on the photo-generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques, *Photosynthesis Research* 75, 2003, 41-48
- * Zhao J, Davis LC, Verpoorte R, Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, Vol 23 (4), June 2005, 283–333. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003 ; PMID: 15848039.
- * Zimmerli L, Jakab G, Métraux JP, and Mauch-Mani B, Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid, *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol 97(23), 2000, 12920–12925. DOI: 10.1073/pnas.230416897 ; PMID: 11058166.
- * Zipfel C, Pattern-recognition receptors in plant innate immunity, *Curr Opin Immunol*, Vol 20(1), 2008, 10-16. DOI: 10.1016/j.coi.2007.11.003 ; PMID: 18206360.



Mise en valeur scientifique

1. Communications internationales

* YAICHE Fatma, SBARTAI Hana, SBARTAI Ibtissem, et OUALI Kheir-eddine. Réponses biochimiques d'une variété de blé dur (*Triticum durum*. Desf) suite à une contamination par l'agent pathogène de la tache auréolée. 26ième Forum International de l'ATSB (Monastir- Tunisie) du 23 au 26 Mars 2015.

* YAICHE Fatma, SBARTAI Hana, SBARTAI Ibtissem, et OUALI Kheir-eddine. Effets observés sur les biomarqueurs de stress d'une variété de blé dur (*Triticum durum* Desf) suite à une infection par l'agent pathogène de la tache auréolée. 27ième Forum International de l'ATSB (Hamamet- Tunisie) du 28 au 31 Mars 2016.

* YAICHE Fatma, SBARTAI Hana, SBARTAI Ibtissem, et OUALI Khair-Eddine. Evaluation de la contamination par l'agent pathogène de la tache auréolée chez une variété de blé dur (*Triticum durum*. Desf). IVème Congrès International de BVBR. (Hammamet. Tunisie) 24-27 Mars 2016.

* YAICHE Fatma, SBARTAI Hana, SBARTAI Ibtissem, FERFAR Meriem, et OUALI Khair-Eddine. Modifications physiologiques, biochimiques, et enzymatiques induites par le cuivre chez *Triticum durum* Desf. 6èmes Journées Scientifiques de l'ATT. (Tabarka. Tunisie). Du 20 au 23 Janvier 2017.

* YAICHE Fatma, SBARTAI Hana, SBARTAI Ibtissem, et OUALI Khair-Eddine, Peroxydation lipidique observée chez le blé dur suite à une infestation par l'agent pathogène de la tache auréolée. 8es Journées Scientifiques Internationales sur la Valorisation des Bioressources 5-7 mai 2017 à l'Hôtel SENTIDO Rosa Beach - Monastir, TUNISIE

2. L'article

Research Article



Cellular Responses Observed Following Contamination by the Pathogen of Task Halo "Pyrenophoratrirtici-repentis" or Heavy Metal "Copper" in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf)

Yaiche Fatma¹, Sbartai Hana², Sbartai Ibtissem², Meksem Leila² et Ouali Khair-Eddine³.

¹ Laboratory Ecobiology of marine and coastal environments, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

² Cellular Toxicology Laboratory, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

³ Laboratory of Environmental Biomonitoring, University of Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.

*Corresponding author's E-mail: yaiche.23@hotmail.com

Received: 19-03-2017; Revised: 24-03-2017; Accepted: 30-03-2017.

ABSTRACT

The plant, like any living organism, is influenced throughout its life by the climatic and non-climatic conditions of the environment. These conditions will ensure either an environment favorable to growth and development or subject to abiotic or biotic stresses that will disrupt its metabolism. The essential objective of our study is to understand the adaptive strategies of the plant with respect to biotic and abiotic stress caused by the pathogen of a cryptogamic disease "the halo spot" or a heavy metal: The copper. In this context, a sampling of the infested plants (*Triticum durum*, Desf., VarSimeto) was carried out to assess its toxicity according to the severity of the contamination, which is determined according to the number of tasks on the leaves (Uncontaminated, low, medium, and severe contamination) for biotic stress and as a function of increasing concentrations of Copper sulphate (0, 200, 400, 800 µM) for metal stress. Copper is a heavy metal necessary for the development of plants, since it is one of the nutrients essential to the functioning of certain vital cycles. Beyond a certain threshold, it becomes toxic and causes biochemical changes. The results obtained show a toxic effect, which is manifested by a strong increase in the level of proteins and of malondialdehyde (MDA) and a decrease in the lipid and glutathione (GSH) levels. On the other hand, a very significant induction of the enzymatic activities Ascorbate-peroxydase (APX) and glutathion S-transferase (GST) intervening in the system of defense of the plant. All these results show the presence of an oxidative stress generated by both types of stress.

Keywords: *Triticum durum* Desf, *Pyrenophoratrirtici-repentis*, Copper sulphate, abiotic and biotic stress, Oxidative Burst, biomarkers.

INTRODUCTION

Plants are constantly confronted with different types of stress affecting their growth and consequently their development. The more quickly a plant is able to put in place rapid and appropriate defense mechanisms, the less stress will be on plant health (Rémus-Borel, 2007). Most diseases cultivated plants are caused by microscopic fungi, which destroy much of the world's crops each year (Nasraoui, 2006). The current diseases situation in Algeria in the durum wheat fields was characterized by predominance of brown rust (*Puccinia recondita*) and the halo spot (*Pyrenophoratrirtici-repentis*) (Benbelkacem and Bendif, 2010). Recognition of these diseases as well as their means of control remain important tools to better control these constraints and improve productivity thereafter (Aouali and Douici-Khalfi, 2009). Like animals, plants are able to recognize non-self and modified self, as well as to induce defense mechanisms in response to pathogen attacks (Nürnberg and Kemmerling, 2009). There are two types of plant defense; Constitutive and inducible. The former may be of biochemical or morphological origin (Gravot, 2009), it is present at all times in the development of the plant. It is constituted by a set of physical structures or chemical barriers that counter the penetration and development of bio-aggressors (Klarzynsk and Fritig, 2001). Le deuxième type de défense regroupe un ensemble de défenses

induites; La perception de l'agent pathogène va conduire à l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire (Bollerand Felix, 2009). Cellular signaling events early induced following recognition of the microorganism are more generally studied via elicitors (Zhao et al., 2005, Hofius et al., 2007). Among these events figures the production of phytohormones such as salicylic acid and, above all, changes in the permeability of the plasma membrane manifested by influxes of Ca^{2+} , efflux of K^+ and anions (Garcia-Brugger et al., 2006). These ion streams can act upstream of other cellular events, in particular production of oxygen-reactive species (ROS), such as the superoxide anion O_2^- and H_2O_2 , as well as a phosphorylation cascade involving protein kinases (Sbartai et al., 2015). All of these reactions will lead to reprogramming of the expression of genes, more particularly of the defense genes, in order to set up adapted defense responses (Dubreuil, 2010). In addition to aggressions caused by living organisms, plants are exposed to environmental changes induced in most cases by human activities. Trace elements of metal are considered among the elements most dangerous for living organisms and especially for plants that are directly exposed to these elements whose toxic potential is undeniable. Exposure to heavy metal toxicity has become a major limiting factor in the growth and yield of crops, affecting the sustainability of agricultural production and



threatening food security. La toxicité des métaux lourds retarde la croissance des plantes en marginalisant les fonctions cellulaires des protéines, des lipides et des composants élémentaires des membranes des chloroplastes (Sharma *et al.*, 2003 ; Scocinatti *et al.*, 2006 ; Sbartai *et al.*, 2012). Among these metals, copper is considered to be a trace element necessary for metabolic functions and plant development (Burkhead *et al.*, 2009). It exists in multiple forms redox thanks to its ability to exchange electrons from its orbit. This metal is a cofactor in the electron transport chain in mitochondria and chloroplast (Palmer and Guerinot, 2009). It is also defined as a Potentially Toxic Trace Element, as any element essential to plant development, it can induce symptoms of toxicity (reduction of biomass, inhibition of root growth, chlorosis, loss of chloroplast integrity, Etc.), at exposures higher than its cellular homeostasis. Its toxicity comes first from its contribution to the production of ROS such as superoxides (O_2^-), hydroxyl radicals (HO^\bullet) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Marschner, 2011, Azzizi *et al.*, 2016).

It is in this context that our study was carried out in order to better understand the defense mechanisms in a variety of durum wheat with respect to an oxidative burst generated by different stresses (biotic or abiotic) through the determination of certain Biomarkers involved in the plant defense system.

MATERIAL AND METHODS

A part of the experiment was carried in the collective agricultural operation in HallalaAissa, Echatt (city of EL-Tarf) located in the north-east of Algeria known for its humid climate associated with a strong rainfall favoring the development of cryptogamic diseases. The pathogen responsible for the disease is: *Pyrenophora tritircirepentis*. It manifests as oval necrotic spots on the leaves (Boulal H *et al.*, 2007). And the second part at the Pedagogical Laboratory of Plant Physiology of the Department of Biology, BadjiMokhtar University Annaba. The experimental material used in our work is hard wheat Variety; Simeto. It is a variety of Italian origin, with thin straw, and medium grains half elongated. It has an average percentage of germination and a high yield.

Experimental Protocol

Concerning the biotic stress (cryptogamic disease) in the field, we randomly selected control plants (zero-spot equivalents), poorly affected plants ($\approx 15\%$ spots), moderately affected plants ($\approx 30\%$ spots) and ($> 50\%$ of the infested leaf). For abiotic stress (metal stress: Cu) *in vitro*, the selected durum wheat seeds are disinfected with 3% bleach for 30 minutes and then rinsed thoroughly with distilled water. To facilitate and accelerate the germination process, the seeds are vernalized for 24 hours, then germinated in petri dishes covered with filter paper soaked in distilled water. At the 2-3 leaf stage, plants are subjected to different concentrations of copper sulphate (0, 200, 400, and 800 μmol) for one week.

Irrigation is provided on average three (03) times a week for all treatments.

Analytical techniques

Protein Determination

The proteins are assayed by colorimetry according to the method of Bradford, (1976) which consists in measuring the concentration of proteins in solution by spectroscopic analysis of 0.1 g of ground plant leaf with 10 ml of distilled water. After filtration, 0.2 ml of the supernatant is taken and 2 ml of BBC (Bradford reagent) are added. The principle of the method is based on the fixation of the Coomassie Blue on the proteins at the level of basic residues and aromatics, the presence of proteins is revealed by a blue coloring. The Absorbance is read at the spectrophotometer at a wavelength of 595 nm.

Dosage of lipids

Total lipids are assayed according to the methods (Goldsworthy *et al.*, 1972). Each sample consisting of 0.5 g of fresh leaf material is macerated in 10 ml TCA (20%). 1 ml of the extract is removed and centrifuged at 5000 t / 10 min. The supernatant is poured and the pellet containing the lipids is kept. To the latter, 1 ml of the Ether / Chloroform mixture (1/ 1) is added, followed by a second centrifugation of 5000 t / 10 min, which gives two phases: a pellet and a supernatant. 100 μl of the supernatant to which 1 ml of sulfuric acid is added are placed in tubes in a water bath at 100 ° C for 10 minutes. After cooling, 200 μl of the extract is taken, to which is added 2.5 ml of the 85% sulfo- phospho- vanillin mixture. The spectrophotometric reading is carried out at a wavelength of 530 nm.

Glutathione (GSH)

The enzyme extract is homogenized in a Tris / EDTA solution and undergoes deproteinization with 0.25% sulfo- salicylic acid. After centrifugation at 2000 g for 10 minutes, the supernatant is used for the spectrophotometric assay with the DTNB reagent at 0.01 M to 412 nm. The concentrations of GSH are measured by the method of (Weckbecker and Cory, 1988) and expressed in μM / mg of proteins.

Dosage of malondialdehyde (MDA)

Lipid peroxidation is estimated by the evolution of the MDA content according to the method of Draper and Hadley (1990). The homogenization of the plant tissue in trichloroacetic acid (TCA 5%) at a rate of 10 ml per 1 g of plant tissue is followed by centrifugation for 15 min at 12,000 g, the supernatant is added to an equal volume of thiobarbituric acid (TBA) at 0.5% in TCA at 20%, and then the mixture is incubated for 30 min at 100 ° C. The absorbance of the supernatant obtained after centrifugation at 10000 g for 5 min is read at 532 nm. The concentration of MDA is calculated using its molar extinction coefficient = 155 mM⁻¹ cm⁻¹.



Assays Ascorbate- Peroxidase Activity (APX)

The spectrophotometric determination of the ascorbate- peroxidase activity is carried out according to the protocol adopted by Nakano and Azada (1987). The final reaction volume of 3 ml contains 100 μ l of enzyme extract, 50 μ l of 0.3% H₂O₂ and 2850 μ l of NaK-Ascorbate phosphate buffer (50 mM NaK, and 0.5 mM Ascorbate, pH = 7.2). The calibration of the apparatus is carried out in the absence of the enzymatic extract. The reading is carried out at 290 nm (spectrophotometer GeneSys 8) for 1 min and this for a molar linear extinction coefficient $\epsilon = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The APX activity is expressed in nmol / min / mg protein.

Determination of Glutathione S-Transferase Activity (GST)

The determination of glutathione S-transferase is carried out by the method of (Habig *et al.*, 1974). The samples are homogenized in a phosphate buffer at pH 6.5 and 100 mM and centrifuged at 9000 g for 30 min. The method consists in reacting the GSTs on a mixture of CDNB (20 mM) -GSH (100 mM), the variation in the optical density due to the appearance of the CDNB-GSH complex is measured every 15 seconds for 1 minute at 340 nm. Concentrations of GST are expressed in nmol / min / mg protein.

Statistic study

The results obtained are expressed by the mean more or minus standard deviation ($m \pm sd$). The averages in the same series were compared with each other using the ANOVA statistical test according to the degree of infestation of wheat leaves and / or as a function of increasing concentrations of Copper sulphate with a threshold of significance (P).

RESULTS

Effects of the halo spot and copper sulphate on protein levels

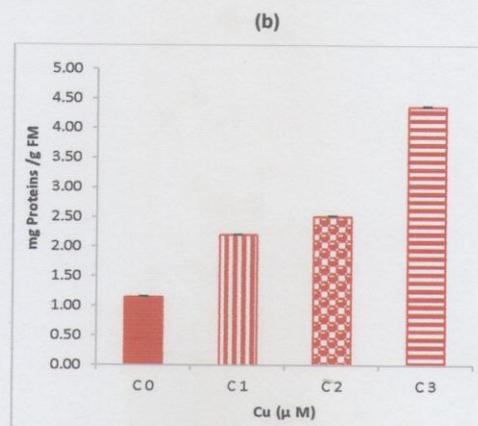
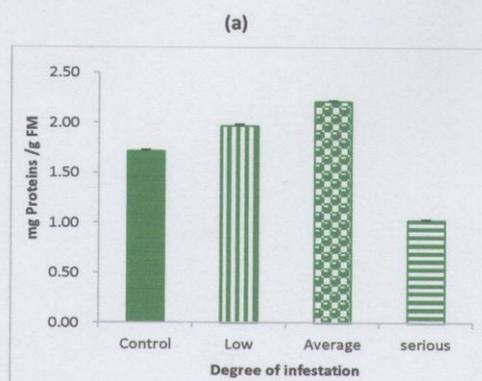


Figure 1: Effects of the halo spot (a) and copper (b) on protein levels

Figure 1 shows the variation in the level of proteins as a function of wheat leaf infestation by the pathogen of the halo spot (a) or by copper (b), showing a very highly significant increase in (1.96mg / g MF, 2.20mg / g MF), shows a very highly significant increase in the amount of proteins in weakly and moderately infested leaves (respectively 1.96mg / g MF, 2.20mg / g MF), whereas this rate decreases for severely infested leaves compared to the control leaves to reach 1.023mg / g MF equivalent to 40% (Figure 1.a). Similarly, a significant increase ($p < 0.001$) in the amount of total protein is observed as a function of the increasing concentrations of copper compared to the control leaves (Figure 1.b). The highest value (4.35 mg / g MF) is observed for the highest concentration (800 μ mol) equivalent to five times (≈ 5) the control value (1.14 mg / g MF).

Several studies report an increase or decrease in total proteins regardless of the type of stress (Abdellatif and Tran, 2016). Seventeen (17) families of PR proteins (Pathogenesis-Related) have been identified in a number of plant species (Sels *et al.*, 2008) as a result of various stresses (Tuzun and Somanchi, 2006). In our study, the proportional increase in protein levels observed as a function of increasing concentrations of the pathogen and metal in wheat leaves confirms this hypothesis and highlights their major roles in the plant defense system both to the two stress (biotic and abiotic). This increase is due, on the one hand, to the activation of the genes as for the synthesis of the proteins of the PR type and the G proteins which are associated with membrane receptors as well as the proteins of the secondary metabolism (Ponchet *et al.*, 2000) And on the other hand to the induction of the response of hypersensitivity RH which is often observed locally (Pedley and Martin, 2005). This activation is related to the triggering of phosphorylation as well as protein kinases (MAPKs) involved in signal transduction and induction of plant defense reactions (Zhao and Davis 2005). On the other hand, a decrease in



the total protein content is observed in severely infested wheat leaves. This decrease is attributed to the oxidative burst generated as a result of the interaction between the parasite and the host plant where a strong ROS accumulation is observed. Their action leads to direct lesions of biological molecules by oxidation such as the oxidation of proteins which has been reported by several authors (Parent *et al.*, 2008, Van Loon *et al.*, 2008, Sbartai *et al.*, 2015). In addition, necrotic lesions located at the fungus penetration sites observed in severely infested wheat leaves demonstrate that the hypersensitivity (HR) response is stimulated thereby limiting pathogen development by reducing access to nutrients (Dubreuil, 2010) and consequently the activation of programmed cell death (PCD) hence the reduction in the level of proteins.

Effects of halo stain and copper sulphate on lipid levels

The systemic lipid signal is among the first events involved in the defensive response and in the signal transmission mechanisms. Signaling by phospholipids is an important component in the signalitic pathways in Eukaryote. It plays a major role in plant growth and development as well as in systemic response to environmental stresses, including attack by pathogens (Song and Goodman 2002, Profotová *et al.*, 2006, Akram, 2008).

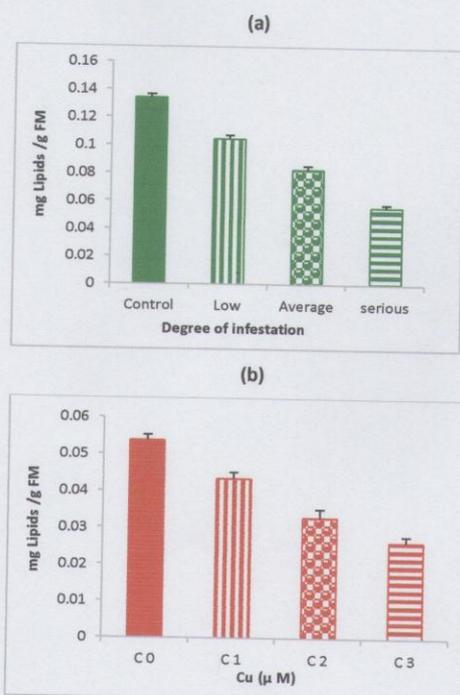


Figure 2: Effects of the halo spot (a) and copper (b) on lipid levels

In our study, lipid assay revealed a very highly significant reduction in its content in wheat leaves contaminated with *Pyrenophora tritici-repentis* (Figure 2.a). The higher the degree of infestation by the fungus, we observe a decrease in this rate which reaches the lowest value (0.055 mg / g MF) in the highest degree of infestation (severely affected). This reduction is equivalent to 58% compared to the control. Similarly, a significant ($p \leq 0.001$) decrease in lipid content was observed in a dose-dependent manner in wheat leaves compared to control leaves (Figure 2.b). This decrease reaches its maximum (0.026 mg / g MF) at the highest concentration equals 50% of the control leaves value (0.053 mg / g MF).

Our results contradict the literature, which assumes that the mobile signal for SAR may be a lipid molecule (Durrant and Dong 2004; Mosher *et al.*, 2006) whereas we find ourselves in a situation where this rate decreases gradually proving that this resistance (SAR) is already triggered (observed accumulation of proteins) by using different mechanisms of defenses with respect to both stresses either by the production of ROS thus inducing an oxidative stress which leads to a lipid peroxidation following an oxidative attack by singlet oxygen or the hydroxyl radical either by the involvement of other signaling pathways such as jasmonic acid (JA) and methyl-jasmonate acid (MEJA) which are signal molecules derived from fatty acids and their biosynthesis involves enzymes such as lipase, lipoxygenase (LOX), etc..

Effects of the halo spot and copper sulphate on the GSH level

As for the assay of stress biomarkers, glutathione (GSH) is considered among the most important since it intervenes in the antioxidant defense system of the plant. The results obtained concerning the effect of contamination by the pathogen on the level of glutathione (Figure 3.a) show its decrease ($P \leq 0.000$) depending on the different degrees of infestation compared to the control. All GSH values were lower than that of the control (0.0679 mmol / min / mg Prot) and the lowest value (0.0276 mmol / min / mg Prot) was observed in severely infested wheat leaves. The same variations are observed in the leaves treated with the increasing concentrations of copper (Figure 3.b) i.e. a very significant decrease in the glutathione level. This decrease reached its maximum (0.0334 mmol / min / mg Prot) at the highest concentration of the treatment compared to the control leaves (0.0743 mmol / min / mg Prot) and which is equivalent to 50% reduction.

Based on the fact that any stress generates an oxidative stress causing a breakdown of the redox equilibrium which is at the origin of an oxidative damage which can be regulated by glutathione which participates in the reduction of the compounds resulting from the lipid peroxidation (LOOH) Or hydrogen peroxide (H_2O_2) (Parent *et al.*, 2008).



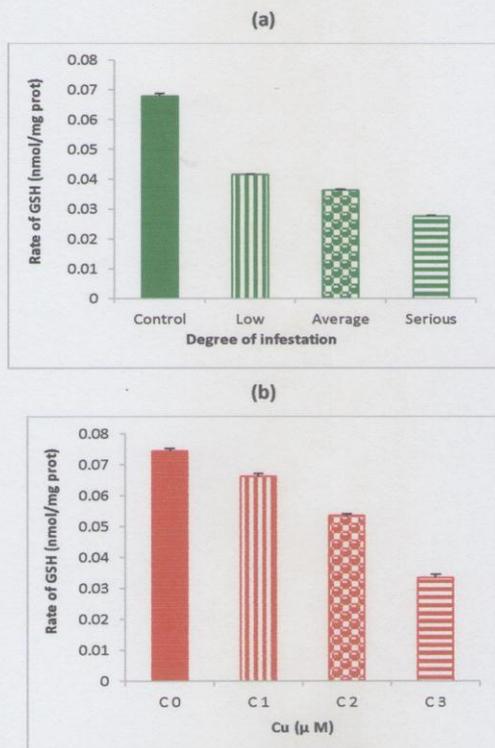


Figure 3: Effects of the halo spot (a) and copper (b) on GSH level

Our results contradict this hypothesis where we observe a decrease in the level of glutathione in all the wheat plants contaminated by the fungus or by copper proving that this biomarker stress is not solicited in these two cases. Since all the measured values are lower than the control values.

On the other hand, Gara *et al.* (2003) reports that the inhibition of glutathione synthesis is due to the production of H₂O₂ and NO following a pathogen attack that disrupts the glutathione / ascorbate cycle. Thus, the oxidized form of glutathione predominates and leads to a modification of the redox state of the cell that participates in the establishment of the RH. These two hypotheses allow us to conclude that the inhibition is not due to the nature of the stress but to the degrees of contamination since the high concentration totally inhibits the glutathione in the leaves of wheat proving that the system in question is surpassed and replaced by a more efficient (enzymatic) antioxidant defense system in response to the oxidative burst generated by these two types of stress. Therefore, glutathione intervenes indirectly in the regulation of the redox equilibrium either by the synthesis of phytochelatin in the case of metallic stress or by conjugation to the elicitor or Copper by GST in their detoxification.

Effects of halo spot and copper sulphate on MDA level

Lipid peroxidation is an oxidation of lipids due in most cases to the presence of oxygen-reactive species (ROS). Monitoring the variation of malondialdehyde (MDA) as a function of the degree of infestation by the pathogen shows that this level increases very significantly according to the degree of infestation of the wheat leaves relative to the control (Figure. 4a).

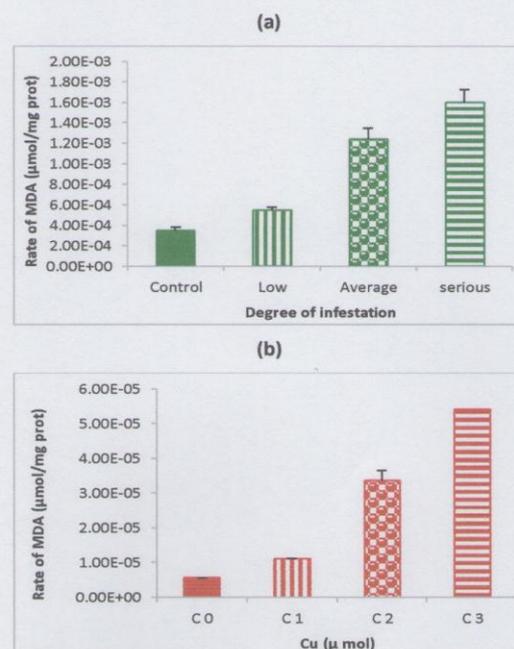


Figure 4: Effects of the halo spot (a) and copper (b) on MDA level

The highest level of MDA was observed in severely infested wheat leaves (0,016 µmol / mg Prot), which is equivalent at five times (≈5) the control value (3.5.10⁻⁴ µmol / mg Prot). Similarly, MDA levels increased significantly (P≤0,000) in dose-dependent ways in wheat leaves subjected to increasing copper concentrations compared to control (Figure 4.b). This variation in the MDA level increased from 5.6.10⁻⁶ µmol / mg Prot in the control leaves to two (≈2) times its value (1.1.10⁻⁵ µmol / mg Prot) in the leaves treated with 200µM copper and six (≈6) (3.36.10⁻⁵ µmol / mg Prot) in leaves treated with 400 µM of copper and finally with nine (≈9) times its value (5.4.10⁻⁵ µmol / mg Prot) in the leaves treated with 800 µM Copper.

The high levels of MDA observed in our study are due to lipid oxidation triggered by oxidative stress in response to fungus infestation and / or increased copper levels in wheat leaves. Indeed, in the case of an oxidative burst during the interaction between the parasite and its host plant, the stress is relatively large and its impact extends



on the cellular scale causing damage both in the parasite and in the plant cell. The excess of ROS causes direct lesions (DNA oxidation, proteins, lipids, carbohydrates) but also secondary damage due to the cytotoxic nature of the metabolites released especially during the oxidation of the lipids (Farmer and Davoine, 2007; Mueller *et al.*, 2008). Our results confirm this hypothesis, which reveal very high levels of MDA equal to five times the value of the control thus proving the magnitude of the stress induced. Similarly, the increase in MDA is attributed to the excess ROS released following the addition of high concentrations of copper in the culture medium. Lin *et al.*, (2005) reports that excess copper in cells increases the H₂O₂ concentration, which can induce oxidative stress, thus disrupting the homeostasis of other elements (Cuypers 2000). These results are in line with our study which determines the maximum value of MDA at nine times the value of the control proving once again the importance of the stress applied.

Effects of halo spot and copper sulphate on APX enzymatic activity

At the same time, the measurement of the APX enzyme activity, responsible for the removal of the oxygenated water (H₂O₂) formed as a result of the applied stress, shows a very significant induction (P<0.000) of APX activity in wheat leaves Hardened by *Pyrenophoratrirtici-repentis* compared to the control (Figure 5a).

This activity increases with 2.8.10⁻⁵nmole / min / mg Prot (Low infestation), 4.2.10⁻⁵nmole/min/mgProt(Average infestation), to 7.4.10⁻⁵nmole / min / mgProt (severe infestation).For the treatment of wheat plants with copper (Figure 5.b), an increase in the APX activity of the treated leaves was observed as a function of the increasing copper concentrations compared to the control leaves. A peak (5.6.10⁻⁴nmole / min / mg Prot) was observed in wheat leaves treated with the highest concentration of copper (800 µM).

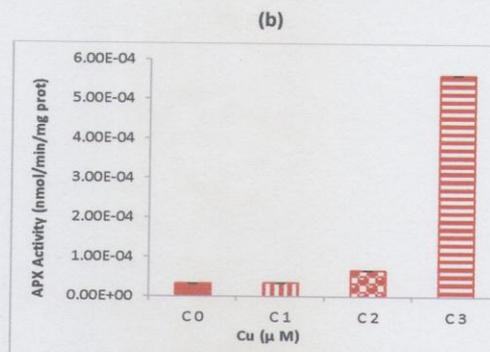
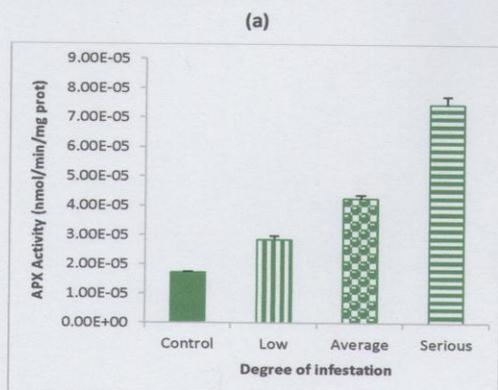


Figure 5: Effects of the halo spot (a) and copper (b) on APX enzymatic activity

Indeed, there are many enzymes capable of producing H₂O₂ in the case of biotic stresses such as pH-dependent cell wall peroxidases (Bolwell, 1996; Bestwick *et al.*, 1997) which function only in the presence of cysteine and Glutathione. Under normal conditions, peroxidases are used to dissipate H₂O₂, whereas during an alkalinization of the apoplast characteristic of the infestation of a pathogen, they can become a producer of OH hydroxyl radicals (Salzer *et al.*, 1996). These ROS are involved in the defense mechanisms of plants, either directly by their high toxicity on pathogens or by activation of numerous metabolic pathways (sbartai *et al.*, 2015) wich explain the induction of APX activity observed in our work in wheat leaves infested with *Pyrenophoratrirtici-repentis*. Similarly, treatment with copper stimulates this activity in wheat leaves with a peak observed for the highest concentration still proving its drastic effect in the cell. Induction of APX activity in response to oxidative stress caused by the presence of the fungus or Cu demonstrates its role in the removal of oxygenated water.

Effects of halo stain and copper sulphate on enzymatic activity Glutathione S-Transferase (GST)

GSTs are known to play an important role in the detoxification of certain molecules by conjugating them to glutathione. The complex, less toxic than the free molecule, can be sequestered in the vacuole or exported to the external environment. Some studies attribute to some particular GSTs a role in the regulation of several enzymes and transcription factors by non-catalytic protein-protein interactions. However, this function does not seem to be linked to any mechanism of detoxification (Calmes, 2011).

According to Fig. 6.a, which represents the effect of the halo spot on the variation of the GST enzymatic activity, a very significant induction of this activity is noted as a function of the degrees of infestation with respect to the control.

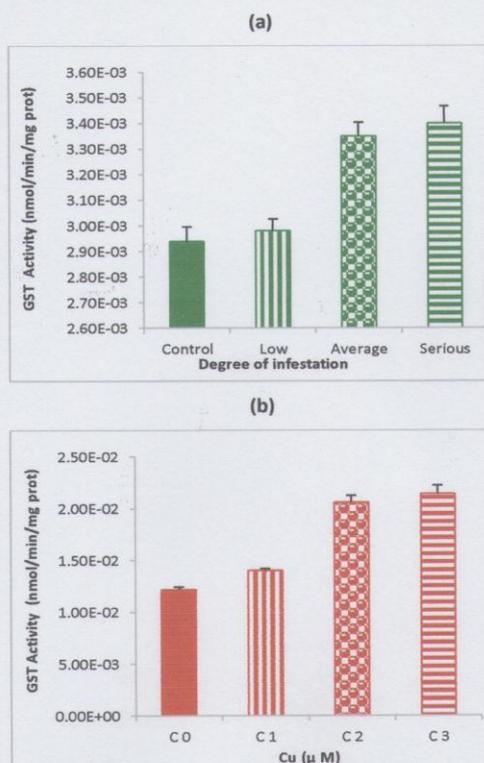


Figure 6: Effects of the halo spot (a) and copper (b) on GST enzymatic activity

This increase is greater in the medium and severely infested leaves which successively reach the values of $3.35 \cdot 10^{-3}$ and $3.4 \cdot 10^{-3}$ nmole / min / mgProt. Similarly, a very significant increase ($p < 0.001$) in the GST activity of the copper treated leaves was observed compared to that of the control leaves (Fig. 6.b). The highest value (0.0214 nmole / min / mgProt) is observed in wheat leaves treated with $800 \mu\text{M}$ Copper. The biochemical analysis of the GST activity shows a stimulation at different treatments and different concentrations indicating a phenomenon of resistance of the cells of Wheat leaves. Indeed, GSH inhibition observed in our study confirms once more that the defense mechanism in question is outdated and replaced by an antioxidant enzyme defense system that performs better GST in response to the oxidative burst generated by the fungus or metal.

CONCLUSION

The great variety of types of stress involves the mobilization of multiple mechanisms of ROS production that are involved in plant defense strategies either directly by action of their high toxicity to the pathogen or metal or by activation many metabolic pathways. They are also signal molecules that rapidly diffuse through the membranes and regulate many defenses genes:

chaperone proteins, antioxidant enzymes, ascorbate peroxidase (APX), glutathione-S-transferase (GST), genes linked to pathogenesis (PR) via salicylic acid (SA) or the synthesis of phytoalexins. In the majority of cases, the damage caused by this excess of ROS, if not quickly limited, leads to the death and then the lysis of the cells concerned.

The work carried out shows an important activation of protein biosynthesis, lipid peroxidation represented by the level of MDA and certain enzymatic activities (APX and GST) involved in the antioxidant defense system of durum wheat as well as a drastic decrease in the level of Lipids associated with inhibition of GSH.

All of our results allow us to conclude that during the interaction of *Pyrenophora tritici-repentis* copper with leaves of wheat, an oxidative burst is induced that does not depend on the type of stress but on the concentration of the contaminants. It seems that wheat is sensitive to the presence of the fungus and tolerates a little more the presence of copper in the culture medium. This sensitivity was evaluated by the quantification of certain biomarkers, thus proving a greater cellular response in the case of biotic stress compared to abiotic stress.

REFERENCES

1. Abdellatef AA, and Tran LSP, Impacts of priming with silicon on the growth and tolerance of maize plants to alkaline stress, *Front, Plant, Sci*, 7, 2016, 243.
2. Rémus B W. Study of the role of silica in wheat in the induction of defense molecules during a white infection [Thesis]. Québec, Laval University, (2007) 125p.
3. Nasraoui B, Parasite fungi of cultivated plants, University Publishing Center, Tunis, 2006, 456p.
4. Benbelkacem A, Bendif N, Results of the investigation of diseases and insects of cereals in the Eastern region of Algeria, *Bilan PNAB 2009/2010. Cereal culture N°45*, 2010, 12-19.
5. Aouali S, Douici-Khalifi A, Compendium of the main fungal diseases of cereals in Algeria: symptoms, development and means of control, *ITGC, EL Harrach, Algiers*, 2009, 56p.
6. Nürnberger T, Kemmerling B, PAMP Triggered basal immunity in plants, *Advances in Botanical Research*, 51, 2009, 1-38.
7. Gravot A, The stress response in plants, *UMR 118-APBV INRA-Agrocampus Ouest-University of Rennes 1*, 2009, 34p.
8. Klarzynski O, Fritig B, Stimulation of the natural defenses of plants, *C. R. Acad. Sci, Paris, Ser. III*. 324, 2001, 953-963.
9. Boller T, Felix G, A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors, *Annual Review of Plant Biology*, Vol 60, 2009, 379-406. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346; PMID: 19400727.
10. Zhao J, Davis LC, Verpoorte R, Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites,



- Biotechnology Advances, Vol 23, Issue 4, June 2005, 283–333. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.01.003; PMID: 15848039.
11. Hofius D, Tsitsigiannis DI, Jones JD, Mundy J, Inducible cell death in plant immunity, *Seminars in Cancer Biology*, Vol 17, Issue 2, 2007, 166-187. DOI: 10.1016/j.semcancer.2006.12.001; PMID: 17218111.
 12. Garcia B A, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A, Early signaling events induced by elicitors of plant defenses, *Mol Plant-Microbe Interact*, Vol 19(7), Jul 2006, 711-724. DOI: 10.1094/MPMI-19-0711, PMID: 16838784.
 13. Sbartai I, Sbartai H, Yaiche F, Mokhtari H, Berrebbah H, Induction of oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L) following infection by the pathogen of task halo (*Pyrenophora tritici-repentis*), *International Journal of Biosciences*, Vol 6, No 8, 2015, 77-88. Record Number, 20153195976; URL, <http://www.innspub.net/wp-content/upl>.
 14. Dubreuil C, Mode of action of β -aminobutyric acid in the vine: a pathogen resistance inductor and study of the mechanisms involved in the pathogen susceptibility of the arabidopsis mutant pad2 deficient in glutathione [thesis]. France, Bourgogne University (2010) 265p.
 15. Sharma DC, Sharma CP, Tripathi RD, Phytotoxic lesions of chromium in maize, *Journal of Chemosphere*, Elsevier, Vol 51, Issue 1, April 2003, 63-68. DOI: org/10.1016/S0045-6535(01)003253; PMID: 12586157.
 16. Scoccianti V, Crinelli R, Tirillini B, Mancinelli V, Speranza A, Uptake and toxicity of Cr+3 in celery seedlings. *Chemosphere*. Vol 64, 2006, 1695-1703.
 17. Sbartai H, Djebar MR, Sbartai I, Berrebbah H, Bioaccumulation of Cd and Zn in Tomato *Lycopersicon esculentum*. *Direct Science C.R. Biologies* 335 (2012) 585-593. DOI :10.1016/j.crv.2012.08.001.
 18. Burkhead JL, Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, Cochu CM, Pilon M, Copper homeostasis, *Journal of New phytologist*, Vol 182, Issue 4, June 2009, 799-816. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x; PMID: 19402880.
 19. Palmer CM, Guerinot ML, Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants, *Journal of Nature Chemical Biology*, Vol 5 (5), and April 2009, 333-340. DOI:10.1038/nchembio.166; PMID: 19377460.
 20. Marschner, P. 2011. Mineral nutrition of higher plants, 3rd ed, Germany, Universitat of Hohenheim, 672 pp.
 21. Azizi N, Djebar MR, Sbartai H, Effect of Mg, Cu, Cd and Mg/Cd, Cu/Cd on Stress biomarkers in durum wheat, Vol 9 (4), October 2016, 102-113. DOI: 10.12692/ijb/9.4.102-113.
 22. Boulal H, Zaghouane O, El Mourid M, Rezgui S, Practical guide for the management of autumn cereals (wheat and barley) in the Maghreb (Algeria, Morocco, Tunisia), Ed, ITGC, INRA, ICARDA, Algeria, 2007, 117-126.
 23. OAIC: Algerian interprofessional Office for cereals, 2012 (oaic-office.com).
 24. Bradford M M, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Journal of Analytical Biochemistry*, Vol 72, 1976, 248-254. DOI: org/10.1016/0003-2697(76)90527-3; PMID: 94205.
 25. Goldsworthy GJ, Mordue W, Guthkelch J, Studies on insect adipokinetic hormones, *Gen Comp Endocrine*, Vol 18, 1972, 545-551.
 26. Weck becker G, Cory JG, Ribonucleotidoreductase activity and growth of glutathione-depleted mouse leukemia L 1210 cells in vitro, *Cancer Lett*, Vol 40, 1988, 257-264.
 27. Draper HH, Hadley M, Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Meth Enzymol*, Vol 186, 1990, 421-431. DOI: org/10.1016/0076-6879(90)86135-I; PMID: 2233309.
 28. Nakano Y, Azada K, Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by mono dehydroascorbate radical, *Plant Cell Physiol*, Vol 28, 1987, 131-140.
 29. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, Glutathione S-transferases, The first enzymatic step in mercapturic acid formation, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol 249 (22), 1974, 7130-7139. PMID: 4436300.
 30. Sels J, Mathys J, De Coninck B M, Cammue BP, De Bolle MF, Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides, *Journal of Plant PhysiolBiochem*, Vol 46 (11), 2008, 941–950. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.06.011; PMID: 18674922.
 31. Tuzun S, Somanchi A, The Possible Role of PR Proteins in Multigenic and Induced Systemic Resistance, In book: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*, 2006, pp112-142. DOI: 10.1007/0-387-23266-4_6.
 32. Ponchet, M., Panabieres, F., Milat, M.-L., Mikes, V., Montillet, J.-L., Suty, L., et al. (1999) Are elicitors cryptograms in plant-oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* 56: 1020 – 104. PMID: 11212320.
 33. Pedley KF, Martin GB, Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity, *Curr Opin Plant Biol.* 8, 541 Current Opinion in Plant Biology, Vol 8 (5), 2005, 541-547. DOI: 10.1016/j.pbi.2005.07.006; PMID: 16043387.
 34. Parent CE, Caccone A, Petren K, Colonization and diversification of Galapagos terrestrial fauna: phylogenetic and biogeographical synthesis, *Phil. Trans. R. Soc. B* (2008) 363, 3347–3361. doi:10.1098/rstb.2008.0118.
 35. Van Loon G, Hove GV, Schallock RL, Claes C, Personal Outcomes Scale: A Scale to Assess an Individual's Quality of Life, *Stichting Arduin and Gent: University of Gent, Middelburg*, 2008.
 36. Song F, Goodman RM, OsBIMK1, a rice MAP kinase gene involved in disease resistance responses, *Planta*, Vol 215 (6) 2002, 997–1005. DOI: 10.1007/s00425-002-0794-5; PMID: 12355160.
 37. Profotová B, Burketová L, Novotná Z, Martinec J, Valentova O, Involvement of phospholipases C and D in early response to SAR and ISR inducers in *Brassica napus* plants. *Plant PhysiolBiochem*, Vol 44 (2-3), 2006, 143-151.
 38. Akram A. Elicitation of induced systemic resistance in tomatoes and cucumbers and activation of the lipoxygenase pathway by non-pathogenic rhizobacteria [Thesis]. Belgium, University of Liège (2008) 165p.



39. Durrant WE, Dong X, Systemic acquired resistance, *Annu Rev Phytopathol*, Vol 42, 2004, 185-209. DOI: 10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421; PMID: 15283665.
40. Mosher RA, Durrant WE, Wang D, Song J, Dong X, A comprehensive structure-function analysis of Arabidopsis SN1 defines essential regions and transcriptional repressor activity, *Plant Cell*, Vol 18 (7), 2006, 1750–1765. DOI: 10.1105/tpc.105.039677; PMID: 16766691.
41. De Gara, Pinto MC, Moliterni VM, D'Egidio MG, (2003). Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*, *Journal Exp Bot*, Vol 54 (381), 2003, 249–258. DOI: 10.1093/jxb/erg021; PMID: 12493852.
42. Farmer EE, Davoine C, Reactive electrophile species, *Curr Opin Plant Biol*, Vol 10 (4), 2007, 380–386. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.04.019; PMID: 17646124.
43. Müller RD, Sdrolia M, Gaina C, Roest WR, Age, spreading rates and spreading symmetry of the world's ocean crust, *Geochem Geophys Geosyst*, Vol 9, 2008a, Q04006, DOI: 10.1029/2007GC001743.
44. Lin JM, Schroeder A, Allada R, In vivo circadian function of casein kinase 2 phosphorylation sites in *Drosophila PERIOD*, *Journal of Neurosci*, Vol 25(48), 2005, 11175–11183. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2159-05.2005; PMID: 16319317.
45. Cuyppers A, Vangronsveld J, Clijsters H, Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation, *Journal of Physiologia Plantarum*, Vol 110, Issue 4, 2000, 512–517. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2000.1100413.x
46. Bolwell GP, The origin of the oxidative burst in plants, *Biochemical Society Transactions*, Vol 24(2), 1996, 438–442. PMID: 8736779.
47. Bestwick CS, Brown IR, Bennett MH, Mansfield JW. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae pv phaseolicola*. *Plant Cell*. Vol 9 (2), 1997, 209–221. PMID: 9061952; PMCID: PMC156912.
48. Salzer JL, Charles L, Rosen AF, Struyk AF, GPI-anchored proteins in neural cell adhesion, *Advances in Molecular and Cell Biology Elsevier*, ed Colman DR, Vol 16, 1996, 193–222. DOI: org/10.1016/S1569-2558 (08)60067-3.
49. Calmes B. Adaptive responses of *alternaria brassicicola* to oxidative stress during interaction with brassicaceae: Role of the metabolism of mannitol and Glutathione-S-transferases [thesis]. France, University of Angers 2011, 201p.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.





ANNEXES

SIMETO

FICHE VARIETALE

Variété : Simeto (Sersou)
 Obtenteur : IAO ITALIO
 Demandeur : ITGC
 Origine : Italie
 Année d'inscription : 2001
 Pedigree : Capeiti x valvona



DESIGNATION DU CARACTERE



Coléoptiles: Pigmentation anthocyanique
 Première Feuille: pigmentation anthocyanique
 Plante: Port au tallage
 Plante: fréquence des plantes ayant la dernière feuille retombante
 Epoque d'épiaison : 1^{er} épillet visible sur 50 % des plantes
 Dernière feuille: Glaucescence de la gaine
 Dernière feuille: Glaucescence du Limbe
 Barbes pigmentation anthocyanique
 Tige: Pilosité du dernier nœud
 Tige: Glaucescence du Col de l'épi
 Epi: Glaucescence
 Plante: Hauteur (Tige, épi et barbes)

Distribution des barbes
 Barbes dépassant l'extrémité de l'épi
 Glume inférieure: forme (Epillet au tiers moyen de l'épi)
 Glume inférieure: Forme de la troncature
 Glume inférieure: Largeur de la troncature
 Glume inférieure: Longueur du bec
 Glume inférieure: Forme du bec
 Glume inférieure: Pilosité de la face externe
 Paille: Moelle en section transversale (mi-chemin entre l'épi et le nœud)
 Barbes: Couleur

Epi: Longueur à l'exclusion des barbes
 Epi: Pilosité du Bord du 1^{er} article du rachis
 Epi: Couleur (à maturité)
 Epi: Forme en vue de profil
 Epi: Compacité

Grain: Forme
 Grain: Longueur des poils de la brosse vue dorsale
 Grain: Coloration au phénol

Type de développement

NIVEAU D'EXPRESSION

Nulle à très faible
 Nulle à très faible
 Mi-dressé
 Nulle à Très faible
 Précoce
 Très forte
 Forte
 Nulle à très Faible
 Nulle à Très Faible
 Forte
 Forte
 Moyenne

Sur toute la Longueur
 Plus Longue
 Allongée
 Inclinée
 Etroite
 Courte
 Droit
 Absence
 Peu Epaisse
 Noire

Courte
 Nulle à Très faible
 Blanc
 Pyramidale
 Moyenne

Demi Allongée
 Moyenne
 Faible

Hiver

Caractéristiques Agronomiques : - Rendement : Elevé

Caractéristiques technologiques : - PMG : Elevé
 - Qualité semoulière : Très Bonne
 - Mitadinage : Résistante
 - Teneur en protéines : 15.80%

Résistance aux maladies : - Oïdium feuille : Moyennement sensible
 - Oïdium Epi : Résistante
 - Rouille brune : Moyennement sensible
 - Septoriose : Moyennement sensible

2. Courbe d'étalonnage des protéines

2.1. Préparation de la solution mère

La méthode retenue pour le dosage des protéines totales est celle de **Bradford** (1976) qui utilise le **BSA** (Sérum d'Albumin de Bovin) comme standard.

La gamme d'étalonnage (Tableau) est réalisée à partir d'une solution mère de **BSA**.
1mg/ml. (1mg de **BSA** par 1ml d'eau distillée).

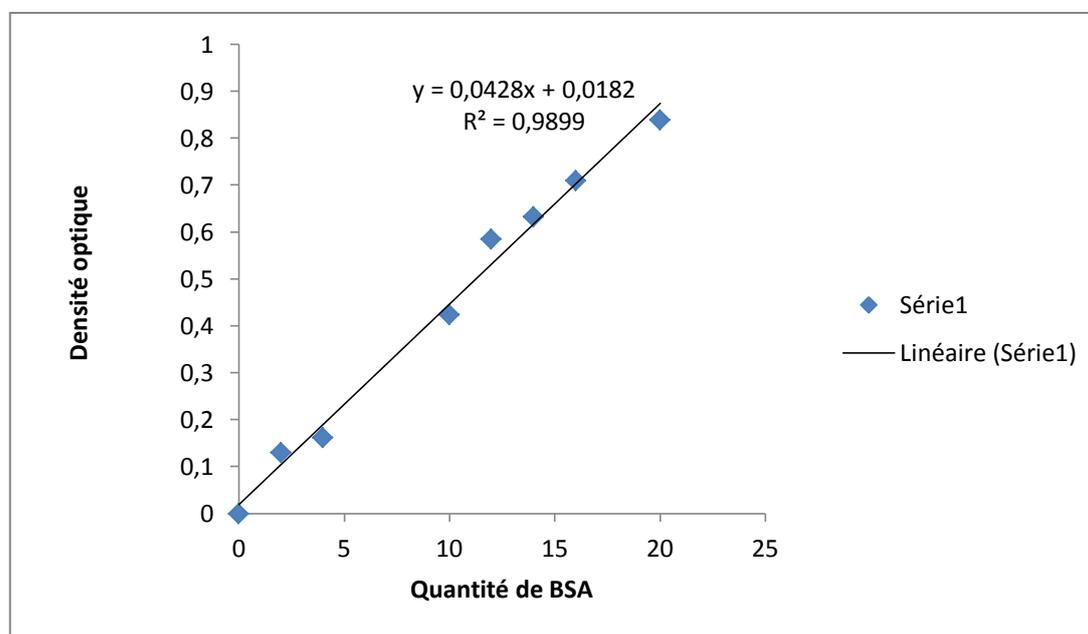
Nombre de Tubes	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BSA (µl)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Eau distillée (µl)	200	196	192	188	184	180	176	172	168	164	160
BBC (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

2.2. Préparation du réactif (réactif de Bradford)

*50 mg de **BBC** (Bleu Brillant de Comassie) + 25ml d'**éthanol à 95%** agité grâce à un agitateur pendant 2 heures.

*Rajouter 50ml d'**acide orthophosphorique** à 85% et complété à l'eau distillée jusqu'à 500ml.

*Conserver dans un flacon sombre jusqu'à un mois dans un réfrigérateur.



3.3. Préparation du réactif

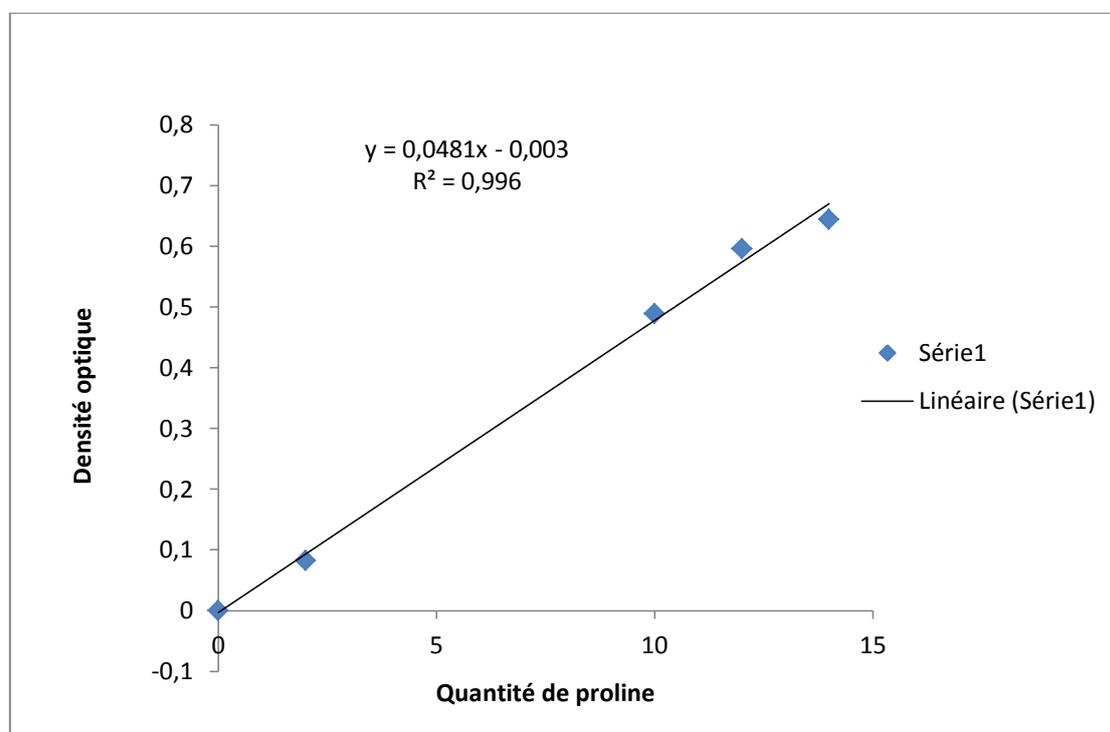
Dans une bouteille en verre opaque préparer le mélange suivant :

500ml d'**acide acétique**
+ 80ml d'**acide orthophosphorique**
+120ml d'eau distillée ⇒ Agiter. } Solution A

Soit n : le nombre de tubes à doser (extraits + étalons).

Mettre dans un bécher :

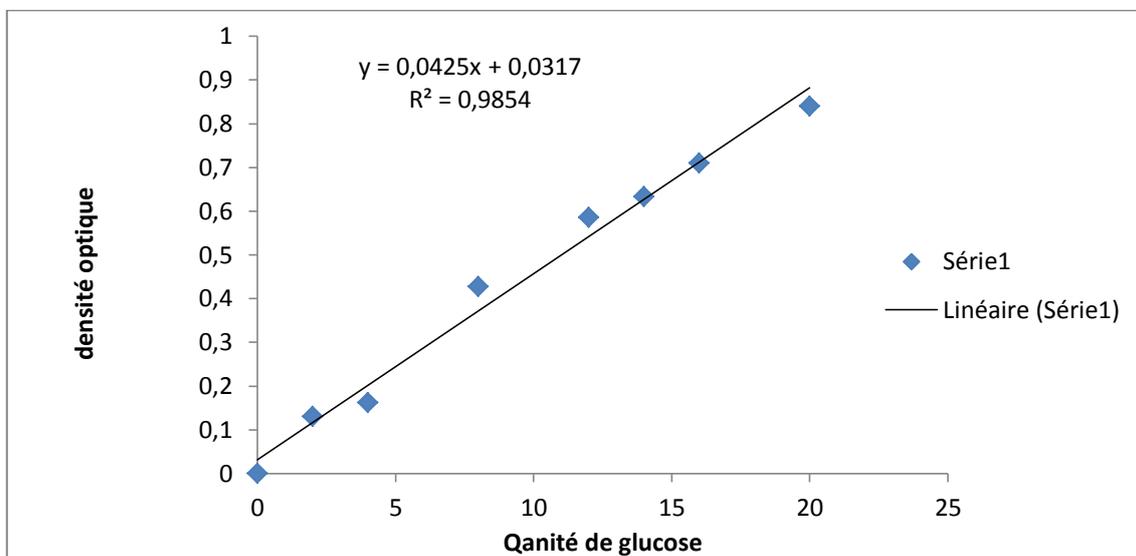
$(n + 4) = 12 + 4 = 16 * 25\text{mg}$ de ninhydrine
16ml de la solution A
16ml d'**acide acétique** ⇒ Agiter. } Solution B



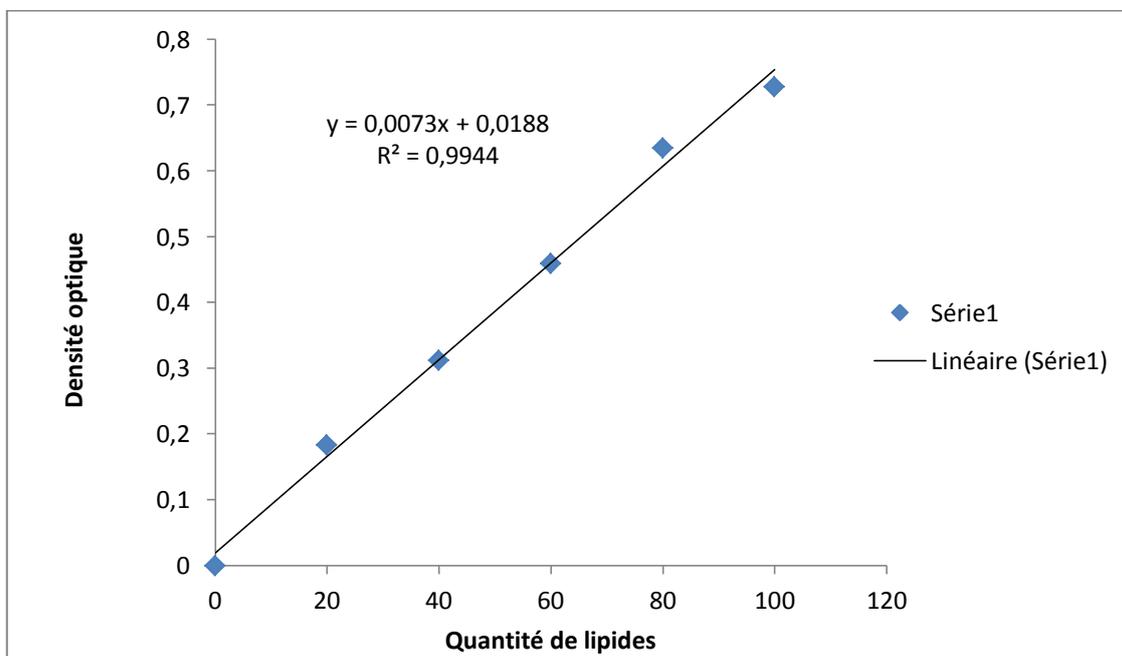
4.3. Préparation du réactif

* 0.2 g d'**anthrone** pur par 100ml d'**H₂SO₄** pur (la préparation de l'anthrone au moins 4 heures à l'avance).

* Conserver dans un flacon sombre.



5. Courbe d'étalonnage des lipides



6. ANOVA a un critère de classification

6. 1. Teneur en eau au niveau des feuilles

6.1.1. TEF TACHE

One-way ANOVA: C1 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	19,34388	6,44796	122818,29	0,000
Error	16	0,00084	0,00005		
Total	19	19,34472			

S = 0,007246 R-Sq = 100,00% R-Sq(adj) = 99,99%

6.1.2. TEF CUIVRE

One-way ANOVA: C3 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	5,832100	1,944033	77761,33	0,000
Error	16	0,000400	0,000025		
Total	19	5,832500			

S = 0,005 R-Sq = 99,99% R-Sq(adj) = 99,99%

6.2. Chlorophylles a, b et a+b

6.2.1. Chloro a tache

One-way ANOVA: C4 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	73,105	24,368	148,79	0,000
Error	16	2,620	0,164		
Total	19	75,725			

S = 0,4047 R-Sq = 96,54% R-Sq(adj) = 95,89%

6.2.2. Chloro b tache

One-way ANOVA: C5 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	1245,488	415,163	1432,54	0,000
Error	16	4,637	0,290		
Total	19	1250,125			

S = 0,5383 R-Sq = 99,63% R-Sq(adj) = 99,56%

6.2.3. Chloro a+b tache**One-way ANOVA: C6 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	1673,270	557,757	7100,21	0,000
Error	16	1,257	0,079		
Total	19	1674,527			

S = 0,2803 R-Sq = 99,92% R-Sq(adj) = 99,91%

6.2.4. Chloro a cuivre**One-way ANOVA: C7 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	10,6419	3,5473	241,56	0,000
Error	16	0,2350	0,0147		
Total	19	10,8769			

S = 0,1212 R-Sq = 97,84% R-Sq(adj) = 97,43%

6.2.5. Chloro b cuivre**One-way ANOVA: C8 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	143,671	47,890	328,06	0,000
Error	16	2,336	0,146		
Total	19	146,007			

S = 0,3821 R-Sq = 98,40% R-Sq(adj) = 98,10%

6.2.6. Chloro a+b cuivre**One-way ANOVA: C9 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	141,883	47,294	130,53	0,000
Error	16	5,797	0,362		
Total	19	147,680			

S = 0,6019 R-Sq = 96,07% R-Sq(adj) = 95,34%

6.3. Les protéines**6.3.1. Protéines tache****One-way ANOVA: C10 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	3,930725	1,310242	8704,48	0,000
Error	16	0,002408	0,000151		
Total	19	3,933133			

S = 0,01227 R-Sq = 99,94% R-Sq(adj) = 99,93%

6.3.2. Protéines cuivre

One-way ANOVA: C11 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	26,78644	8,92881	45077,95	0,000
Error	16	0,00317	0,00020		
Total	19	26,78961			

S = 0,01407 R-Sq = 99,99% R-Sq(adj) = 99,99%

6.4. Proline

6.4.1. Proline tache

One-way ANOVA: C12 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0132140	0,0044047	50483,42	0,000
Error	16	0,0000014	0,0000001		
Total	19	0,0132154			

S = 0,0002954 R-Sq = 99,99% R-Sq(adj) = 99,99%

6.4.2. Proline cuivre

One-way ANOVA: C13 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0880324	0,0293441	286284,31	0,000
Error	16	0,0000016	0,0000001		
Total	19	0,0880341			

S = 0,0003202 R-Sq = 100,00% R-Sq(adj) = 100,00%

6.5. Sucres

6.5.1. Sucres tache

One-way ANOVA: C14 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0739430	0,0246477	1084,61	0,000
Error	16	0,0003636	0,0000227		
Total	19	0,0743066			

S = 0,004767 R-Sq = 99,51% R-Sq(adj) = 99,42%

6.5.2. Sucres cuivre**One-way ANOVA: C15 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	1,086643	0,362214	71022,44	0,000
Error	16	0,000082	0,000005		
Total	19	1,086725			

S = 0,002258 R-Sq = 99,99% R-Sq(adj) = 99,99%

6.6. Lipides**6.6.1. Lipides tache****One-way ANOVA: C16 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0165494	0,0055165	889,61	0,000
Error	16	0,0000992	0,0000062		
Total	19	0,0166486			

S = 0,002490 R-Sq = 99,40% R-Sq(adj) = 99,29%

6.6.2. Lipides cuivre**One-way ANOVA: C17 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0021734	0,0007245	234,39	0,000
Error	16	0,0000495	0,0000031		
Total	19	0,0022228			

S = 0,001758 R-Sq = 97,78% R-Sq(adj) = 97,36%

6.7. Malondialdéhyde**6.7.1. MDA tache****One-way ANOVA: C18 versus C2**

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0000052	0,0000017	232,87	0,000
Error	16	0,0000001	0,0000000		
Total	19	0,0000053			

S = 0,00008625 R-Sq = 97,76% R-Sq(adj) = 97,34%

6.7.2. MDA cuivre

One-way ANOVA: C19 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0000000	0,0000000	1201,68	0,000
Error	16	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

S = 0,000001433 R-Sq = 99,56% R-Sq(adj) = 99,48%

6.8. Glutathion

6.8.1. GSH tache

One-way ANOVA: C20 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0045296	0,0015099	6258,57	0,000
Error	16	0,0000039	0,0000002		
Total	19	0,0045335			

S = 0,0004912 R-Sq = 99,91% R-Sq(adj) = 99,90%

6.8.2. GSH cuivre

One-way ANOVA: C21 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0047447	0,0015816	1802,36	0,000
Error	16	0,0000140	0,0000009		
Total	19	0,0047588			

S = 0,0009367 R-Sq = 99,70% R-Sq(adj) = 99,65%

6.9. Glutathion-S-transférase

6.9.1. GST tache

One-way ANOVA: C22 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0000009	0,0000003	89,75	0,000
Error	16	0,0000001	0,0000000		
Total	19	0,0000009			

S = 0,00005666 R-Sq = 94,39% R-Sq(adj) = 93,34%

6.9.2. GST cuivre

One-way ANOVA: C23 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0003185	0,0001062	344,47	0,000
Error	16	0,0000049	0,0000003		
Total	19	0,0003235			

S = 0,0005552 R-Sq = 98,48% R-Sq(adj) = 98,19%

6.10. Catalase

6.10.1. CAT tache

One-way ANOVA: C24 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0000000	0,0000000	18862,76	0,000
Error	16	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

S = 1,524795E-08 R-Sq = 99,97% R-Sq(adj) = 99,97%

6.10.2. CAT cuivre

One-way ANOVA: C25 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0000000	0,0000000	1064,77	0,000
Error	16	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

S = 0,0000002828 R-Sq = 99,50% R-Sq(adj) = 99,41%

6.11. Activité APX

6.11.1. APX tache

One-way ANOVA: C26 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0000000	0,0000000	1045,66	0,000
Error	16	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000000			

S = 0,000001716 R-Sq = 99,49% R-Sq(adj) = 99,40%

6.11.2. APX cuivre

One-way ANOVA: C27 versus C2

Source	DF	SS	MS	F	P
C2	3	0,0000010	0,0000003	1771001,84	0,000
Error	16	0,0000000	0,0000000		
Total	19	0,0000010			

S = 0,0000004353 R-Sq = 100,00% R-Sq(adj) = 100,00%





