

UNIVERSITE DE BLIDA 1

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biotechnologie

THESE DE DOCTORAT

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Améliorations des productions végétales

STRATEGIES ADAPTATIVES AU STRESS HYDRIQUE ET SALIN

D'UNE HALOPHYTE SPONTANEE *Atriplex halimus* L .

APPROCHES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES

Par

Fatima BOUCHENAK

Devant le jury composé de :

M. BENMOUSSA	Professeur	U.Blida1	Président
F /Z . BENREBIHA	Professeur	U.Blida 1	Directrice de thèse
M.LAHRECH	Professeur	UZA Djelfa	Examineur
A.BENAZIZA	MCA	U. DE Biskra	Examineur
C.CHAOUIA	MCA	U.Blida1	Examinatrice
M.BELHAMRA	Professeur	U. DE Biskra	Examineur

Blida, Avril 2015

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite exprimer ma gratitude aux Professeurs LAHRECH.M.et Belhamra M. ainsi qu' aux Docteurs BENAZIZA A. et CHAOUIA.C. pour avoir accepté d'être les examinateurs de ce travail. Je remercie aussi le Professeur BENMOUSSA.M. de bien vouloir présider le jury.

A Mme BENREBIHA F/Z, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude, pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse et ses encouragements tout au long de cette thèse.

J'adresse mes plus grands remerciements au Docteur Pascal Rey , chercheur au laboratoire d'écophysiologie moléculaire des plantes du service de Biologie végétale et microbiologie environnementale du CEA Cadarache . Merci à toi Pascal d'avoir accepté de travailler sur l'Atriplex, pour ta gentillesse et pour ta patience, ta disponibilité tout au long de mes séjours en France. Ta rigueur ,tes suggestions nombreuses et tes conseils m'ont été d'un précieux concours pour valoriser les résultats et à la rédaction de l'article. Qu'il trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères pour tout le temps qu'il m'a consacré et pour toutes les connaissances scientifiques qu' il m'a transmises en biochimie et biologie moléculaire.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près comme de loin aux résultats présentés dans cette thèse.

Ce travail a donné lieu aux résultats suivants (communications, publications,...) :

Publications internationales

Fatima Bouchenak, Patricia Henri, Fatma-zohra Benrebiha and Pascal Rey: Differential responses to salinity of two *Atriplex halimus* populations in relation to organic solutes and antioxidant systems involving thiol reductases .Journal of plant physiology 169 (2012) 1445-1453 (impact factor 2,7)

Communications internationales

Fatima Bouchenak, Pascal Rey, Patricia Henri', Fatima Benrebiha ,

Mécanismes adaptatifs d'une halophyte spontanée *Atriplex halimus* sous condition de stress salin et hydrique . congrès International : Gestion des Ressources et Applications Biotechnologiques en Aridoculture et Cultures Oasiennes: Perspectives pour un Développement Durable des Zones Arides, Djerba (Tunisie) 17-19 Décembre 2013.

Chaouia Cherifa, Benrebiha Fatima, Bouchenak Fatima,

Influence de la position du bourgeon sur la reprise végétative par bouturage de *Atriplex halimus* L.1^{er} Workshop international sur les stress environnementaux et la conduite des cultures.2-3Juin 2010. Université de Blida

Bouchenak F, Benrebiha F/Z, Maman moutari S, Bounasri M, Boubacar H.

Essai de comportement différentiel d'*Atriplex halimus* par rapport à *Atriplex canescens* en condition de stress hydrique .1^{ère} Séminaire International de Biotechnologies animales et végétales. Faculté Agro-vétérinaire.4-5 novembre 2007

F. Benrebiha, F Bouchenak, C .Chaouia et S.Aguemal

Effet de la salinité sur les paramètres morphologiques et physiologiques de *Atriplex halimus*.1^{ère} Séminaire International de Biotechnologies animales et végétales. . Faculté Agro-vétérinaires.4-5 novembre 2007

Communications nationales

Bouchenak, F, Benrebiha F, Maman moutari S, Boubacar H.

Identification des sources de tolérance au stress hydrique chez *Atriplex halimus* arbustes fourragers de la famille des Chénopodiacées en culture in vitro. 3^{ème} journées nationale de Biologie : Environnement et Biodiversité ; 19 et 20 novembre 2007.

F. Benrebiha ,F. Bouchenak, C .Chaouia et S.Aguemal.

Effet de la salinité sur la croissance et la teneur en proline de jeunes plantes de *Atriplex halimus*, Séminaire nationale sur Agriculture, Environnement et santé 19-20 avril 2008.

Bouchenak F, Benrebiha F/Z, Ouramdane S, Ghenait A

Adaptation hydrique, photosynthétique et biochimique de deux écotypes d'*Atriplex halimus* L (arbustes fourragers des zones arides et semi arides) au stress environnemental. Communication orale aux journées nationales sur les interactions

faune-Flore et impact des changements globaux dans les espaces naturels anthropisés
.2et 3 décembre 2008

Benrebiha F/Z, Bouchenak F ,Chaouia C, Merdes H et Malek S,

Effet de la salinité sur la croissance et la composition minérale chez *Atriplex halimus* L en culture en vitro

Communication orale aux journées nationales sur les interactions faune-Flore et impact des changements globaux dans les espaces naturels anthropisés .2et 3 décembre 2008

RESUME

Atriplex halimus est une espèce xéro-halophyte répandue dans le bassin méditerranéen. La tolérance au stress hydrique et salin a été étudiée chez cette espèce.

Dans une première expérience plusieurs paramètres physiologiques et biochimiques, caractéristiques du stress salin ont été étudiés. Pour cela un stress salin est induit par l'application de différentes doses de NaCl (0, 150mM, 300mM, 450mM, 600 mM) sur des plantules d'*Atriplex halimus*. A cet effet de faibles concentrations de NaCl (150mM) stimulent la croissance confirmant l'halophilie de l'espèce. La présence de concentrations élevées en NaCl (450mM et 600mM) a entraîné une diminution de la croissance, du statut hydrique des plantules d'*Atriplex halimus*, une accumulation des sucres solubles, de proline, de glycine bêtaïne et des ions Na⁺. Cette accumulation d'osmorégulateurs serait probablement due aux processus d'ajustement osmotique. Pour de nombreux paramètres, sous stress salin les racines semblent être moins affectées que les parties aériennes. Afin de vérifier l'effet du stress salin sur le métabolisme oxydatif des plantes d'*Atriplex halimus*, une activité des enzymes antioxydantes comme les peroxydases et les catalases au niveau des feuilles a été évaluée. Les résultats montrent une baisse significative du contenu en pigments chlorophylliens. Un niveau élevé de la peroxydation des lipides indique que les traitements salins résultent en un stress oxydatif au niveau des plantules d'*Atriplex halimus*. Au niveau foliaire, les activités des Catalases (Cat) et Peroxydases (POX) augmentent de manière significative. De plus, les quantités des composés phénoliques et flavonoïdes accumulés par les plantes soumises au traitement salin s'avèrent les plus importantes comparées à celles des témoins.

Une deuxième série d'expériences est menée sur deux populations d'*Atriplex halimus* en condition de serre. La tolérance au stress salin et hydrique des deux populations a été étudiée en relation avec l'accumulation de solutés organiques et des protéines thiols peroxydases et réductases les peroxyredoxines (Prx) chloroplastiques et les Méthionines sulfoxyde réductases (MSRs) révélées par électrophorèse SDS-PAGE unidimensionnelle. Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de protection de l'appareil photosynthétique contre le stress oxydant. Nous avons également analysé une thiorédoxine CDSP32 et une Glutarédoxine qui sont des donneurs d'électrons aux protéines thiols réductases, aucun signal n'a été observé chez les plantules d'*Atriplex halimus*. A 300mM de NaCl, les plantules de Laghouat accumulent de façon significative la proline, la glycine bêtaïne, les Prx Q et les Msrs. Elles présentent une forte activité de la catalase et des méthionine sulfoxyde réductases (Msrs) que la population de Djelfa. Le niveau d'oxydation et la signification physiologique de certaines protéines chloroplastiques comme la Prx à deux cystéines BAS1 à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine et la forme oxydée (acide sulfinique) du résidu de cystéine a été étudié. A partir de nos résultats, nous supposons que les osmolytes et les systèmes antioxydants participent à la tolérance au stress salin chez la population de Laghouat. Ces travaux montrent la participation probable des thiols réductases comme les MSR, Prx dans la tolérance d'*Atriplex halimus* à une forte salinité et que le niveau d'oxydation de la BaS1 pourrait être associé au mécanisme de tolérance.

Mots clés : *Atriplex halimus*; Catalase; Methionine sulfoxide reductase; Peroxyredoxines, Glycine betaine, Proline, Na⁺, stress salin,

ABSTRACT

Atriplex halimus is a xero-halophyte species widespread in the Mediterranean basin. Tolerance to drought and salt stress was studied.

In a first experiment several physiological and biochemical parameters characteristic of salt stress were studied. For salt stress that is induced by the application of different doses of NaCl (0, 150 mM, 300 mM, 450 mM, 600 mM). To this end low concentrations of NaCl (150mM) stimulate growth confirming halophilic species. The presence of high concentrations of NaCl (450mM and 600mM) resulted in a decrease in growth, water status of seedlings of *Atriplex halimus* accumulation of soluble sugars, proline and glycine betaine. For many parameters under salt stress the roots seem to be less affected than shoots. To verify the effect of salt stress on the oxidative metabolism of *Atriplex halimus* plants, activity of antioxidant enzymes such as peroxidases and catalases in leaves was assessed. The results show a significant decrease in chlorophyll pigment content. A high level of lipid peroxidation indicates that saline treatment resulted in oxidative stress in seedlings of *Atriplex halimus*. The leaf level, Cat activities, POX increase significantly. In addition, the amounts of phenolics and flavonoids accumulated by plants subjected to salt compounds are the most important compared to those of control. In addition, the amounts of phenolics and flavonoids accumulated by plants subjected to salt compounds are the most significant compared to controls.

A second experiment was conducted on two populations of *Atriplex halimus*. Tolerance to drought and salt stress was studied in two populations of *Atriplex halimus*, one from of Djelfa semi-arid (Djelfa) and arid saline Laghouat. Water stress result from withholding watering or applying a solution of Polyethylenglycol (PEG). Salt stress is induced by the application of different doses of 300 mM and 600 mM NaCl for 14 days. Tolerance to salt and drought stress in the two populations was studied in relation to the accumulation of organic solutes and the involvement of antioxidant enzymes such as catalase and methionine sulfoxide reductase enzymes respectively involved in detoxification of free radicals and repairing oxidized proteins during oxidative stress. We also analyzed a CDSP32 thioredoxin and Glutathione reductase which are an electron donor to the protein thiol reductase, no signal was observed in seedlings of *Atriplex halimus*. At 300 mM NaCl, Laghouat plant exhibit higher concentrations in Na⁺, proline, ammonium quaternary compounds and higher catalase activity than Djelfa plants. We then analysed the involvement of recently characterised plastidial thiol reductases methionine sulfoxide reductase (MSRS). An increased abundance of plastidial MSRA and a higher total MSR activity were also noticed in Laghouat plants treated with 300 mM NaCl compared to Djelfa ones. We propose that mechanisms based on organic solutes and antioxidant enzymes like catalases, and MSRs partly underlie the better tolerance of the Laghouat population to high salt.

Keys words : *Atriplex halimus*; Catalase; Methionine sulfoxide reductase; Peroxyredoxines, Glycine betaine, Proline, Na⁺, salinity, drought stress

ملخص

Atriplex halimus نبات مقاوم للملوحة والجفاف منتشر على نطاق واسع في حوض البحر الأبيض المتوسط. تمت دراسة تحمل هذا النبات للجفاف والتوتر الملحي.

في تجربة أولى تمت دراسة عدة معايير فيزيولوجية وبيوكيميائية للتوتر الملحي.

تمت عملية التوتر الملحي بتطبيق عدة تراكيز من كلوريد الصوديوم (150mM, 300mM, 450mM, 600mM) إن التراكيز المنخفضة لكلوريد الصوديوم (150mM) تحفز النمو مثبتة بذلك قابلية نمو النبات في وسط ملحي ، أما التراكيز العالية من الملح (من 450mM الى 600mM) تؤدي الى نقص في النمو ، التوازن المائي، تراكم السكريات القابلة للذوبان، البرولين، غليسين البيتاين .

نتيجة للتوتر الملحي تبين أن الجذور أقل تأثراً من الأجزاء الهوائية من أجل التحقق من تأثير التوتر الملحي على الأيض المؤكسد لنبات *Atriplex* ، قمنا بتقييم نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة مثل البيروكسيداز والكاتالاز على مستوى الأوراق .

النتائج المتحصل عليها تبين انخفاضاً معتبراً لصبغ الكلوروفيل. بيروكسيداز الدهون يشير الى أن إضافة كلوريد الصوديوم (التوتر الملحي) يسفر على التوتر المؤكسد لشتلات على مستوى الأوراق نشاط الكاتالاز والبيروكسيداز يرتفع بطريقة معتبرة مقارنة بالنبات الشاهد، كميات مركبات الفينول والفلافونويد التي تراكمت في التبتات الخاضع للتوتر الملحي.

التجربة الثانية أقيمت على مجموعتين من نبات في بيوت بلاستيكية. قمنا بدراسة محاليل عضوية وبروتينات التبول بيروكسيداز والريدوكتاز. هذه النتائج متحصل عليها ب Electrophorèse SDS-PAGE أحادية البعد.

هذه البروتينات لها دخل في حماية النبات ضد التوتر المؤكسد. قمنا أيضاً بتحليل... التي تقدم الكترولونات لبروتين تيول ريديكتاز. لم يلاحظ أي إشارة عند شتلات *Atriplex* عند 300mM من كلوريد الصوديوم شتلات الأغواط تخزن بقيمة معتبرة البرولين و غليسين البيتاين .PrxQ, Msrs.

تملك هذه الشكلات نشاطاً معتبراً من الكاتالازو Msrs مقارنة بمجموعة الجلفة .

من نتائجنا المتحصل عليها ، نفترض أن هذه المركبات العضوية والطرق المضادة للأكسدة تشارك على تحمل التوتر الملحي عند مجموعة الأغواط. هذه الأعمال تسير الى مشاركة Msrs و PrxQ في تحمل *Atriplex halimus* لتراكيز عالية من الملوحة.

كلمات المفتاح :

Atriplex halimus كاتالاز، متيونين سيلفوكسيد ريديكتاز، بيروكسيدوكسين، غليسين بيتاين، برولين ، Na^+ توتر ملحي ، توتر مائي .

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

LISTE DES ILLUSTRATIONS ,GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION.....	1
1. PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE	3
1.1 Généralités sur le genre <i>Atriplex</i>	3
1.2.Description et systématique de l'espèce.....	4
2.LES EFFETS DES STRESS ABIOTIQUES SUR LES VEGETAUX	6
2.1. Le déficit hydrique.....	6
2.1.1.Le déficit hydrique sur les plantes.....	6
2.1.2. les différentes formes de réponses des plantes au stress hydrique	8
2.2 Le stress salin chez les végétaux.....	12
2.2.1 La compartimentation vacuolaire.....	13
2.2.2 Ajustement ionique	14
2.2.3 stratégie osmotique.....	15
2. 3 Les antioxydants et protéines de détoxication	17
2.3.1.Photosynthèse et production d'espèce actives de l'oxygène.....	18
2.3.2.Effet des EAO sur la cellule végétale	19
2.3.3.Les mécanismes de lutte contre le stress oxydant.....	20
2.3.4. Protéines et stress oxydant.....	22
3. MATERIEL ET METHODES	38
3.1.Matériel végétal.....	38
3.2.Conditions de cultures des plantes entières.....	38
3.3. Mesures effectuées.....	39
3.3.1. La croissance.....	39
3.3.2. Contenu relatif en eau.....	39
3.3.3. Potentiel hydrique et Potentiel osmotique	39
3.3.4. Conductivité électrique	39
3.3. 5. Dosage des pigments chlorophylliens.....	40
3.3. 6. Mesure du MDA.....	41
3.3.7.Mesure du peroxyde hydrogène H ₂ O ₂	42

3.3.8 Dosage des sucres solubles totaux.....	43
3.3.9. Dosage de la proline	43
3.3.10. Détermination de la teneur en acides aminés libres totaux	44
3.3.11. Dosage des Protéines solubles	45
3.3.12. Dosage des Ammonium quaternaires (glycine betaine)	45
3.3.13. Dosage des ions : par spectrophotométrie à flamme	45
3.3.14. Recherche des protéines de stress, par Electrophorèse SDS PAGE en conditions dénaturantes.....	46
3.3.15 Analyse de l'activité anti-oxydante: catalase ,peroxydase et Methionine sulfoxyde réductase	54
3.3.16. Caractérisation des antioxydants de nature non enzymatique.....	56
3.3. 17. Analyses statistiques.....	57
4. RESULTATS ET DISCUSSION	58
4.1. Réponses physiologiques et biochimiques des plantules d' <i>Atriplex halimus</i> au stress salin.....	58
4.1.1. Effet du NaCl sur la croissance, le contenu relatif en eau et le potentiel osmotique	58
4.1.2. accumulation des solutés inorganiques Na ⁺ et K ⁺	60
4.1.3. Accumulation des solutés organiques.....	63
4.1.4. Effet du NaCl sur la teneur en pigments chlorophylliens	65
4.1.5. Effet du NaCl sur la teneur en MDA et la quantité de H ₂ O ₂	66
4.1.6. Accumulation des composés phénoliques et flavonoides	66
4.1.7. Accumulation des protéines solubles et activités des peroxydases et catalases.....	70
4.2. Participation des protéines à thiols et la glycine bétaine dans la réponse de deux populations d' <i>Atriplex halimus</i> au stress hydrique et salin.....	73
4.2.1. Description de la localité des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i>	73
4.2.2. Effets d'un déficit hydrique, du PEG et une forte salinité sur la croissance ,le statut hydrique ,les concentrations d'ions des deux populations d' <i>Atriplex</i>	73
4.2.3. Effets du stress salin et stress hydrique sur l'accumulation des solutés organiques.....	76
4.2.4 Analyse des protéines par électrophorèse SDS-PAGE.....	79
4.2.4.1. Etude des profils protéiques et immunodétections.....	79
4.2.4.2. Immunodétection avec des anticorps dirigés contre des protéines connues et synthétisées en réponse au déficit hydrique et au stress salin.....	80

4.2.4.2.1	Quantité de protéine CDSP32.....	81
4.2.4.2.2.	Quantité de protéine CDSP34.....	82
4.2.4.2.3.	Mesure de l'abondance des Peroxyredoxines par SDS-PAGE.....	83
4.2.4.2.4.	Mesures de l'abondance des MSRs par électrophorèse SDS-PAGE..	86
4.3.4.2.5	Mesures de l'abondance des catalases par SDS PAGE.....	88
4.2.5.	Mesures des activités enzymatiques.....	88
4.2.5.1.	Activité des MSRs par HPLC.....	88
4.2.5.2.	Activité des Catalases.....	91
DISCUSSION.....		93
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		103
REFERENCES		104
APPENDICES.....		128
A-LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS.....		128
B-DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE BCA ET PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR HPLC		130
-SPECTRES ET VALEURS BRUTES DE HPLC.....		130
ACTIVITE DES CATALASES.....		134
C- CALCUL STATISTIQUES.....		139

LISTE DES ILLUSTRATIONS ,GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1 : Arbuste d' <i>Atriplex halimus</i>	5
Figure 2.1 : Voie de biosynthèse de la proline [63].....	11
Figure 2.2 : voie de biosynthèse de la glycine betaine [76].....	12
Figure 2.3 Schématisation du bilan de la circulation du sodium dans les plantes de type <i>include</i> ou <i>exclude</i>	14
Figure 2.4 Les différents EAO et leur formation.....	18
Figure 2.5 : Sites de génération d'EAO dans la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons.....	18
Figure 2.6 : Les conséquences de la production d'EAO en conditions optimales de croissance (A) et lors de conditions de stress (B).....	20
Figure 2.7 : Principales réactions enzymatiques permettant d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS).....	21
Figure 2.8 : Cycle ascorbate-glutathion [143].....	21
Figure 2.9 : Oxydation et réduction de la cystéine (A) et de la Méthionine (B).....	24
Figure 2.10 :Structure tridimensionnelle de la thiorédoxine1 d' <i>Echerichia coli</i>	25
Figure 2.11 : Schéma de réduction d'une protéine cible par la thiorédoxine.....	25
Figure 2.12 : Mécanisme de réduction NADPH-dépendante des ponts disulfures des protéines par le système thiorédoxine.....	26
Figure 2.13 : Représentation schématique du système chloroplastique ferrédoxine-thiorédoxine.....	26
Figure 2.14 : Réactions d'oxydations de résidus méthionines et de réduction par les MSR	28
Figure 2.15 : A : structure tridimensionnelle de la MsrA d'E.coli B : Mécanisme catalytique de la MsrA d'E.coli [185].....	29
Figure 2.16 : structure tridimensionnelle (A) et mécanisme catalytique (B) de la MsrB de <i>N. gonorrhoeae</i> [187].....	30

Figure 2.17 : Mécanisme de réduction de MsrB2 par les thiorédoxines chloroplastiques...[134]	32
Figure 2.18 : Réaction de réduction des hydroperoxydes de lipides par les peroxyredoxines [196].....	33
Figure 2.19 : Les différents types de Prx et les mécanismes de régénérations de leur activités[196].....	35
Figure 3.1 : Dosage de la chlorophylle.....	40
Figure 3.2 : Formation de malondialdéhyde suite à la progression de la chaîne de peroxydation des lipides en réponse à un stress oxydatif[211]	39
Figure :3.3 : Réaction de condensation du MDA avec l'acide thio-barbiturique formant le dérivé coloré :MDA (TBA) ₂ , mesuré par spectrophotométrie à 532nm.....	42
Figure 3. 4 :Dosage de la proline.....	44
Figure 3. 5 Détermination des ions potassium Na ⁺ et K ⁺	46
Figure :3.6 Schéma du système de transfert des protéines sur membrane nitrocellulose.....	48
Figure 3.7: réaction d'oxydation du gaïacol en trétragaïacol en présence du H ₂ O ₂ [224] ...	56
Figure 4.1 : Effet du stress salin sur la croissance relative des feuilles et des racines (A)et leur contenu relatif en eau (B).....	59
Figure 4.2: Effet du stress salin sur le potentiel osmotique au niveau des feuilles, et des racines.....	59
Figure 4 .3 : Effet du stress salin sur l'accumulation de Na ⁺ (A) et K ⁺ (B) au niveau des feuilles et des racines.....	61
Figure 4.4 Corrélation entre le poids sec des feuilles et la teneur en Na ⁺ (A), le taux de croissance des plantules et le rapport K ⁺ / Na ⁺ ,(B) le contenu relatif en eau et la teneur en Na ⁺ (C).....	62...
Figure 4.5 : Effet du stress salin sur accumulation de la Proline (A), sucres solubles totaux(B), acides aminés totaux (C) et Glycine bétaine (D)au niveau des feuilles, racines des plantules d' <i>Atriplex halimus</i>	64
Figure 4.6. Teneurs des pigments foliaires en fonction de l'intensité du stress salin au niveau des feuilles d' <i>Atriplex halimus</i>	66
Figure 4.7 Corrélation entre la quantité H ₂ O ₂ et la teneur en MDA (A),(B) le poids sec des plantules et la teneur en MDA,(C), la teneur en phénols totaux (C) et la teneur en M.....	69
Figure 4.8: Effet du stress salin sur les teneurs en Protéines au niveau des feuilles et des racines	70
Figure 4.9: Activités des guaiacol peroxydases au niveau des feuilles d' <i>Atriplex halimus</i>	71

Figure 4.10: Activités des Catalases au niveau des feuilles d' <i>Atriplex halimus</i>	72
Figure 4.11 Effet du stress salin et hydrique sur l'accumulation de sucres solubles (A), la proline(B) et glycinebétaine(C) au niveau des feuilles des 2 populations d' <i>Atriplex halimus</i>	78
Figure 4.12 : Profil SDS-PAGE révélé au bleu de Coumassie de protéines foliaires d' <i>Atriplex halimus</i> témoins et soumises à un déficit hydrique de 14 jours et 17J.....	79
Figure 4.13: Profil SDS-PAGE au bleu de coumassie des protéines foliaires solubles des plantes des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i> soumises à un stress salin.....	80
Figure 4.14 : Immunodétection sur membrane de la protéine CDSP32 dans les extraits protéiques solubles de feuilles témoins et stressées des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i>	81
Figure 4.15 Immunodétection sur membrane de la protéine CDSP32 dans les extraits protéiques solubles de feuilles témoins et stressées au NaCl des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i>	81
Figure 4.16 : Profil SDS-PAGE au bleu de coumassie des protéines membranaires des plantes des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i> soumises à un stress hydrique (A) et un stress salin (C).....	82
Figure 4.17 Immunodétection sur membrane des protéines plastidiales, Bas1 , 2Cyst-Prx oxy, PrxIIe, PrxQ dans les extraits de feuilles des plantes témoins et plantes stressées des 2 populations d' <i>Atriplex halimus</i>	85
Figure 4.18	
A. Immunodétection sur membrane des protéines plastidiales, MsrB1 ,MsrB2,MsrA4 dans les extraits de feuilles des plantes témoins et plantes stressées des 2 populations d' <i>Atriplex halimus</i>	87
B ; les histogrammes représentent la quantification des protéines chloroplastiques.....	87
Figure 4.19: Immuno détection sur membrane de la protéine CDSP34 dans les extraits protéiques membranaires de feuilles témoins et stressées, au stress hydrique (A) et au stress salin (B) des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i>	88
Figure 4.20 Effet du stress hydrique (A) et stress salin(B) sur les activités des Methionines sulfoxydes réductases (Msr) au niveau feuilles des 2 populations d' <i>Atriplex halimus</i>	89
Figure 4.21: Profil chromatographique de l'extrait des plantules témoins et stressées.....	90
Figure 4.22 Effets du stress s hydrique (A) et salin(B) sur l'activité des catalases ($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2.\text{mg prot}^{-1}\text{min}^{-1}$) an niveau des extraits de feuilles des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i>	94

Tableau 2.1 :Produits d'oxydations des acides aminés les plus sensibles[135][149][150]	22
Tableau2.2 :Produits d'oxydation des acides aminés aromatiques[135][149]	
[150].....	23
Tableau 2.3 : Les gènes codant les peroxyredoxines chez trois organismes modèles	
De plantes supérieures.....	34
Tableau 3.1 : Données écologiques des stations expérimentales où s'est effectuées la	
récoltes des fruits des 2populations d' <i>Atriplex halimus</i>	38
Tableau 3.2 : Tampon d'extraction des protéines.....	47
Tableau3.3 :Tampon Tris-SDS	47
Tableau 3.4 :Tampon de charge des protéines+DTT(x4) pour l'électrophorèse des	
protéines.....	48
Tableau 3.5 : Tampon de migration SDS-PAGE x10.....	48
Tableau 3.6 : Composition des gels de concentration d' acrylamide à 5% (m/v).....	49
Tableau 3.7 : Composition du gel de séparation d'acrylamide à 13% (m/v).....	49
Tableau 3.8 : Tampon de transfert SDS-PAGE x10.....	50
Tableau 3.9 . Solution de Rouge de Ponceau.....	50
Tableau 3.10 : Anticorps primaires utilisés au laboratoire et condition d'incubation.....	51
Tableau 3.11 : Tampon TBS-Tween (10X) et TBS.....	52
Tableau 3.12 : Tampon phosphate alcaline.....	52
Tableau 3.13 : Solution NBT.....	52
Tableau3.14 : Solution de BCIP.....	52
Tableau3.15 : composition du Tampon PBS Ph 7.4.....	53
Tableau 4.1 : Evolution de la teneur en MDA et H2O2 au niveau des feuilles d' <i>Atriplex</i>	
<i>halimus</i> en fonction de l'intensité du stress salin.....	67
Tableau 4.2 :Teneurs en polyphénols totaux , flavonoides au niveau des feuilles des	
plantules d' <i>Atriplex halimus</i>	67
Tableau 4.3 : Caractéristiques climatiques et types de sol	
des 2 régions :Djelfa et Laghouat.....	73

Tableau 4.4 : Effet d'un déficit hydrique sur le poids frais, le poids sec et la teneur relative en eau des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i>	74
Tableau 4.5 : Effet d'un traitement par le PEG 20% sur le poids frais ,le poids sec et la teneur relative en eau des deux populations.....	74
Tableau 4.6 : Effet d'un NaCL sur le poids frais, le poids sec des plantules des deux populations d' <i>Atriplex halimus</i>	75
Tableau 4.7 : Potentiel hydrique et osmotique des feuilles des 2 populations d' <i>Atriplex halimus</i>	76
Tableau 4.8 : Effet du stress salin sur l'accumulation de Na ⁺ et K ⁺ au niveau des feuilles des 2 populations d' <i>Atriplex halimus</i>	76

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Dans les zones arides et semi-arides, la salinité des sols et des eaux d'irrigation est l'un des principaux facteurs abiotiques qui limitent la productivité végétale et le rendement agricole [1]. Les conditions climatiques de ces écosystèmes sont caractérisées par une faiblesse et une forte irrégularité des précipitations], associées à une importante évaporation favorisant l'accumulation des sels dans le sol [2].

Certaines plantes ont cependant développé divers mécanismes de protection leur permettant de survivre et de croître dans ces conditions environnementales difficiles et réagissent à ces stress par de multiples mécanismes physiologiques.

Les Chénopodiacées représentent une famille d'halophytes hyperaccumulatrices très importante qui mérite une attention toute particulière. Cette famille de plantes halophiles est très répandue en Algérie et est utilisée pour l'alimentation humaine et animale, surtout dans les régions à climats aride et semi-aride. A cette famille appartiennent les genres *Atriplex* et *Spinacia* qui peuvent contribuer à la valorisation des sols marginaux et l'amélioration de la production végétale et animale. [3]

Les espèces d'*Atriplex* constituent un excellent fourrage pour le cheptel, notamment en périodes de disette dotées d'une biomasse aérienne et racinaire assez importante, elles constituent un outil efficace et relativement peu coûteux dans la lutte contre l'érosion, la salinisation et la désertification des sols, surtout en zones steppiques [3]

Les plantes répondent aux contraintes de l'environnement par de nombreux changements, révèlent le caractère multifactoriel des mécanismes de tolérance et d'adaptation aux stress abiotiques. La réponse aux stress abiotiques des espèces végétales, dépend de l'espèce même, de sa variété, du degré de sévérité du stress et du stade de développement de la plante [4]. En conditions stressantes, les plantes peuvent réagir en mettant en œuvre des mécanismes , entre autres, physiologiques [5] et biochimiques [6] impliquant des activités enzymatiques [7] [8]. Ainsi, par la synthèse de composés organiques et inorganiques ayant un rôle d'osmoprotecteurs tels que la proline [9], la glycine betaine est un ammonium quaternaire dont le niveau dans les cellules végétales est souvent corrélé avec le degré de tolérance des plantes au sel [10] ,les sucres solubles [11]. Ces composés protègent les macromolécules et les structures cellulaires [12]. Une des conséquences des contraintes osmotiques comme la salinité élevée est une production accrue d'espèces réactives d'oxygènes (ROS). Le stress salin et hydrique perturbent le métabolisme chloroplastique ce qui déclenche la production de ROS [13]. Les niveaux élevés en ROS altèrent par oxydation les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques [14] [15] [16]. Afin de minimiser le stress oxydatif les plantes ont développé un système antioxydant de nature enzymatique comme la

superoxyde dismutase(SOD), la catalase (CAT) et Ascorbate peroxydase (APX) [15]. L'augmentation de l'activité de ces enzymes est en relation avec la tolérance des plantes à la salinité [16]. Chez les halophytes, la liaison entre l'activité de ces enzymes et la tolérance des plantes à la salinité et d'autres stress a fait l'objet de nombreuses discussions [17] [18].

D'autres enzymes de faible masse moléculaire existent dans la très grande majorité des êtres vivants, notamment chez les végétaux chlorophylliens. Elles font partie de la famille des oxydoréductases à thiols, enzymes qui utilisent une ou plusieurs cystéines pour catalyser des réactions d'oxydoréduction engendrées par le stress oxydant (salinité, déficit hydrique, métaux lourds, pesticides, agents pathogènes). Elles jouent un rôle essentiel dans la protection des structures cellulaires chloroplastiques contre les stress environnementaux et qui comprend notamment les thiorédoxines, les peroxyredoxines et les méthionine sulfoxyde réductases[19]. Chez les halophytes peu de travaux ont contribué à la recherche de l'implication des thiols réductases dans les mécanismes de tolérance de ces espèces au stress salin.

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectif :

D'étudier le comportement d'une espèce halophyte autochtone *Atriplex halimus* L. en présence de différents stress abiotiques (stress salin et hydrique), afin de comprendre les mécanismes mis en jeu par la plante pour s'adapter à ces types de stress.

Pour cela 2 axes ont été développés.

Le premier vise à étudier les effets de la salinité sur les réponses physiologiques et biochimiques de cette espèce.

La deuxième partie de notre travail consiste à l'étude de la variabilité de réponse de 2 populations d'*Atriplex halimus* différentes par leur habitat soumises à un stress salin et hydrique et mettre en évidence par des approches biochimiques l'implication de certaines protéines antioxydantes (thiols réductases) dans la protection des structures cellulaires chloroplastiques contre le stress oxydant.

CHAPITRE 1 :

Présentation de la plante étudiée

CHAPITRE 1 : PRESENTATION DE LA PLANTE ETUDIEE

1.1 Généralités sur le genre *Atriplex*

Le genre *Atriplex* est le plus grand et le plus diversifié de la famille des *Chenopodiaceae* et compte environ 400 espèces réparties dans les régions tempérées, sub-tropicales et dans les différentes régions arides et semi-arides du monde. Il est particulièrement répandu en Australie où on peut déterminer une grande diversité d'espèces et de sous-espèces. Le genre *Atriplex* inclut 48 espèces et sous espèces dans le bassin méditerranéen [20].

On trouve également des exemplaires de ce genre dans les régions polaires, bien qu'en nombre très réduit. Généralement, il est associé aux sols salins ou alcalins et aux milieux arides, désertiques ou semi-désertiques [21]. Ce genre comprend surtout des plantes herbacées vivaces et, plus rarement, des arbres et des arbustes. Les *Atriplex* sont des plantes halophytes dotées d'une série de caractères écologiques et physiologiques permettant la croissance et la reproduction dans un environnement salin [20]. Elles sont donc en mesure de vivre sur des sols au taux élevé de sels inorganiques. Souvent, il s'agit de composants dominants des marécages salés et, vu que les sols salins sont typiques des milieux arides, de nombreuses espèces présentent également des adaptations xérophytiques.

La fleur, dont la morphologie est souvent utile pour l'identification, est enveloppée de deux bractéoles, d'une consistance généralement foliacée, qui permettent de distinguer les espèces en fonction de leur forme et même si elles se présentent ou non soudées les unes aux autres. [21].

Les espèces du genre *Atriplex* sont caractérisées par le haut degré de tolérance à l'aridité et à la salinité et par leur capacité de procurer des fourrages riches en protéines et en carotène. Par ailleurs, elles ont la propriété de produire une abondante biomasse foliaire et de la maintenir active durant les périodes défavorables de l'année.

Le genre *Atriplex* appartient au groupe des plantes en mesure de fixer le CO₂ par biosynthèse C₄. De nombreuses recherches ont démontré que ce type de plantes est caractérisé par une grande productivité, une résistance au déficit hydrique, une capacité particulière d'utiliser l'énergie lumineuse et un métabolisme qui exige du sodium comme élément essentiel. Pratiquement toutes les espèces appartenant au genre *Atriplex* sont dioïques; il existe cependant des arbustes monoïques [21].

1.2 Description et systématique de l'espèce

D'après CHADEFAUT *et* EMBERGER (1960) [22], la classification de l'espèce *Atriplex halimus* L. dans le règne végétal est la suivante:

Règne Végétal

Embranchement : Spermaphytes (Phanérogames)

Sous-embranchement: Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous-classe : Apétales

Ordre : Centrospermales

Famille : Amaranthaceae (Chenopodiaceae)

Genre : *Atriplex*

Espèce : *A. halimus* L. (Noms usuels : Guetaf, Salt bush mediterranean, Arroche, Pourpier de mer)

L'*Atriplex halimus* L. est un arbuste natif d'Afrique du Nord où il est très abondant. Il s'étend également aux zones littorales méditerranéennes de l'Europe et aux terres intérieures gypso-salines d'Espagne. *Atriplex halimus* est un arbuste de 1 à 3 m de haut, très rameux, formant des touffes pouvant atteindre 1 à 3 m de diamètre. Les feuilles sont alternes, pétiolées, plus au moins charnues, luisantes, couvertes de poils vésiculeux blanchâtres (trichomes), ovales, assez grandes et font 2 à 5 cm de longueur et 0,5 à 1 cm de largeur. (figure 1.1) L'inflorescence est monoïque, en panicule d'épis, terminale et nue. Les inflorescences portent souvent des fleurs mâles au sommet et des fleurs femelles à la base. La floraison - fructification se déroule de mai à Décembre. La valve fructifère est cornée à la base. La graine est d'une teinte roussâtre [23] [24]. C'est une espèce très polymorphe. Le polymorphisme de cette espèce semble lié à sa diversité d'habitat impliquant vraisemblablement une forte adaptabilité de la plante à son milieu naturel [21]. Le système racinaire pivotant présente un fort développement pouvant atteindre 10 mètres de profondeur [25]. L'espèce *Atriplex halimus* présente deux sous-espèces distinctes qui diffèrent par leur morphologie (densité de feuillage et longueur des rameaux florifères) et leur loge écologique, *Atriplex halimus* L. subsp. *halimus*, et *Atriplex halimus* L. subsp. *schweinfurthii* Boiss.

Il existe de nombreuses populations de cette dernière à l'état pur ou associées avec d'autres espèces halophytes comme *Suaeda* sp. et *Salsola* sp., réparties généralement dans les zones salées Algériennes (Chotts Hodna, Skhouana, Melghigh, Zehrez chergui et gherbi) [26].

A



B



Figure 1.1 (a) Arbuste d' *Atriplex halimus* L.

(b): Rameau feuillu avec inflorescence et fruit [27]

CHAPITRE 2 :
Les effets des
stress abiotiques
sur les végétaux

CHAPITRE 2 :

LES EFFETS DES STRESS ABIOTIQUES SUR LES VEGETAUX

2.1. Le déficit hydrique

2.1.1 Le déficit hydrique chez les plantes

2.1.1.1 La relation eau- plante :

L'eau est un élément vital pour la croissance et le développement des cultures. Sa nécessité est prouvée par de multiples observations comme le flétrissement et la mort des plantes laissées sans eau, d'où l'importance de l'irrigation [28]. L'eau n'est pas seulement un moyen presque inactif de remplissage des organes de la plante pour le maintien de son port mais c'est aussi un moyen de transport et de dissolution des éléments nutritifs solubles entre les coiffes racinaires et la partie aérienne. L'eau joue également un rôle de régulateur thermique des limbes par son passage de la forme liquide en vapeur [29].

2.1.1.2. Définition du déficit hydrique:

On parle de déficit hydrique chez une plante lorsque l'absorption est incapable de satisfaire la demande de la transpiration [30]. D'un point de vue physique, le déficit hydrique résulte de l'abaissement en dessous d'une certaine valeur du potentiel hydrique de la plante , l'eau disponible à la plante tend à être limitante dont l'importance conduit à une déshydratation cellulaire, qui serait néfaste au développement de la plante, car ils affectent les processus métaboliques tels que la photosynthèse [30].

2.1.1.3. Les effets du déficit hydrique sur les plantes :

2.1.1.3.1. Effet du déficit hydrique sur la croissance cellulaire :

Le manque d'eau dans l'environnement entraîne rapidement un ralentissement de la croissance des cellules de la plante. En effet, la croissance cellulaire est un processus dépendant de la turgescence, c'est-à-dire de la pression exercée par l'eau dans la cellule. Comme le déficit hydrique entraîne une diminution de la turgescence, il provoque aussi une inhibition des mécanismes de divisions, d'élongation et de différenciation cellulaire, notamment au niveau du système foliaire [31] ,[32] .

La déshydratation cellulaire entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en sels et divers composés toxiques. Ces composés toxiques à des concentrations

élevées agissent directement au niveau des sites actifs de certaines enzymes et perturbent leurs activités. Une telle inhibition est mise en évidence pour de nombreuses enzymes clés du métabolisme telles que la Rubisco, la saccharose phosphate synthase, la phosphoénol pyruvate, carboxylase [30].

2.1.1.3.2. Effet du déficit hydrique sur l'activité photosynthétique :

La photosynthèse est un processus complexe au cours duquel les plantes contenant de la chlorophylle synthétisent de la matière organique à partir du gaz carbonique et d'eau. [33]. L'activité physiologique d'une plante soumise à un stress hydrique se caractérise par une diminution de l'activité photosynthétique provoquée par la diminution de l'absorption de CO₂ et de la transpiration. La photosynthèse est le mécanisme par lequel les plantes chlorophylliennes utilisent une partie de l'énergie solaire pour fabriquer l'énergie chimique (sucre) à partir du gaz carbonique de l'air et de l'eau, et elle se déroule dans les chloroplastes [34]. La diminution de la photosynthèse, liée à la diminution de la teneur relative en eau et du potentiel hydrique foliaire, est due essentiellement, à la réduction de la pénétration du CO₂, limitée par une fermeture des stomates, avec pour conséquence une augmentation de la résistance de la feuille à la diffusion du CO₂ [35].

Les capacités photosynthétiques ne sont affectées qu'en condition de déficit hydrique intense de plus, des plantes soumises à une période de manque d'eau présentent une thermotolérance accrue au niveau du fonctionnement du photosystème II [36].

2.1.1.3.3. Effet du déficit hydrique sur la déstabilisation des membranes :

En condition de déficit hydrique, de nombreuses perturbations structurales apparaissent au niveau de la paroi cellulaire et des membranes plasmiques, des organites subcellulaires (plastides, mitochondries). Dans les conditions de déficit hydrique intense, la composition en lipides totaux est modifiée [37], en particulier celles des membranes plasmiques et thylacoidiennes [38][39][40]. Ces modifications perturbent les propriétés physico-chimiques des membranes, créent des changements de fluidité et de perméabilité tout en affectant le fonctionnement des protéines associées aux membranes (canaux ioniques, enzymes membranaires). En condition de stress extrême, une déstabilisation très marquée des membranes est observée, elles perdent alors leurs fonctions de barrière et d'échange [41].

2.1.2 Les différentes formes de réponses des plantes au stress hydrique :

2.1.2.1. Les mécanismes d'adaptation et de tolérance des plantes face au stress hydrique:

Afin de lutter contre le risque de dessèchement, les plantes ont recours à des comportements qui leur permettent de survivre à des situations de déficit hydrique par des méthodes d'adaptations. Ces méthodes leur permettent de préserver l'intégrité de leurs fonctions physiologiques et de leur rassurer un état productif et de survie [42] .

2.1.2.2. Les mécanismes d'adaptation phénologiques, physiologiques et morphologiques

2.1.2.2.1. L'évitement ou contournement:

L'évitement « ou tolérance par maintien d'un potentiel hydrique élevé » : cette stratégie consiste, pour la plante, à maintenir un état hydrique interne satisfaisant en présence d'une contrainte hydrique externe. Pour conserver un potentiel hydrique élevé, la plante contrôle les flux d'eau entrant au niveau des racines et sortant au niveau de la feuille. Ceci peut être obtenu par une réduction de la transpiration grâce à une fermeture rapide des stomates et par une optimisation de l'absorption de l'eau par les racines, notamment grâce à un système racinaire profond [43].

2.1.2.2.2. L'esquive :

La plante agit sur la durée de son cycle végétatif pour échapper à la contrainte hydrique en réalisant son cycle végétatif en dehors de la période de sécheresse [44]

La stratégie d'esquive la plus efficace consiste à éviter les cultures d'été. La demande climatique estivale est environ deux fois supérieure à celle du printemps. La quantité d'eau nécessaire pour garder les stomates ouverts est donc plus grande en été. Une autre stratégie efficace consiste à planter des espèces ou génotypes à cycle cultural court, qui peuvent se développer avant les périodes les plus stressantes. Ce raccourcissement du cycle se traduit aussi par une réduction de la photosynthèse cumulée et donc du rendement potentiel .Ce mécanisme représente l'ensemble des paramètres phénologiques d'adaptation qui caractérise la précocité chez les céréales à pailles cultivés en zones méditerranéennes (Blé, Orge, Avoine) la brevété du cycle des cultures pluviales des zones tropicales sèches (Sorgho, arachides) sont des mécanismes qui ont été largement exploitée par les agriculteurs et sélectionneurs.[45]

2.1.2.2.3. Tolérance à la dessiccation :

Elle est liée à la capacité plus au moins du génotype à maintenir intacte ses structures et fonctions [46]. C'est l'aptitude qu'à la membrane cytoplasmique de retenir les électrolytes donc à conserver son intégrité [47]. De plus une baisse du contenu cellulaire en eau provoque une déshydratation qui sera irréversible au-delà d'un niveau de dessiccation [46]. Alors la plante durant sa résistance, maintien t'elle, aussi sa translocation. Selon GATE (1995)[46], l'ajustement du potentiel osmotique résulte de l'accumulation de molécules solubles. Cette accumulation permet le maintien de la turgescence cellulaire et facilite les processus physiologiques et biochimiques de la plante [48] ; permettant ainsi, de maintenir l'expansion foliaire, indispensable à une bonne assimilation de CO₂ [49].

Les osmolytes dont l'accumulation est responsable de l'ajustement sont des ions minéraux (Na⁺, K⁺ et Cl⁻), des sucres solubles (saccharose, glucose, fructose), des acides organiques (malate, citrate, lactate) et des composés d'azote quaternaire comme la glycine betaine ou la proline [49]. Monneveux et Nemmar (1986)[50] ont pu établir un classement des variétés de blé dur selon leur teneur en proline et leur résistance à la sécheresse, les accumulations les plus importantes sont connues chez les variétés les plus résistantes.

Blum et Ebercon (1976) [51] notent qu'il existe une relation entre la capacité d'accumulation de la proline et l'aptitude de récupération de la plante à l'issue du déficit hydrique et suggèrent que l'acide aminé sert de source d'énergie lors du retour aux conditions normales. La proline ne semblerait pas jouer un rôle direct dans l'ajustement osmotique, elle serait plutôt un symptôme de souffrance [52] .

Chez la plupart des plantes herbacées, la combinaison des deux modes d'adaptation à la sécheresse (évitement et tolérance) détermine le potentiel de survie en conditions de sécheresse [53]

2.1.2.3. Les mécanismes biochimiques :

2.1.2.3.1. L'ajustement osmotique :

L'ajustement est une réponse active, qui ne correspond pas à la simple concentration des molécules résultant de la perte en eau. Dans la vacuole, l'ajustement est essentiellement effectué par accumulation d'ions potassium. Ceci implique des circulations d'ions à travers les membranes de la cellule, il s'agit d'une adaptation qui se repose sur la biosynthèse de différentes substances organiques régulées par des canaux et des transporteurs de potassium et de sodium [54]. De fortes concentrations

en ions seraient toxiques pour le cytoplasme et les organelles. L'ajustement y donc effectué via l'accumulation de solutés compatibles avec la vie de la cellule, ou osmoprotectant : proline , glycine betaïne, polyols (mannitol, sorbitol, D-ononitol), tréhalose, glucose, fructose, saccharose, fructane ([55] .

2.1.2.3.2. Synthèse d' osmoprotectants :

a). La Proline :

La proline représente l'une des manifestations les plus remarquables des stress hydriques et osmotiques. Son rôle d'osmoprotectant a été rapporté par de nombreux auteurs [56] [57]. Ces auteurs proposent de l'utiliser comme critère de tolérance de l'orge à la sécheresse. Aussi elle possède un rôle majeur dans la structure des protéines.

Plusieurs facteurs induisent l'accumulation de la proline entre autres l'éclairement [58], le froid [59], les hautes températures [60] et le stress hydrique [61]. Cette accumulation est soumise à des contraintes physiques a fait l'objet de nombreuses études et a même été préconisée par plusieurs auteurs comme test précoce de sélection pour la tolérance au déficit Hydrique [62] .La proline est synthétisée à partir de l'acide glutamique par l'intermédiaire de l'acide semi aldéhyde dont la cyclisation donne l'acide pyrroline carboxylique qui se réduit en proline[63] (figure2.1) Le P5C contrôle la synthèse de cet acide aminé. L'utilisation des marqueurs radioactifs ^{14}C , montre que le précurseur principal de cette accumulation, est le glutamate chez les plantes stressées [64].

Plusieurs polyols, tel que le pinitol, le glycérol, le mannitol, le sorbitol s'accumule dans les cellules végétales soumises à un stress abiotique. Leur accumulation chez les plantes ne semblent avoir lieu que dans les tissus différenciés [65].Le mannitol est le sucre-alcool le plus répandu chez les végétaux [66].Il fait partie des solutés compatibles qui s'accumulent en grande quantité dans la cellule en condition de stress osmotique, et pourrait mimer l'action de l'eau, grâce à ces groupements hydroxyles en maintenant une sphère artificielle d'hydratation autour des macromolécules [67]. Outre sa fonction de soluté compatible, le mannitol semble également impliqué dans la détoxification des espèces oxygènes activées (EAO) .Ainsi, la surexpression de la mannitol-1-phosphate déshydrogénase bactérienne dans les chloroplastes de tabac conduit à une accumulation de mannitol dans les chloroplastes [68]. Par ailleurs, il joue un rôle direct dans la protection des enzymes qui contiennent un groupements thiols.

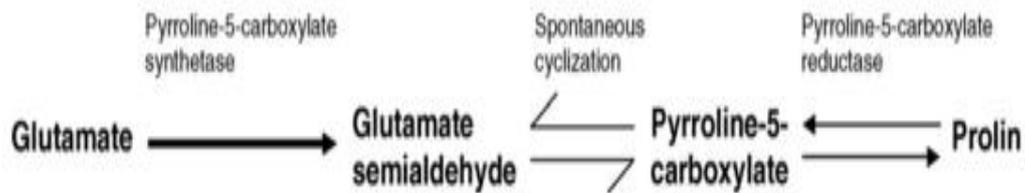


Figure 2.1 : voies de Biosynthèse de la proline chez les végétaux supérieurs[63]

b). Les Bétaines:

Les Bétaines sont des composés ammoniums à petites molécules, non toxique jouant un rôle majeur dans l'ajustement osmotique du cytoplasme des plantes en réponses au stress hydrique [69]. Se sont des composés ayant des propriétés d'osmorégulations très marquées. Leur niveau d'accumulation dans les feuilles des plantes stressées est deux à dix fois supérieur à celui des non stressées [70] [71].

Parmi les composés ammonium quaternaires qui s'accumulent chez les plantes supérieures : il y a la glycine bétaine, la choline-O-sulfate. La plupart sont méthyles, La glycine bétaine est une amine quaternaire qui est présentée chez les plantes supérieures les micro-organismes et les animaux [72]. La perturbation de la structure des protéines est causée par la mise en contact avec des solutés non compatibles aux forces thermodynamiques de contact minimales recherchées par les protéines lors du repliement tertiaire et l'assemblage quaternaire [73]. Son rôle de protection s'opère par stabilisation de la structure quaternaire de ces protéines et par ajustement de l'équilibre osmotique du cytoplasme afin d'assurer le maintien de la quantité d'eau à l'intérieur de la cellule.

La synthèse de la glycine bétaine dans le chloroplaste des plantes débute par la conversion d'une choline en bétaine aldéhyde par la choline mono oxygénase (figure 2.2) [74]. Une étude récente a montré que l'expression de certains membres d'aldéhydrogénase était induite en condition de stress osmotique [75].

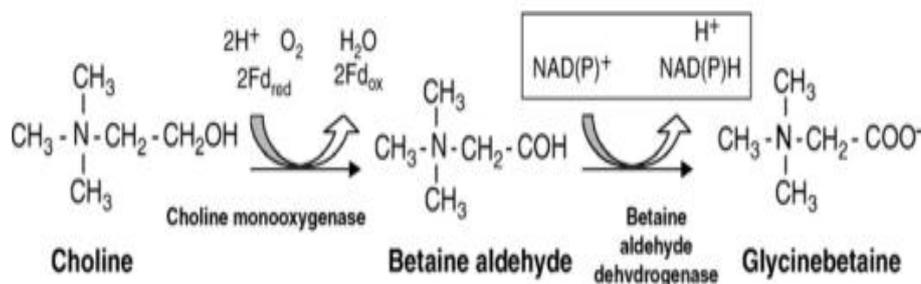


Figure 2.2 : Voies de biosynthèse de la glycinebétaine chez les végétaux supérieurs [76]

c). Les sucres et leurs dérivés les polyols :

D'après Bensari et al., 1990 [77] Lors d'un déficit hydrique, les réserves amyliques sont progressivement utilisées et pourraient être un facteur de tolérance au manque d'eau. Lorsque la contrainte hydrique cesse, la feuille reconstitue les réserves d'amidon et si une nouvelle contrainte hydrique intervient, le temps d'adaptation est plus court. Beaucoup d'auteurs ont mis en évidence le rôle protecteur des sucres solubles dont le saccharose, glucose, fructose sur les membranes, en particulier mitochondriales [78]. Leur présence permettrait le maintien des réactions de phosphorylation et de production d'énergie. Outre ce rôle protecteur des membranes, les hydrates de carbone protègent les processus par les quelles les enzymes sont synthétisés, ce qui impliquerait une meilleure tolérance de la plante à la dessiccation et une meilleure résistance à la sécheresse [78].

2.2 Le stress salin chez les végétaux

Des concentrations élevées en sel dans la rhizosphère provoquent un stress chez les plantes et entraînent des modifications dans leur physiologie. Dans le cas d'un stress salin, une double problématique se pose à l'organisme végétal. D'un côté, la présence de sels solubles, en diminuant le potentiel hydrique du sol, limite l'approvisionnement en eau de la plante.

De l'autre côté, l'absorption de sels dans les tissus menace le bon fonctionnement physiologique des cellules [79]. Face à ce danger, toutes les plantes ne sont pas égales. Certaines nommées glycophytes, ne sont pas capables de supporter la présence de sels solubles en forte concentration.

Les halophytes, au contraire, ont développé des réponses physiologiques pour assurer leur approvisionnement en eau tout en préservant leur métabolisme en milieu riche en sels solubles [80].

La tolérance des végétaux à la salinité correspond à leur aptitude à vivre en présence de sels solubles sans que leur croissance et leur développement ne soient perturbés [81].

De nombreux mécanismes physiologiques et biochimiques rentrent en jeu pour permettre aux végétaux de résister à un stress salin provoqué par la présence d'un excès de sels solubles dans la solution du sol. Les principaux mécanismes généralement évoqués sont la compartimentation vacuolaire, ajustement ionique, le contrôle membranaire et l'ajustement osmotique.

2. 2.1. La compartimentation vacuolaire

Celle-ci consiste à évacuer du cytoplasme les ions Na^+ en excès vers la vacuole afin d'éviter leur effet toxique et inhibiteur à l'encontre des processus enzymatiques [82]. Ce mécanisme de compartimentation vacuolaire est assuré par l'action d'un antiport vacuolaire sodium/proton (Na^+/H^+) dont l'énergie est fournie par les pompes à protons ATPases (H^+ -adénosine triphosphatases) et ATPases (H^+ -pyrophosphatases) vacuolaires [83]. Ainsi, grâce à ce processus de compartimentation de sodium au sein de la vacuole, la cellule parvient à maintenir une faible concentration de sodium dans le cytoplasme, minimisant ainsi son effet toxique; et d'autre part, l'augmentation concomitante de la concentration de sodium dans la vacuole va engendrer une forte pression osmotique qui va favoriser l'absorption d'eau et donc améliorer la turgescence des cellules [84] [85]. Chez les plantes de type « incluser », les flux de sodium sont essentiellement ascendants, et le sel est accumulé dans les parties aériennes au niveau des vacuoles. Par contre, chez celles de type « excluser », la plus grande partie du sodium absorbé et véhiculé vers les feuilles est réexportée vers les racines via le phloème [86] [87] ou initialement stockée dans les racines (Figure 2.3). La compartimentation du NaCl dans les vacuoles représente le mécanisme principal de détoxification du sel chez les halophytes [88][89], tandis que les glycophytes ont recours au mécanisme d'exclusion du sodium des cellules (au niveau de la membrane plasmique) des parties aériennes vers les racines [90] [91] [92].

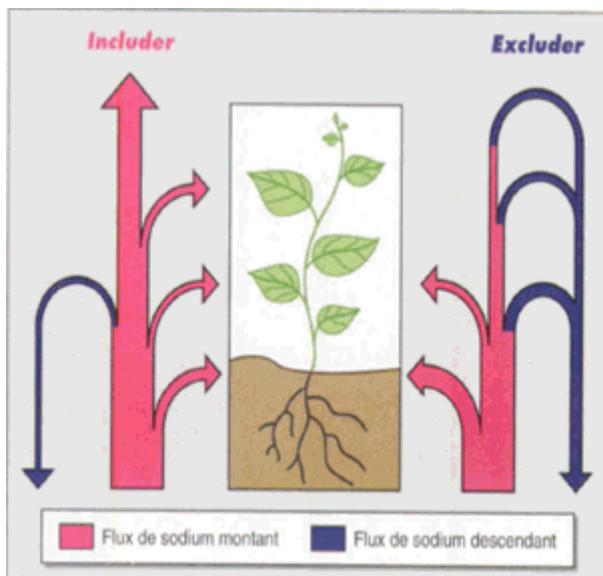


Figure 2.3 Schématisation du bilan de la circulation du sodium dans les plantes de type *includeur* ou *excluteur* [86]

Chez les plantes de type *includeur*, les flux de sodium sont essentiellement ascendants (en rose) et le sel est accumulé dans les parties aériennes.

Chez celles de type *excluteur*, la plus grande partie du sodium véhiculé vers les feuilles est réexporté vers les racines via le phloème (en bleu). Les intensités relatives des flux sont symbolisées par la largeur des traits [86]

Chez les halophytes, l'activité de l'antiport vacuolaire Na^+/H^+ est généralement induite par les concentrations élevées de NaCl , tel le cas de *Mesembryanthemum crystallinum* L. après un traitement salin [93] [94]. Par ailleurs, les halophytes utilisent ce mécanisme de compartimentation de sodium dans la vacuole afin de pouvoir générer un potentiel osmotique au sein des cellules, nécessaire à l'absorption de l'eau au niveau des sols salés. Ainsi, l'accumulation du sodium dans le compartiment vacuolaire semble avoir un double rôle, celui de la protection du cytoplasme contre la toxicité du sodium et celui de son utilisation en tant qu'osmoticum dans la vacuole [95] [96].

2.2.2 Ajustement ionique

L'augmentation des concentrations vacuolaires de sodium induit la nécessité et le besoin d'élever la pression osmotique des autres compartiments cellulaires afin de maintenir leur volume [97]. Quoique la synthèse et l'accumulation de composés solubles compatibles contribue au maintien de la croissance cellulaire en conditions de stress ionique, les plantes ont développées d'autres moyens non moins efficaces tels que l'ajustement

ionique afin de réduire et d'équilibrer la concentration d'ions dans le but d'ajuster la pression osmotique au niveau du cytoplasme [98]. Ce dernier objectif peut être assuré par une augmentation des concentrations de potassium, outre celle des composés osmotiques compatibles [99]. En outre, le potassium joue un rôle également dans le contrôle de la turgescence cellulaire [100]. Afin de préserver les réactions métaboliques et de maintenir un rapport K/Na viable, les cellules végétales doivent ajuster leur teneur en potassium entre 100 et 200 mmol/L [101]. Le rapport K/Na va dépendre de l'action conjuguée des différents systèmes de transport situés au niveau des membranes plasmiques et vacuolaires et impliquant les voies plus ou moins sélectives des ions K⁺ et Na⁺[97];

Deux classes de transporteurs sont impliquées dans l'absorption des ions K⁺ et Na⁺ :

- Les transporteurs à forte affinité pour le potassium (famille KUP-HAK : « K⁺ uptake transporter – high affinity K⁺ uptake transporter »),
- Les transporteurs à faible affinité pour les cations (HKT1 : « high affinity K⁺ transporter » et LCT1 : « low affinity cation transporter »)

2.2.3. Stratégie osmotique

2.2.3.1 La proline

Les teneurs en proline s'accroissent rapidement chez de nombreuses mono- ou dicotylédones soumises à un stress salin [102][103][104]. Cette augmentation de la concentration de proline cytoplasmique est consécutive à la stimulation de sa synthèse, résultant d'une élévation des quantités des messagers codant pour l'enzyme qui convertit le glutamate semi-aldéhyde en proline. Il existe deux voies de biosynthèse de la proline chez les plantes, celle de l'ornithine et celle du glutamate.

Cette dernière semble être prédominante sous conditions de stress [105]. Il semble que la stimulation de la synthèse de proline soit parallèle à une activation globale d'une voie métabolique partant du glutamate semi-aldéhyde et conduisant à la proline, mais aussi aux polyamines, via l'ornithine et l'arginine [96]. La proline agit en tant que composé soluble compatible dans l'ajustement osmotique pouvant atteindre de fortes concentrations sans exercer d'effet toxique comme le cas des ions [106] [107]. En plus du rôle osmotique attribué à la proline, celle-ci intervient dans la détoxification des formes actives d'oxygène [108] [109] et la stabilisation des protéines [110] [111] protégerait l'intégrité de la membrane plasmique, l'ATP au niveau de la chaîne respiratoire [111]. L'accumulation de la proline chez diverses espèces de plantes stressées a été corrélée à leur capacité de tolérance, et sa concentration est généralement plus élevée chez les plantes tolérantes que les plantes sensibles [109].

2.2.1.3.2. Les bêtaïnes

Les bêtaïnes sont des composés quaternaires d'ammonium (QACs) qui fonctionnent en tant qu'osmolytes compatibles efficace chez les plantes soumises au stress salin .La betterave est à l'origine du nom bêtaïne, car elle en contient des quantités importantes. Les bêtaïnes, qui ont la particularité d'être méthylées, sont issues soit de la proline, soit d'autres acides aminés [112]. Elles interviennent au niveau de l'ajustement osmotique, de l'osmorégulation et de la protection des enzymes[113].

En cas de stress salin, on considère que l'intensification du métabolisme de la choline (précurseur de la glycine bêtaïne) peut participer au maintien des flux transmembranaires, par un renouvellement plus intense de la phosphatidylcholine, choline phosphorylée qui est la composante majeure des membranes cellulaires [97]. En cas de stress salin, on considère que l'intensification du métabolisme de la choline (précurseur de la glycine bêtaïne) peut participer au maintien des flux transmembranaires[114]. La glycine bêtaïne est principalement présente au niveau des chloroplastes où elle joue une fonction vitale dans la protection des membranes thylakoïdes et par conséquent dans le maintien de l'efficacité photosynthétique [115] et aussi dans l'osmoprotection en stabilisant les macromolécules et en préservant les membranes sous stress [116] .

2.2.1.3.3. Sucres solubles

La synthèse des sucres, est stimulée par le stress salin chez de nombreuses espèces soit par blocage de la glycolyse ou par hydrolyse de l'amidon [117]. Les sucres stabilisent les structures protoplasmiques, en prenant la place de l'eau liée aux protéines sensibles, grâce à la présence de leurs radicaux OH, ils maintiennent ainsi la structure des édifices protéiques [118]. Leur présence permet la protection des processus de synthèse des enzymes et le maintien des réactions de phosphorylation et de la production de l'énergie [119]. Les sucres solubles auraient un rôle majeur dans l'ajustement osmotique, leur participation à l'abaissement du potentiel osmotique en conditions de stress salin à été mise en évidence des chevelus racinaires [120]. Selon Fernandes et al. (2004) [121]. l'accumulation accrue du saccharose est due principalement à sa synthèse à partir du glucose via l'enzyme saccharose phosphate synthétase (SPS)

Le glucose est le sucre majoritairement accumulé dans les feuilles des plantes soumises au stress salin [122]. Le tréhalose est considéré comme étant le sucre le plus efficace en terme d'osmoprotection et en terme de minimum de quantité requise pour obtenir un effet positif [123].

Il protège les membranes et les protéines chez les cellules exposées au stress salin et hydrique [124].

2.3. Les antioxydants et protéines de détoxications

Les variations de l'environnement auxquelles sont sujets les végétaux les contraignent à posséder une forte capacité d'adaptation. Lorsque ces changements sont trop brutaux, ils peuvent provoquer l'apparition d'un stress oxydant caractérisé par la formation d'espèces actives de l'oxygène (EAO). Ce stress peut ainsi provenir de facteurs abiotiques, par exemple dans le cas d'un stress lumineux, d'une sécheresse, d'un stress salin, d'une exposition au froid, à la chaleur ou aux UV, ou de conditions d'hypoxie [125]. Il peut également être de nature biotique comme l'attaque par des insectes et des animaux, ou par des micro-organismes pathogènes tels des virus, des bactéries des champignons. Ces facteurs étrangers à la plante vont bouleverser son métabolisme, conduisant à la formation de composés réactifs qui peuvent induire différentes réactions de la plante [126].

2.3.1. Photosynthèse et production d'espèces actives de l'oxygène

Les organismes photosynthétiques se caractérisent par leur capacité à convertir l'énergie lumineuse en énergie chimique. Le chloroplaste siège de la photosynthèse chez les végétaux supérieurs permet aux cellules de fabriquer l'énergie nécessaire à leur métabolisme. Le processus photosynthétique fait intervenir principalement un transfert linéaire d'électrons du photosystème II (PSII) au PSI vers la molécule accepteuse, le NADP⁺. L'oxygène moléculaire (O₂) est une molécule clé dans ce processus puisqu'il est produit durant le transfert durant le processus de photolyse de l'eau au niveau du PSII qui permet d'alimenter la chaîne d'électrons. Cependant, cette molécule peut être à l'origine d'espèces actives de l'oxygène (EAO) [127] et le chloroplaste est considéré comme un site majeur de production des EAO chez les plantes, du fait de la plus grande pression en dioxygène dans cette organite [128]. En effet, le métabolisme chloroplastique est très sensible aux variations du milieu extérieur. Par exemple, un déficit hydrique entraîne une diminution de la concentration du CO₂ disponible pour le cycle de Calvin suite à une fermeture des stomates [129]. Il résulte de ces perturbations un excès d'énergie lumineuse absorbée par rapport à la capacité d'utilisation des systèmes consommateurs du pouvoir réducteur [130]. L'excès d'énergie peut alors être dévié vers la réduction de l'oxygène moléculaire et le convertir en oxygène singulet (¹O₂), quatre étapes de réduction monoélectronique le convertissent en anions superoxyde (O₂⁻), en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en radical hydroxyle (OH[•]), puis en eau (figure 2.4). Ces EAO, à fort pouvoir oxydant, sont principalement formées lors de la phase lumineuse au niveau des photosystèmes (figure 2.5)

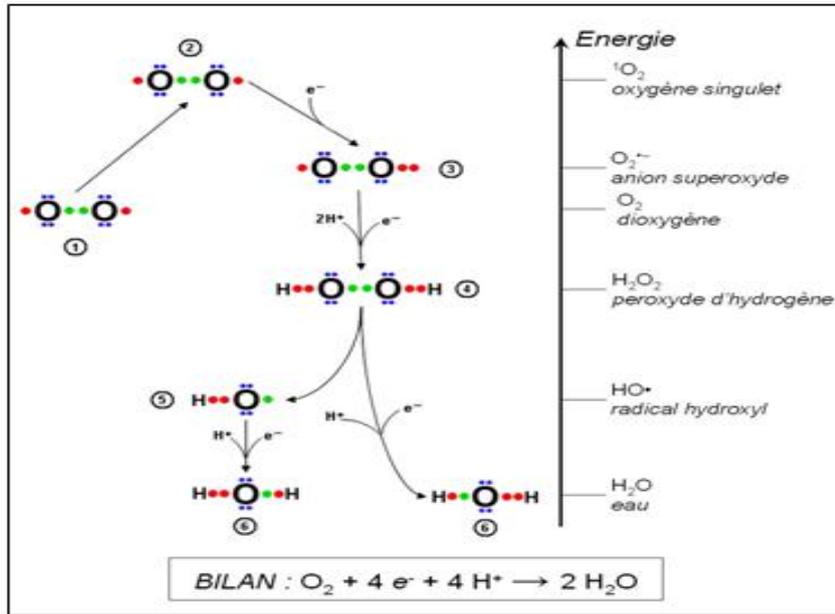


Figure 2.4: Les différents EAO et leur formation ;Les électrons liants sont représentés en rouge et en vert et les non liants en bleu .L'oxygène moléculaire est majoritairement sous forme de triplet (1) . L'absorption d'énergie lumineuse le fait passer sous forme singulet (2), modifiant ainsi la configuration électronique externe. Quatre étapes de réduction mono-électronique le convertissent en anion superoxyde (3), en peroxyde d'hydrogène (4) en radical hydroxyle (5) puis en eau (6) [134]

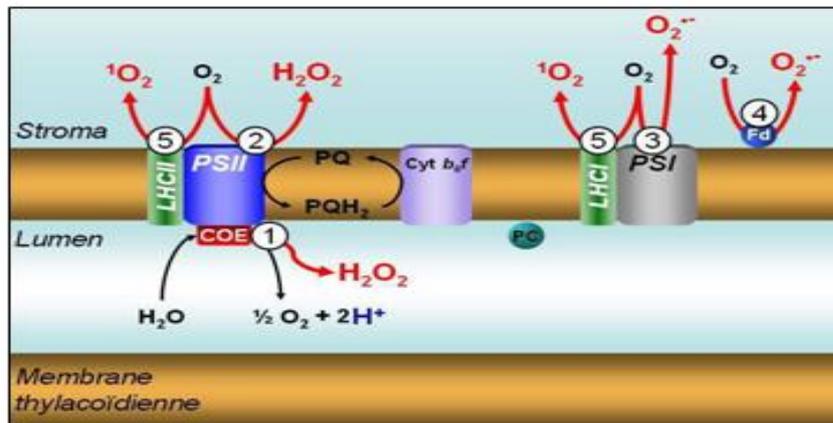


Figure 2.5: Sites de génération d'EAO dans la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons. Les EAO sont formées au niveau du complexe de dissociation de l'eau (1), aux sites accepteurs du PSII (2) et du PSI (3), au niveau de la ferrédoxine réduite (4) et au niveau des antennes collectrices d'énergie (5) [135],[134].

PS : Photosystème, PQ : Plastoquinone, Pc :Plastocyanine, cyt :cytochrome,Fd : ferrédoxine,FNR : ferrédoxine-NADP réductase, P680 et P700 : centres réactionnels

2.3.2. Effet des EAO sur la cellule végétale

Les EAO se différencient par leur réactivité et leur diffusion, ainsi le radical ($\text{OH}\cdot$) est très réactif, mais diffuse mal, créant principalement des dommages sur son lieu de production. A l'inverse, le superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) diffuse plus facilement du fait de sa réactivité. Pour faire face à la génération constante de ces formes pro-oxydantes, les êtres vivants ont développé des systèmes anti-oxydants. En conditions optimales de croissance, il existe un équilibre entre la formation et l'élimination de ces espèces.(figure2.6). Il est important de noter que les EAO sont impliquées dans les processus fondamentaux pour les organismes tels que la signalisation [131].

En revanche si les conditions environnementales sont néfastes, un déséquilibre entre la production des EAO et les systèmes antioxydant se produit. On parle alors de stress oxydant qui est défini comme une perturbation de cet équilibre aboutissant à une quantité accrue d'EAO qui deviennent alors néfaste, car responsable de dommages sur les macromolécules et perturbent le métabolisme [127]. En effet les EAO se caractérisent par leur capacité à oxyder toutes les macromolécules et réagissent avec les différents composants cellulaires en fonction de leur capacité de diffusion et leur réactivité. L' $\text{OH}\cdot$ est l'EAO la plus nocive. Ce radical endommage l'ensemble des constituants cellulaires (ADN, protéines, lipides).

La formation de radicaux libres instables à partir des acides gras insaturés peut entraîner des dommages sévères aux membranes [132]. L' H_2O_2 réagit notamment avec l'atome de soufre présent dans les résidus cystéines et méthionine. D'autres acides aminés sont modifiés au niveau de leur liaison peptidique et des chaînes latérales, pouvant ainsi provoquer un changement de conformation ou d'activité des protéines [133]. La réparation des protéines est détaillée par la suite.

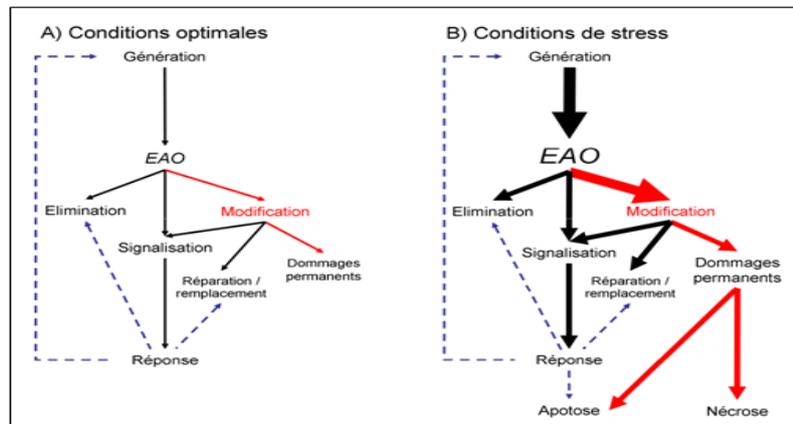


Figure 2.6: Les conséquences de la production d'EAO en conditions optimales de croissance (A) et lors de conditions de stress (B). La flèche entre « modification » et « signalisation » signifie que certaines molécules modifiées agissent comme messagers secondaires de la signalisation. Les flèches rouges correspondent aux actions des EAO sur les macromolécules et les flèches bleues en pointillés aux réponses génétiques [134] [136]

2.3.2. Les mécanismes de lutte contre le stress oxydant

2.3.2.1 Evitement de la production des EAO

Afin de limiter l'accumulation des EAO, les plantes ont développé des stratégies pour empêcher une formation excessive des radicaux. Les mécanismes réduisant l'absorption de l'énergie lumineuse, Les plantes peuvent orienter leurs feuilles de manière parallèle au rayonnement incident [137] et se protègent des effets néfastes d'une intensité lumineuse excessive. Un autre système permet d'empêcher la génération des EAO en absorbant l'énergie en excès au niveau de la chlorophylle par des pigments photoprotecteurs comme les caroténoïdes [138].

2.3.2.2. La détoxification des EAO

Chez les plantes, les EAO sont produits en permanence et résultent des sous-produits métaboliques de diverses voies localisées dans différents compartiments cellulaires [139]. Du fait de leur forte réactivité et toxicité, ces molécules sont prises en charge par différents systèmes antioxydants qui sont souvent présents dans des compartiments particuliers. Ainsi Les systèmes antioxydants non enzymatiques existant chez les plantes sont essentiellement constitués de métabolites de faibles poids moléculaires tels que l'acide ascorbique (ASH), le glutathion (GSH), des composés phénoliques, des alcaloïdes, des acides aminés non protéiques, le-tocophérol (Vitamine E), les

caroténoïdes et les flavonoïdes. Ces molécules participent directement à l'élimination des EAO.[140] .En parallèle, pour se protéger de l'action destructrice de ces ROS, les plantes mettent en œuvre des systèmes d'élimination de ces radicaux libres : Les enzymes antioxydantes [139] [141].

Parmi les enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase,(SOD) présente dans les chloroplastes et les mitochondries, réduisent l' O₂⁻ en H₂O₂ ; les catalases qui catalysent la dismutation du peroxyde d'hydrogène et les ascorbate peroxydase (APX) qui réduisent le peroxyde d'hydrogène en eau mais aussi par la gaïacol peroxydase (Figure 2.7) .Les ascorbate peroxydases sont des peroxydases à hème, de masse moléculaire d'environ 30 kDa, actives sous forme monomérique ou dimérique suivant l'isoforme considérée. Elles catalysent la réduction de H₂O₂ en O₂ en utilisant le pouvoir réducteur d'une molécule d'ascorbate. L'ascorbate est oxydé en monodéhydroascorbate, et est ensuite régénérée par le cycle Halliwell-Asada-Foyer .Elles se trouvent sous forme soluble dans le cytosol et le stroma des chloroplastes, et sous forme liée aux membranes dans le peroxysome ou au niveau des thylacoïdes. Chez les végétaux supérieurs, les Apx sont codées par des familles multigéniques, avec 9 isoformes chez l'arabette et 8 chez le riz. [142] [143].

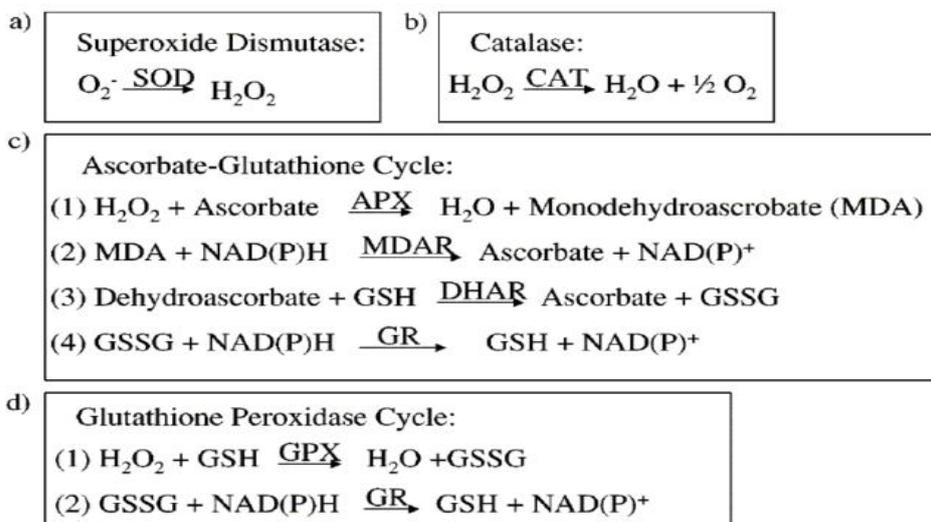


Figure 2.7: Principales réactions enzymatiques permettant d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS) : superoxyde dismutase (SOD), catalase (CAT), cycle ascorbate-glutathion, et cycle de la glutathion peroxydase (GPX) [142].

H₂O₂ est également éliminé par l'action du cycle ascorbate-glutathion impliquant les réactions d'oxydo-réductions successives de l'ascorbate, du glutathion et du NADPH, qui catalysé par l'ascorbate peroxydase (APX), la monodéhydroascorbate réductase (MDAR), la déhydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR). Chez les plantes,

le cycle ascorbate-glutathion peut opérer dans le cytosol et dans tous les organites dans lesquels une détoxification des ROS est nécessaire (Figure 2.8). [143].

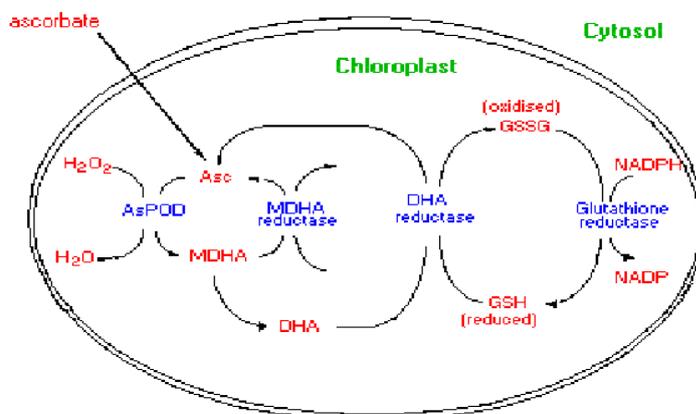


Figure 2.8 : Cycle ascorbate-glutathion [143]

l'ascorbate peroxydase (APX), la monodéhydroascorbate réductase (MDAR), la déhydroascorbate réductase (DHAR) et la glutathion réductase (GR).

La figure 2.8 représentation du cycle ascorbate-glutathion, se réalisant dans le chloroplaste où l'ascorbate qui est présent à forte concentration dans le stroma, constitue le principal substrat pour la détoxification de H₂O₂ [139].

2.3.2.3. Détoxification des macromolécules oxydées

Les lipides oxydés sont réduits par les glutathion peroxydases [144] et les peroxyredoxines à 2 cystéines (Prx) [145] alors que certaines bases nucléotidiques endommagées sont excisées de l'ADN, il existe des systèmes de réparation comme la protéine Ogg1[146][147]. La réparation des protéines et des lipides est détaillée par la suite.

2.3.4. Protéines et stress oxydant

2.3.4.1. Mécanismes d'oxydation des protéines

L'abondance des protéines dans les cellules et leur haute réactivité en font des cibles principales des EAO [135] L'oxydation des protéines peut se faire au niveau de la chaîne peptidique provoquant sa fragmentation ou la formation de radicaux [148]. Des groupements latéraux de certains acides aminés (Tableau 2.1 et 2.2) sont particulièrement sensibles. Par exemple, l'oxydation directe de la lysine, de l'arginine, de la proline et de la thréonine entraîne la formation de dérivés carbonylés, alors que les acides aminés

aromatiques sont hydroxylés. Ces modifications sont généralement irréversibles et servent de marqueurs de l'état redox de la cellule.

Tableau 2.1 : Produits d'oxydations des acides aminés les plus sensibles [135] [149] [150]

Acides aminés	Produits d'oxydation stables
Acide glutamique	Acide oxalique, acide pyruvique
Arginine	Acide 5-hydroxy-2-aminovalérique, semialdéhyde glutamique, composés carbonylés
Glycine	Acide aminomalonique
Histidine	2-oxohistidine, asparagine, acide aspartique, alcools, composés carbonylés
Isoleucine	Alcools, composés carbonylés
Leucine	Alcools, acide α -cétoisocaproïque, acide isovalérique, isovaleraldéhyde, isovaleraldoxime, carbonyle
Lysine	Semialdéhyde α -aminoadipique, alcools, composés carbonylés
Proline	Semialdéhyde glutamique, hydroxyproline, pyrrolidone, acide 5-hydroxy-2-aminovalérique
Thréonine	Acide 2-amino 3-cétobutyrique
Acides aminés	Produits d'oxydation stables
Phénylalanine	Ortho-tyrosine (2-hydroxyphénylalanine), meta-tyrosine (3-hydroxyphénylalanine), tyrosine, dihydroxyphénylalanine (DOPA)
Tyrosine	di-tyrosine, alcools, composés cycliques
Tryptophane	N-formylkynurenine, kynureine, 2-, 4-, 5-, 6-, et 7-hydroxytryptophane, alcools, composés cycliques

2.3.4.2. Oxydation des acides aminés soufrés aux groupements thiols

Les résidus cystéines et méthionines, qui sont parmi les acides aminés les plus sensibles [135] peuvent subir une oxydation au niveau de l'atome de soufre (Figure 2.9). Au niveau des protéines, le soufre est retrouvé sous forme de thiol dans les Cys et sous forme de sulfure dans les Met. Comme l'atome de soufre est polarisable, ces deux acides aminés ont un pouvoir nucléophile.

L'oxydation de la cystéine en cystine est un phénomène bien connu puisqu'elle permet la formation de ponts disulfures impliqués dans la structure et l'activité de certaines enzymes. La formation de ponts disulfures, intra ou intermoléculaires, peut être modulée par le potentiel redox du compartiment cellulaire dans des conditions normales ou de stress oxydant. Les EAO sont aussi responsables de la formation d'acides sulféniques, d'acides sulfiniques et d'acides sulfoniques sur les cystéines alors que les méthionines

sont converties en méthionines sulfoxydes (Metso) et en méthionines sulfones (figure 2.9). Il existe des systèmes de réparation des méthionines sulfoxydes, comme les méthionines sulfoxyde réductases

2.3.4.3. Réparation des groupements thiols oxydés

La réduction des ponts disulfures et des cystéines oxydées sous forme d'acides sulféniques est effectuée par les thiorédoxines (Trx), le glutathion et les glutarédoxines (Grx) alors que certains acides sulfoniques sont réduits par la sulfirédoxine (Srx) (figure 2.9)[151]. Une classe d'enzyme peuvent catalyser la réduction des MetSO en Met : les Méthionines sulfoxyde réductase (Msr)(figure2.9)[152][153][154].

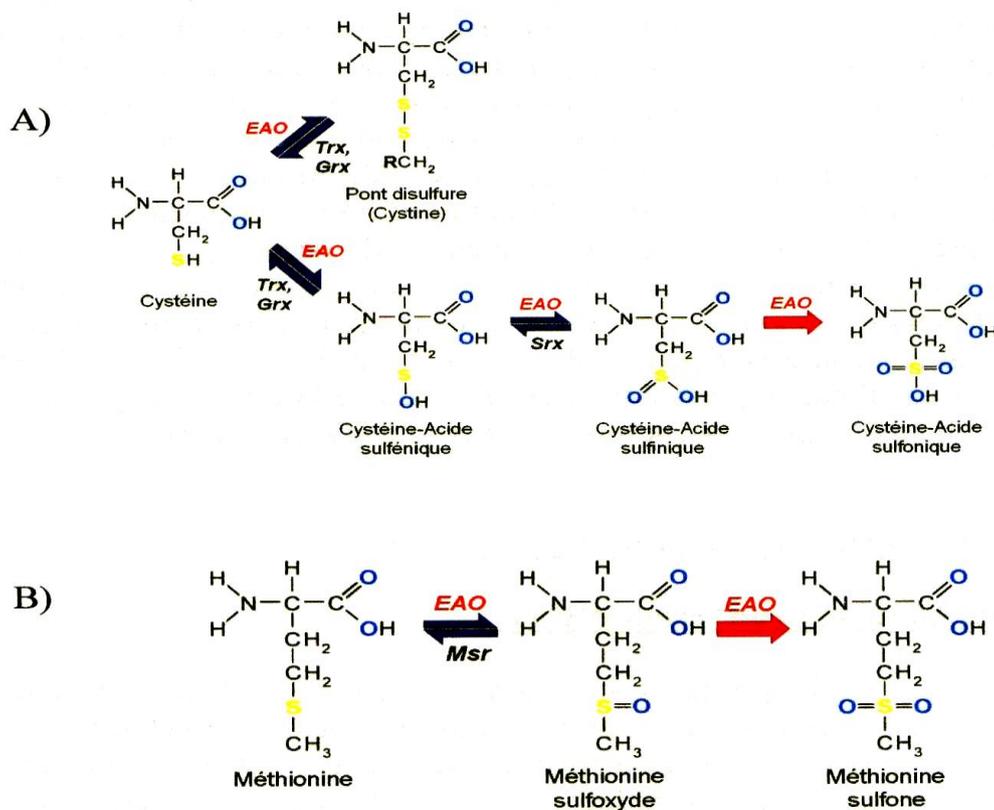


Figure 2.9 : Oxydation et réduction de la cystéine (A) et de la Méthionine (B)
 Trx : thiorédoxine, Grx : glutarédoxine, Msr : méthionine sulfoxyde réductase, Srx : sulfirédoxine, EAO : espèces actives de l'oxygène

2.3.4.3.1 Les thiorédoxines

Les thiorédoxines sont des petites protéines ubiquitaires (12 à 14kDa) exerçant une activité disulfite réductase. Ce sont des oxydoréductases à thiols. La première thiorédoxine a été découverte chez *Echerichia coli* comme donneur d'hydrogène pour la ribonucléotide réductase, enzyme essentielle à la synthèse d'ADN [155]. Depuis un très grand nombre de thiorédoxines a été identifié dans tous les organismes vivants.

A. Structure et mécanisme catalytique

Toutes les thiorédoxines présentent des caractéristiques communes avec la thiorédoxine 1 d' *Echerichia coli*. Elles possèdent un site actif composé des résidus Cys-Gly-Pro-Cys. Ce site est capable de réduire des ponts disulfures au sein de protéines cibles par un mécanisme d'échange thiol-disulfure. Elles sont caractérisées par une structure tridimensionnelle fortement conservée, appelée le "repliement thiorédoxine", qui consiste en un noyau central de cinq brins β entouré de 4 hélices α . Le site actif est exposé vers l'extérieur de la protéine favorisant ainsi l'interaction avec les substrats (figure2.10).Le mécanisme catalytique des thiorédoxines pour réduire les ponts disulfures repose sur l'attaque nucléophile du résidu cystéine 32 (numérotation de la Trx 1 d' *Echerichia coli*) du site actif. Il se forme alors un complexe disulfure transitoire entre la Trx et son substrat, suivi d'un échange rapide thiol-disulfure avec la cystéine dans un environnement hydrophobe [156] [157] (figure 2.11) Le pont disulfure formé entre les deux cystéines est réduit par une NADPH-thiorédoxine réductase ou une ferrédoxine-thiorédoxine réductase (figure2.12 et 2.13). Ces deux systèmes réducteurs principaux des Trxs coexistent au sein des cellules végétales, le système NADPH/NADPH thiorédoxine réductase (NTR)/Trx et le système ferrédoxine(Fdx)/ferrédoxine thiorédoxine réductase (FTR)/Trx [158] [159] [160].

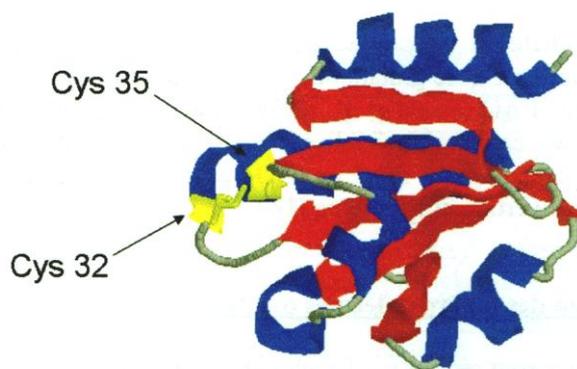


Figure2.10 :Structure tridimensionnelle de la thiorédoxine 1 d' *Echerichia coli* [155].La structure est visualisée grâce au logiciel RasMol. Les hélices α sont représentées en bleu, les brins β en rouge et les cystéines catalytiques en jaunes.

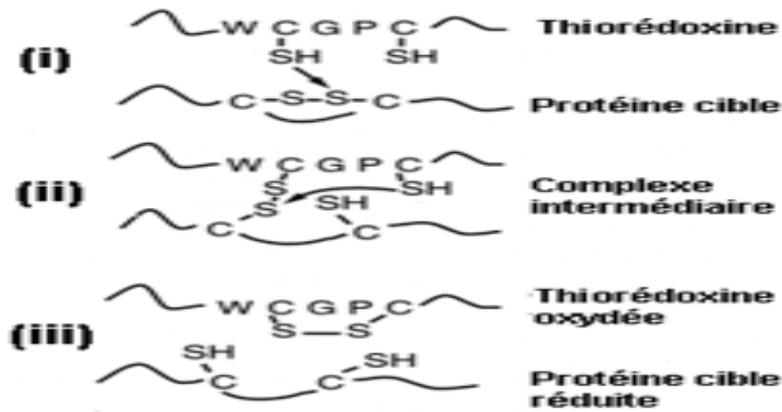


Figure 2.11 : Schéma de réduction d'une protéine cible par la thiorédoxine. Attaque nucléophile de la première cystéine du site actif de la thiorédoxine sur le pont disulfure d'une protéine cible (i), menant à la formation d'un complexe disulfure intermédiaire instable (ii). La seconde cystéine du site actif de la thiorédoxine brise le pont disulfure entre la thiorédoxine et sa cible, libérant la thiorédoxine sous forme oxydée et la cible réduite (iii). [155]

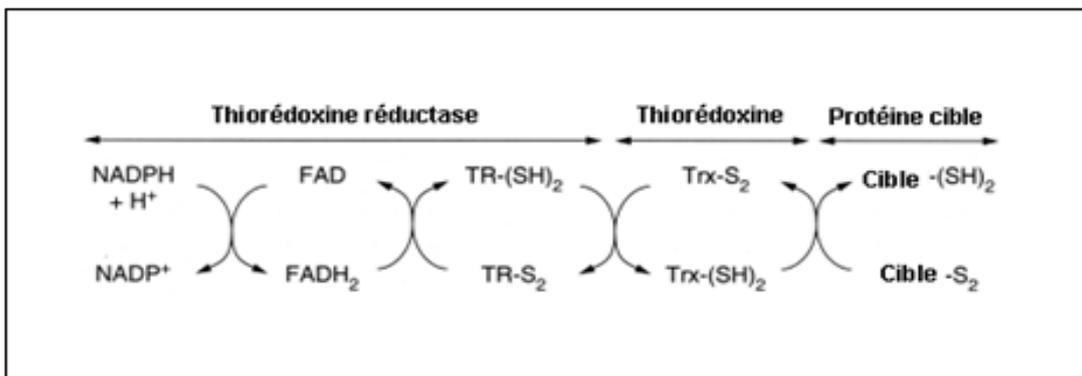


Figure 2.12 : Mécanisme de réduction NADPH-dépendante des ponts disulfures des protéines par le système thiorédoxine. La thiorédoxine réductase NADPH-dépendante est une flavoenzyme d'environ 70KDa, formée de deux sous unités associées à deux molécules de FAD. Chaque sous unité présente un site de liaison au FAD et NADPH et un pont disulfure au sein de son actif. Lors de la réduction par la thiorédoxine, les électrons sont transférés du NADPH au pont disulfure du site actif de la thiorédoxine réductase par l'intermédiaire du FAD. Les électrons sont ensuite transférés au pont disulfure du site actif de la thiorédoxine. TR : Thiorédoxine Réductase. Trx : Thiorédoxine [158]

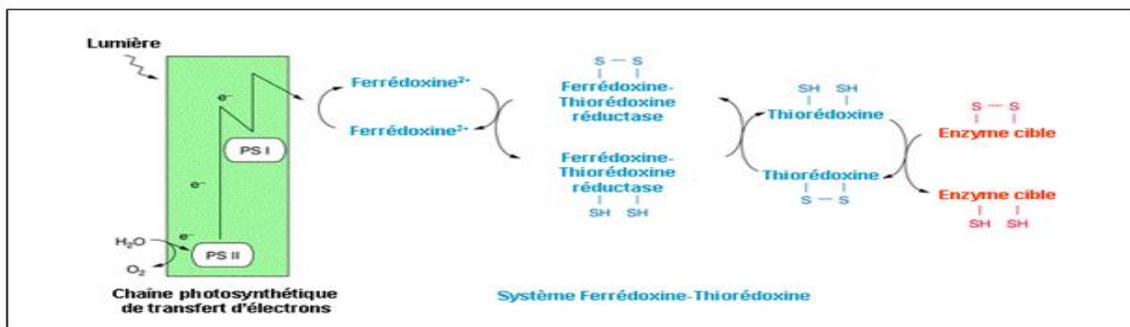


Figure 2.13 : Représentation schématique du système chloroplastique ferrédoxine-thiorédoxine. La ferrédoxine est réduite par les électrons provenant de la chaîne photosynthétique de transfert

d'électrons (représentée en vert). Une partie de la ferrédoxine réduite sert de donneurs d'électrons à la ferrédoxine-thiorédoxine réductase, qui peut réaliser une transition thiol-disulfure avec le site actif de la thiorédoxine réduite peut réduire les ponts disulfures de diverses enzymes cibles, souvent inactives ou faiblement actives sous forme oxydée [158]

B). Rôles des thiorédoxines

Le premier rôle des Trx dans la cellule est la protection des protéines de l'agrégation ou de l'inactivation provoquée par la formation de ponts disulfures intra ou intermoléculaires [161]. Le second rôle est celui de donneurs d'électrons pour une grande variété de protéines. Leur rôle primordial est situé dans la protection contre le stress oxydant, leur action directe sur les cystéines oxydées, elles fournissent du pouvoir réducteur aux Peroxyrédoxines à 2 cystéines qui réduisent le H₂O₂ et les Alkyl hydroperoxydes [162]. Ainsi que les MSR [163] comme la MsrB1 et la MsrA. Outre leur participation à la réponse aux différents stress environnementaux via la réduction des Trxs et des méthionine sulfoxyde réductases (Msr) [164] [165], les thiorédoxines interviennent dans des processus aussi importants que la photorespiration, le cycle de l'acide citrique, le métabolisme des lipides, le transport des électrons, la synthèse d'ATP, le transport membranaire, le métabolisme de l'azote et du soufre, la synthèse hormonale, et peuvent également jouer un rôle de protéines chaperonnes [166].

C). Les thiorédoxines végétales

A la différence des bactéries ou des animaux qui ne possèdent que peu de thiorédoxines, le génome des plantes en code un très grand nombre. Par exemple *Arabidopsis thaliana* en possède 46 réparties dans les compartiments cellulaires, on peut citer les trx des familles f1, m1, m2, m4, y1, y2 [167] [168]. Le chloroplaste qui est le siège de la production des EAO en possède 21 [169]. La structure, le mécanisme catalytique et les systèmes de régénération de la protéine sont identiques à celui des procaryotes (figure 2.10, 2.11, 2.12). [168]. Le nombre de cibles protéiques identifiées à ce jour montre qu'elles interviennent dans de nombreuses voies métaboliques [170]. Par exemple les thiorédoxines de la famille f régulent l'activité de la NADPH-malate déshydrogénase [171]. Les Trx ont également des cibles impliquées dans la traduction des ARNm, la maturation des graines [172] ou la résistance aux pathogènes [173].

Le rôle des Trx chloroplastiques dans la lutte contre le stress oxydant a été mis en évidence par la découverte de la Trx CDSP32 « Chloroplastic Drought Induced Stress Protein of 32 KDa » qui est très fortement induite par des traitements générateurs d'EAO chez la pomme de terre et *Arabidopsis* [174] [175]. Les cibles potentielles de la thiorédoxine CDSP32 ont été identifiées, La 2Cyst-Prx (BaS1), la PrxQ et les méthionine sulfoxyde réductases A et B ; La CDSP32 joue un rôle physiologique fondamentale dans la réduction des hydroperoxydes de lipides dans le chloroplaste en tant que donneur

d'électrons pour la peroxyrédoxine à 2 cystéines BAS1 [176] la peroxyredoxine Q et elle participe également à des mécanismes de réparation des protéines oxydées en fournissant le pouvoir réducteur à des protéines de type méthionines sulfoxyde réductases [177]. D'autres protéines chloroplastiques qui jouent le même rôle que les thiorédoxines sont les Glutarédoxines [178].

Une protéine thylacoïdienne CDSP34 « Chloroplatic Drought Induced Stress Protein of 34 KDa » a été mise en évidence par électrophorèse bidimensionnelle de la fraction protéique. Des essais d'immunodetection sur membrane et d'immunocytolocalisation électronique ont montré que la CDSP34 est localisée dans les lamelles thylacoïdiennes [179] [180].

2.3.4.3.2. Les Méthionines sulfoxydes réductases

La réduction de MetSO en Met se fait par l'action des méthionine sulfoxyde réductases (Msr). Ces enzymes peuvent réduire les MetSO libres ou engagés dans la chaîne peptidique grâce au pouvoir réducteur fourni par le système thiorédoxine (figure 2.15)

Dès 1960, une activité de ce type a été décrite dans une souche de *S. cerevisiae* [181]. Une activité Msr a ensuite été détectée dans une souche d'*E. coli* auxotrophe pour la Met capable de se développer sur MetSO [182]. Ce n'est qu'en fin 2001, avec la mise en évidence d'une nouvelle activité Msr dans une souche d'*E. coli* [183] que les Msr ont été clairement divisées en deux sous-classes, nommées MsrA et MsrB, qui diffèrent par leur stéréospécificité vis-à-vis respectivement des isomères S et R de la fonction sulfoxyde de la MetSO.

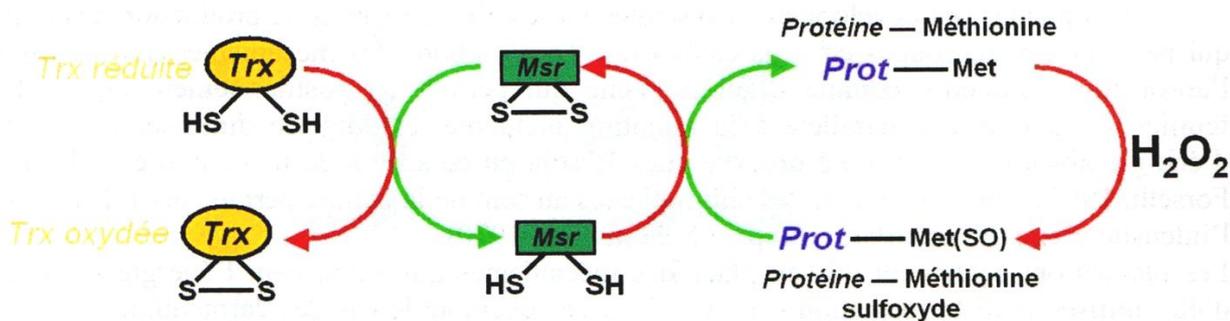


Figure 2.14 : Réactions d'oxydations de résidus méthionines et de réduction par les MSR. Les résidus méthionines des protéines peuvent être oxydés en méthionines sulfoxydes par les EAO. Les thiorédoxines (Trx) apportent le pouvoir réducteur au Msr nécessaire à la réduction des méthionines sulfoxydes.

A) Les méthionines sulfoxyde réductase de type A

Les MsrA sont des enzymes monomériques de 25KDa et 35KDa présentes dans tous les règnes du vivant. La MsrA d'*Echerichia coli* possède 3 cystéines catalytiques (Cys

51, Cys198 et Cys 206. Actuellement, les seules structures obtenues, par cristallographie aux rayons X, sont celles des enzymes d'E. coli et de Bos taurus [183] [184] (figure 2.14a). Le mécanisme catalytique de la MsrA est présenté dans la figure 2.14

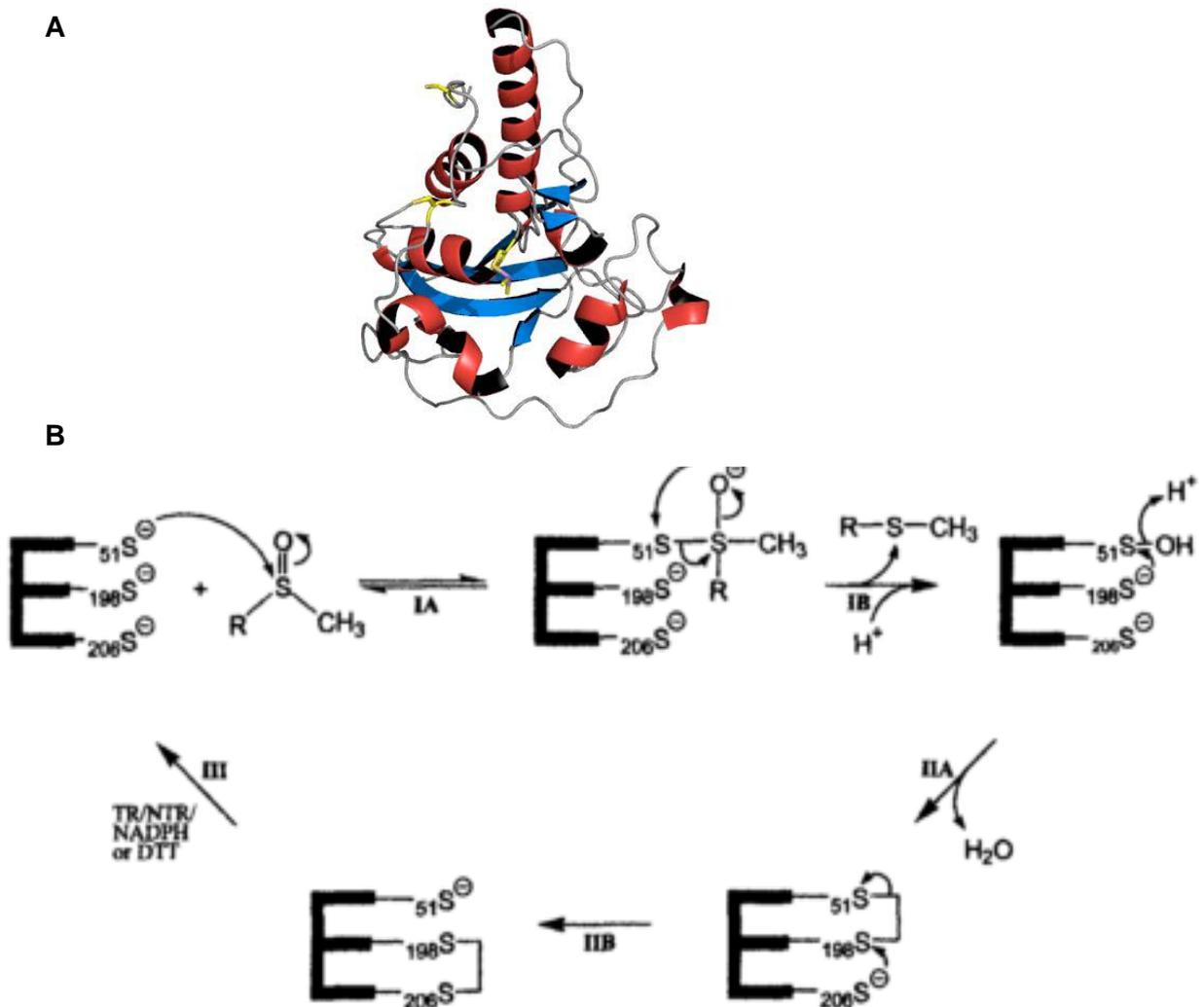


Figure 2.15 : A : structure tridimensionnelle de la MsrA d'E.coli

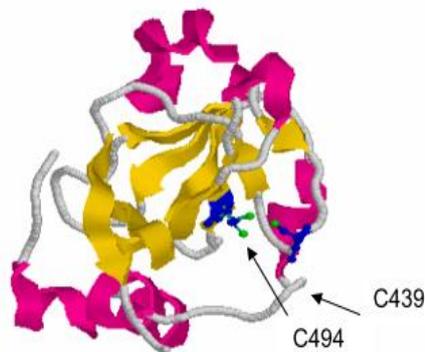
B : Mécanisme catalytique de la MsrA d'E.coli [185]

L'attaque de la Cys 51 sur le sulfoxyde du substrat forme un intermédiaire réactionnel (étape IA), dont la réorganisation mène à la formation d'ion sulfénate, au dégagement d'une Met et à la protonisation de l'ion sulfénate (étape IB). L'attaque de la Cys198 sur le S de l'intermédiaire sulfénique crée un pont disulfure Cys 51-Cys 198 et permet le dégagement d'une molécule d'eau par catalyse acide (étape IIA). Le retour du site actif à un état réduit se fait par deux échanges thiol-disulfure entre la Cys206 (étape IIB) et un système de régénération thiorédoxine ou DTT (étape III). RSOCH₃ ET RSCH₃, représentent la Metso et la Met respectivement. TR, Thiorédoxine ; NTR, Thiorédoxine réductase, NADPH-dépendante, [185] [186].

B) Les Méthionines sulfoxyde réductases de type B

Comme les MsrA, les MsrB sont présentes dans tous les règnes du vivant. Elles ont une masse moléculaire de 12 à 15 kDa. D'un point de vue structural, seule la structure tridimensionnelle d'un motif MsrB appartenant à un facteur de virulence de *Neisseria gonorrhoeae* nommé PILB, a pu être résolue (Figure 2.15) [187]. Elle montre que la protéine est composée de deux feuillets β anti-parallèles, qui sont entourés de 3 hélices α et de 5 hélices 3_{10} . Les Cys catalytiques sont la Cys 494 et Cys 439. Le rôle de ces deux résidus dans la réduction de Met-R-SO et le recyclage par la Trx a été montré *in vitro* (Figure 2.15B) [188].

A



B

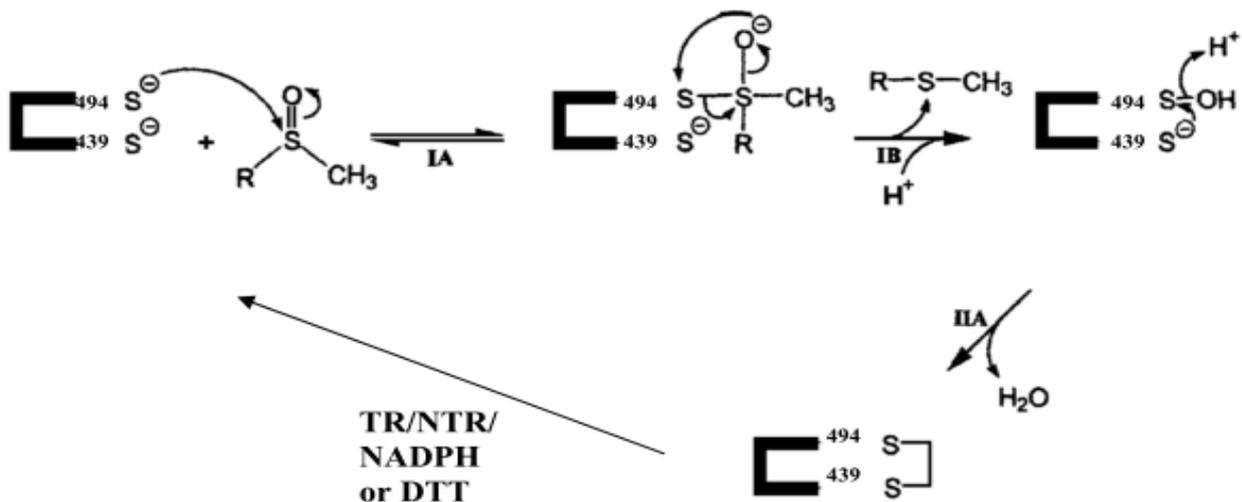


Figure 2.16 : structure tridimensionnelle (A) et mécanisme catalytique (B) de la MsrB de *N. gonorrhoeae* [187].

Dans cet exemple, la forme thiolate de la cystéine 494 attaque l'atome de soufre de la MetSO pour former un SOH intermédiaire et libérer une mole de Met. Ce SOH est à son

tour attaqué par la cystéine 439 aboutissant à la formation d'un pont disulfure entre les cystéines 439 et 494. Ce pont disulfure sera ensuite réduit par les Trx, permettant de réactiver l'enzyme. Ce mécanisme semble être applicable à une grande majorité de Msr.

C) Rôles des méthionines sulfoxyde réductases

L'oxydation de la Met est une modification post-traductionnelle des protéines qui peut avoir des effets néfastes sur la structure et l'activité des protéines touchées, comme cela a été proposée pour la maladie d'Alzheimer[189]. Les Msr ont un rôle de protection contre le stress oxydant. En effet, les mutant « Knock-out » d'*Echerichia coli*, d'*Erwinia chrysanthemi* et de levure sont plus sensibles au stress oxydant que les souches sauvages [190]. Le rôle des Msr dans la sénescence a également été montré, la surexpression du gène MsrA augmentant la durée de vie de la drosophile [191]).

D)Les méthionines sulfoxyde réductases végétales

L'activité des Msr a été découverte sur plusieurs espèces de végétaux dès 1983. Cette première étude a montré que l'activité est principalement localisée dans le chloroplastes et que le système thiorédoxine semble fournir le pouvoir réducteur [192](Sanchez,1983). Le premier gène de MsrA a été isolé du navet (*Brassica napus*)[193].A la différence des autres organismes et comme pour les thiorédoxines, les végétaux possèdent de nombreuses Msr. Chez *Arabidopsis thaliana* compte au moins 5 Msr A[193] et 9MsrB [194] (Tableau 2.3). Les Msr jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de tolérance au stress oxydant et lors de la sénescence. Chez les plantes les caractéristiques des MsrA sont relativement bien connues. Sadanom et al., 1996)[193] ont mis en évidence un rôle des MsrA dans la tolérance des plantes au stress oxydant. Les Msr sont des oxydoréductases à thiols chloroplastiques. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe deux isoformes de Msr, MrrB1 et MsrB2 ,leur partenaires physiologiques potentiels est la Trx CDSP32 [195]. (Rey et al 2005). des recherches menées par vierra dos santos 2005[194]. ont validé la capacité de MSRB1 et MSRB2 à réduire la MetSO ,leur adressage au chloroplaste et leur accumulation en réponse à des contraintes abiotiques.

L'activité des MSRB1 et MSRB2 in vitro est régénérée par les différentes thiorédoxines,. La MSRB 1 ne peut tirer son pouvoir réducteur que de la CDSP32 et la Grx ,la MSRB2 tire son pouvoir réducteur des trx f1 ,m1,m2,m4,y1,y2 [178][134]. La figure2.17 représente de réduction de la MSRB2 par les thiorédoxines chloroplastiques

Tableau 2.3 Les Msr chez trois organismes modèles de plantes supérieures. *Arabidopsis thaliana*, *Populus trichocarpa*, *Oryza sativa*, *Vitis vinifera* [134]

Organism	Name	number	Chromosome ^{a,b}	Gene (bp)	amino acids	localization (RC) ^c	Redox Cys ^d
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MSRA1	At5g61640	5	1356	202	Cytosol (2)	C44 C194 C200
	MSRA2	At5g07460	5	1380	218	Cytosol (3)	C60 C210 C216
	MSRA3	At5g07470	5	1805	202	Cytosol (3)	C44 C194 C200
	MSRA4	At4g25130	4	1474	258	Plastid ^e	C100 C250 C256
	MSRA5.1	At2g18030.1	2	1555	254	ER / SP (2)	C71 C228
	MSRA5.2	At2g18030.2	2	1588	192	ER / SP (2)	C71
<i>Oryza sativa</i>	MSRA2.1	Os04g40600	4	2056	187	Cytosol (2)	C34 C179 C185
	MSRA2.2	Os04g40620	4	833	190	Cytosol (1)	C37 C182
	MSRA4.1	Os10g41400.1	10	2489	263	Plastid (4)	C105 C255 C261
	MSRA4.2	Os10g41400.2	10	1656	211	Plastid (4)	C105
	MSRA5	Os06g04650	6	2189	254	ER / SP (2)	C71 C228
<i>Populus trichocarpa</i>	MSRA2.1	gw1.XII.577.1	LG XII	614	190	Cytosol (1)	C31 C182 C188 ^f
	MSRA2.2	gw1.XV.1862.1	LG XV	603	190	Cytosol (2)	C31 C182 C188
	MSRA4.1	estExt_fgenesh4_pg_C_LG_XV0857	LG XV	2279	264	Plastid (1)	C104 C256 C260 ^f
	MSRA4.2	estExt_Genewise1_v1.C_2320013	Scaffold 232	2311	262	Plastid (1)	C104 C256 C260
	MSRA5	grail3.0019030401	LG VII	2641	252	ER / SP (1)	C59 C69 C226
<i>Vitis vinifera</i>	MSRA3	GSVIVT00014205001	16	7855	254	Plastid (1)	C96 C246 C252
	MSRA4	GSVIVT00015923001	17	1596	190	Cytosol (2)	C31 C182 C188
	MSRA5	GSVIVT00036803001	4	12 939	252	ER / SP (5)	C69 C226

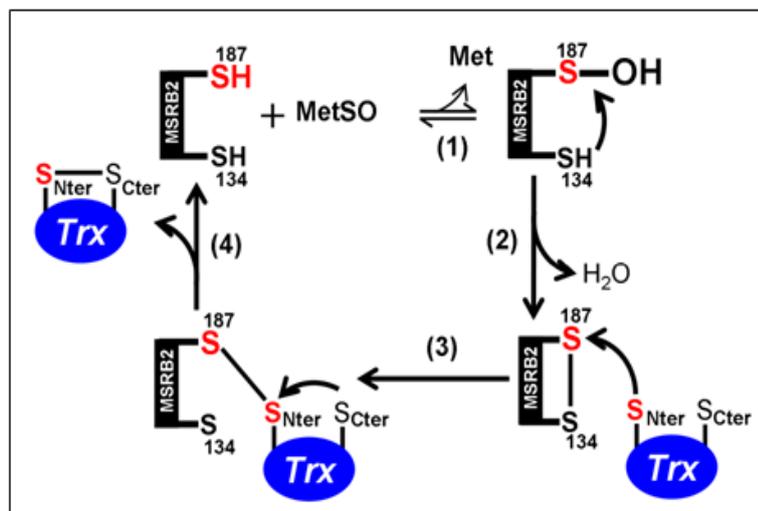


Figure 2.17 : Mécanisme de réduction de MsrB2 par les thiorédoxines chloroplastiques. La réduction de la MetSO entraîne la formation d'un acide sulfénique sur la Cys187(1), immédiatement réduit par la formation d'un pont disulfure entre la Cys-187 et 134 (2).La cyst N terminale de la TRX attaque ce pont pour former une liaison disulfure transitoire avec la Cys-187

deMsrB2 (3). Ce pont intermoléculaire est réduit par la Cys en C-terminale de la TRX, conduisant à la libération de MSRB2 réduite et de la TRX oxydée[134]

2.3.4.3.3 Les Peroxyrédoxines

A).Généralités

Les peroxyrédoxines font partie de la famille des thioredoxines-peroxydases, des enzymes impliquées dans l'élimination de H₂O₂. Ce sont des peroxydases non hémiques dont l'activité catalytique est assurée par un résidu cystéine. La réduction du substrat s'effectue par oxydation du groupement thiol (SH) de la cystéine peroxydasique en acide sulfénique (-SOH). La régénération de l'activité par la réduction de l'acide sulfénique (-SOH) est due à l'oxydation de co-substrats tels que la thiorédoxines, glutarédoxines et cyclophilines [195]. Les peroxyrédoxines font partie de la famille des thioredoxines-peroxydases, des enzymes impliquées dans l'élimination de H₂O₂.

. Diez et al., 2011[196] ont montré que cette protéine était capable de réduire H₂O₂ et les alkyl hydroperoxydes en utilisant des électrons provenant de donneurs de type thiorédoxines (figure 2.18).

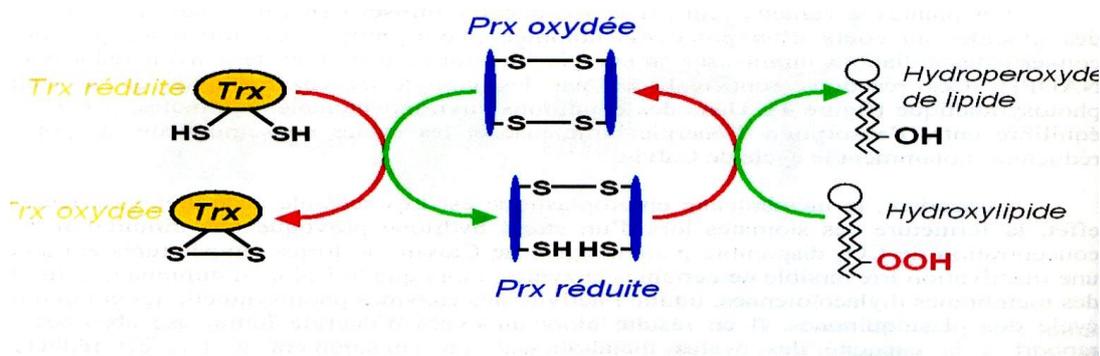


Figure 2.18 : Réaction de réduction des hydroperoxydes de lipides par les peroxyrédoxines Les thiorédoxines (Trx) apportent le pouvoir réducteur aux peroxyrédoxines qui peuvent alors réduire les hydroperoxydes de lipides[196].

B).Les différentes sous classes et la localisation des peroxyrédoxines chez les plantes

Depuis les membres de la famille des Prx ont été identifiés dans de nombreux organismes, des procaryotes aux mammifères [197]. Cette famille est divisée en 3 classes selon leur mécanisme de réduction des peroxydes et en particulier selon leur mode de recyclage. On distingue :

- les peroxyrédoxines à 2 cystéines typiques et atypiques (2-Cys Prx), qui contiennent une cystéine activée dans leur site actif (dite cystéine catalytique CC), dont le recyclage est assuré par une cystéine de régénération (CR) ;

› les peroxyrédoxines à 1 cystéine, chez qui le recyclage est assuré par un système réducteur externe.

Dans le mécanisme de réduction de H₂O₂ par les peroxyrédoxines à 2 cystéines, la cystéine activée est oxydée en acide cystéine sulfénique lorsqu'un peroxyde est réduit. Puis elle engage une liaison disulfure avec une cystéine de régénération de manière intra- ou inter-protéique. Afin de compléter le cycle enzymatique catalytique, les peroxyrédoxines sont réduites dans leur forme thiol active d'origine grâce par exemple à l'intervention d'enzymes thiorédoxines capables de réduire les ponts disulfures.

Chez le peuplier, il existe 9 Prx qui se divisent en 4 Prx de type II, 2 Prx 2Cys, 2 Prx Q et 1 Prx 1-Cys. Dans le génome du riz, on trouve 8 Prx: 4 Prx de type II, 1 Prx à 2-cys et 2 Prx 1-Cys [196]. Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe 9 Prx exprimées, qui se répartissent ainsi : 5 Prx de type II, 2 Prx à 2 cystéines, 1 PrxQ et une Prx à une cystéine [198]. Elles sont présentes dans les différents compartiments cellulaires: les Prx 2-Cys A et B, PrxQ et Prx IIE sont chloroplastiques, les Prx II B, C, D sont cytosoliques, la Prx IIF est mitochondriale et la Prx 1-Cys est nucléaire. Toutes ces Prx possèdent une activité de réduction des peroxydes très similaire, mais différent au niveau des mécanismes de régénération de l'enzyme, et au niveau de leur structure quaternaire. Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 18 gènes codant des peroxydase à thiols, réparties en 5 catégories : 1Cyst Prx, 2Cyst Prx, PrxQ, PrxII et Gpx

Tableau 2.4 : Les gènes codant les peroxyredoxines chez trois organismes modèles de plantes supérieures. *Arabidopsis thaliana*, *Populis trichocarpa*, *Oryza sativa*
N, noyau ;Cyt,cytoplasme ;Chl,chloroplaste ;Mit,mitochondrie [196]

Gène	Localisation de la protéine	Locus		
		A. thaliana	P. trichocarpa	O. sativa
1-CysPrx	N, Cyt	At1g48130	POPTR_0008s09930	Os07g0638300 Os07g0638400
2-CysPrxA	Chl	At3g11630	POPTR_0016s07280	Os02g0537700
2-CysPrxB	Chl	At5g06290	POPTR_0006s22130 POPTR_1173s00210	-
PrxQ1	Chl	At3g23060	POPTR_0006s13980	Os06g0196300
PrxQ2	Chl	-	POPTR_0018s07400	-
PrxII A	Cyt	At1g65990	-	-
PrxII B	Cyt	At1g65980	POPTR_0001s44990	Os01g0675100*
PrxII C	Cyt	At1g65970	POPTR_0018s09030	-
PrxII D	Cyt	At1g60740	-	-
PrxII E	Chl	At3g52960	POPTR_0013s10250	Os06g0625500 Os02g0192700
PrxII F	Mit	At3g06050	POPTR_0019s04070	Os01g0266600

B) Mécanisme catalytique des Peroxyredoxines

La première étape de la réduction des peroxydes est conservée pour toutes les classes de peroxyredoxines : elle consiste en l'attaque nucléophile de la molécule oxydée par la cystéine catalytique (Cystéine peroxydatique). Ceci conduit à la formation d'un acide sulfénique qui peut être réduit ensuite selon trois mécanisme (figure 2.19). Dans le cas des Prx à 1Cys, l'acide sulfénique formé est réduit par le glutathion ou le système Trx [199] (Figure 2.19A). Certaines Prx à 2-Cys monomériques de type II sont réduites suivant un mécanisme semblable par le glutathion et glutarédoxines (figure 2.19D). Dans le cas d'autres Prx à 2-Cyst monomériques (PrxQ), l'acide sulfénique formé après réduction du substrat est réduit par la formation d'un pont disulfure intramoléculaire. Enfin, les Prx à 2-Cys dimériques sont réduites par le système Trx après la formation d'un pont disulfure intermoléculaire entre une cystéine peroxydatique et une cystéine conservée et l'autre monomère [199](figure 2.19B) .

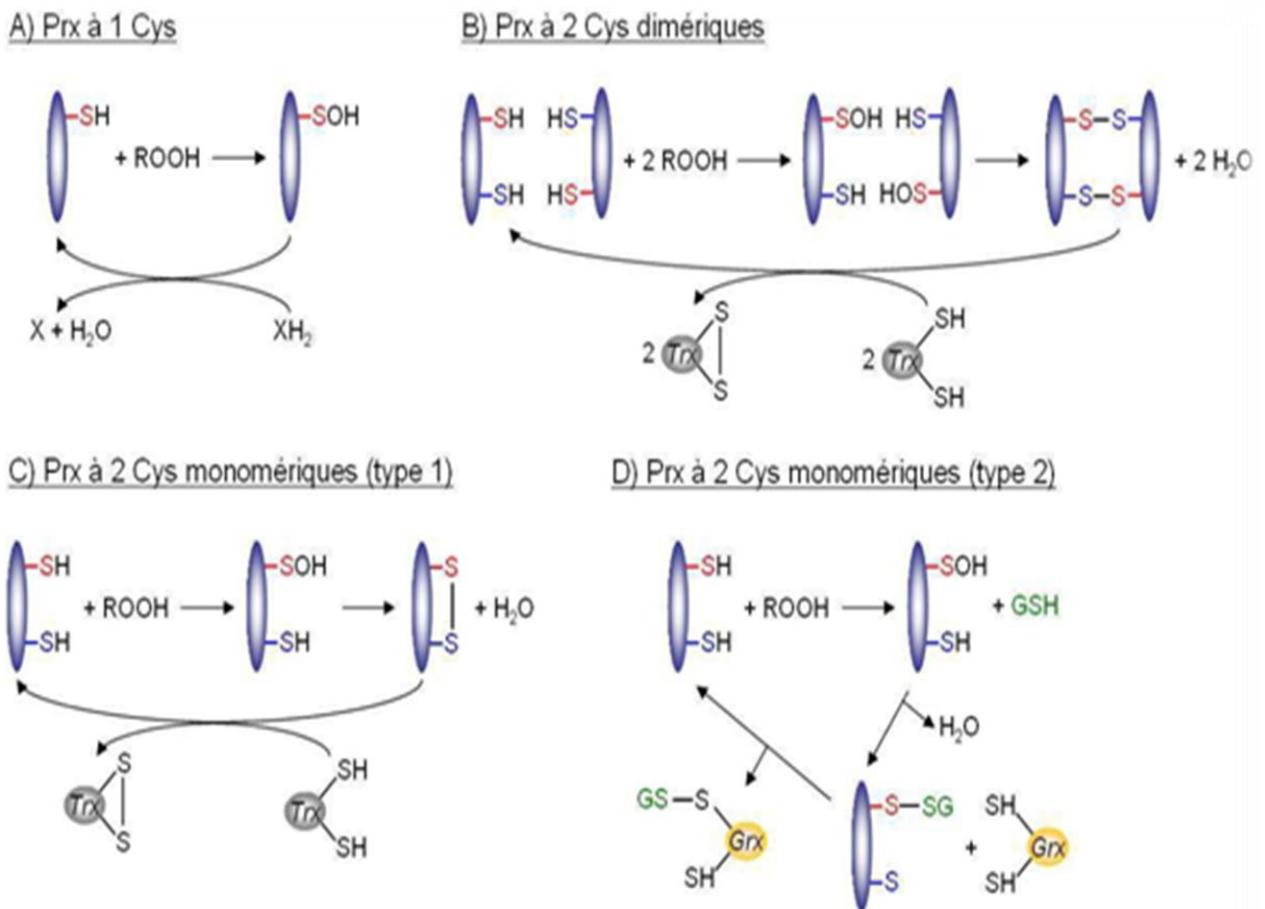


Figure 2.19: Les différents types de Prx et les mécanismes de régénérations de leurs activités. suivant le nombre de Cys mis en jeu dans la régénération de l'activité, les Prx peuvent être

classées en Prx 1Cyst (A), Prx à 2Cyst dimériques (B) et Prx à 2Cyst monomériques de type 1 (C) et 2(D) [196].

C) Suroxydation des peroxyrédoxines à deux cystéines et sulfirédoxine

La cystéine peroxydasique des 2-Cyst Prx est susceptible d'être suroxydée en acide sufinique ou en acide sulfonique. L'activité peroxydasique de la protéine est inhibée. Lorsque la conversion en acide sulfonique est irréversible[200], la réduction de l'acide sulfonique en acide sulfénique est catalysée par la sulfirédoxine (Srx) [162].

Les plantes possèdent un gène codant pour la sulfirédoxine qui est adressée au chloroplaste. Son extension entraîne l'augmentation du niveau de suroxydation de la 2-Cyst Prx plastidiale [201]. Un mutant d'Arabidopsis n'exprimant plus le gène Srx présente une capacité photosynthétique supérieure aux plantes sauvages et moins de dommages lors d'un traitement photooxydant [201]. Ceci peut s'expliquer par la participation de la forme suroxydée de la cystéine peroxydasique de la 2-Cys Prx dans un mécanisme de signalisation encore inconnu. La Srx est aussi adressée à la mitochondrie et permet de réduire la forme suroxydée de la PrxII F mitochondriale selon le mécanisme similaire à celui de la 2-Cyst Prx chloroplastique [202].

D) Rôles des peroxyrédoxines

Les Prx jouent un rôle direct dans la protection contre le stress photooxydant par l'élimination des peroxydes organiques. Ainsi, chez les procaryotes, la Prx A de la cyanobactérie Anabaena PPC 7120 de type 2 Cys Prx est impliquée dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ [203]. Les Prx I, II, III des mammifères participent aussi à la détoxification des peroxydes générés par le métabolisme cellulaire [204]. Chez les végétaux supérieurs, les 2 Cys-Prxs chloroplastiques et les PrxQ jouent un rôle important dans la protection de l'appareil photosynthétique contre le stress oxydant durant le développement des feuilles à travers leur activité Peroxydasique [204] [205] [206]. Cependant d'autres fonctions ont été caractérisées depuis quelques années pour les Tprx [207]. Dans le cas des peroxyredoxines des organismes photosynthétiques, trois fonctions possibles ont été proposées pour ces thiols peroxydases : une fonction de détoxification, une fonction de chaperonne et une fonction de senseur de l'état rédox des cellules.

En plus de leur fonction de chaperonnes moléculaires, les 2 Cys-Prx suroxydées joueraient un rôle dans la signalisation en réponse aux peroxydes.

Il a été proposé que leur inactivation temporaire permettrait une augmentation de la concentration en peroxydes conduisant à la mise en place des voies de réponses au stress oxydant au sein du chloroplaste dans le cas des plantes [207].

CHAPITRE 3 :

Matériel et méthodes

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

3.1 Le matériel végétal

Le matériel végétal ayant fait l'objet de notre étude concerne des graines d'*Atriplex halimus* récoltées dans la région d'El Mesrane (Wilaya de Djelfa) située à 300 Km et la région de Laghouat située à 400km au sud d'Alger. Les données climatiques des stations étudiées nous ont été fournies par l'office national de Météorologie (O.N.M.) et L'Agence national des ressources hydriques (A.N.R.H.) d'Alger. Les données écologiques des 2 stations sont représentées dans le tableau(3.1) .

Tableau 3.1: Données écologiques des stations expérimentales où s'est effectuées la récoltes des fruits des 2populations d'*Atriplex halimus*

Stations	Altitude (m)	Coordonnées géographiques	P(mm)	T° Max	Durée sécheresse(mois)	Q2
Djelfa	830	34°36'N/3°03'E	380	31	06	35,5
Laghouat	780	28°00'N/3°00'E	117	39	10	8,5

P : Moyennes des précipitations annuelles, T° Max : Température maximale du mois le plus chaud, Q2 : quotient pluviométrique d'Emberger, Durée de sécheresse de Bagouls et Gausson (1953), $P=2T$

3.2 Conditions de cultures des plantes entières

Les fruits d' *Atriplex halimus* L ont été décortiqués manuellement et désinfectés successivement dans une solution d'alcool à 70° pendant 10minutes puis dans une solution d'hypochlorite de calcium à 8% (w/v) pendant 20 minutes. Les graines ont été ensuite rincées 5 fois à l'eau distillée stérile et mises, par lots de 25 graines dans des boites de Pétri stérile sur du papier filtre imbibée d'eau stérile et placées dans la chambre de culture.

Après germination les plantules sont mises en culture dans un phytotron soumis aux conditions suivantes : Intensité lumineuse de $250\mu\text{moles photons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, une photopériode de 12h, une température de 23°C le jour et 19 °C la nuit avec une humidité relative de 60/80% (jour/ nuit).Après la levée des graines, les plantules sont transplantées dans des pots contenant un mélange de tourbe et de sable (3/1). Les pots sont arrosés avec une solution nutritive par un système de goutte à goutte. Au bout de 4 semaines, les plantes atteignent le stade 4paires de feuilles, stade auquel la contrainte hydrique (arrêt d'arrosage pendant 14J ou arrosage avec du polyéthylène glycol (PEG)8000 à 20% (soit

un potentiel osmotique externe de -2,1MPa) pendant 14J et un arrosage avec une solution saline de 0,150, 300 mM, 450mM et 600mM de NaCl (soit un potentiel osmotique externe de -0,1,- 0,7,-1,5, -2,8 MPa) pendant 18J sont appliquées.

3.3 Mesures effectuées

3.3.1. La croissance

La croissance des plantes est mesurée par le poids frais et sec après passage à l'étuve à 80°C pendant 48H. Ce poids est déterminé en utilisant 15 plantes par traitement.

La croissance relative a été calculée selon l'équation suivante au niveau des feuilles et des racines de la plante .

$$CR = \ln (PF_f)/(PF_i)$$

Où CR : croissance relative

PF_f : poids frais final

PF_i : poids frais initial

3.3.2. Contenu relatif en eau

Le contenu relatif en eau [208] a été calculé selon l'équation suivante : $CRE = (PF - PS) / (PT - PS) \times 100$ où PF est le poids frais, et PT le poids à la turgescence. PS est déterminé après passage à l'étuve pendant 48h à 80°C

Le potentiel osmotique et le contenu relatif en eau ont été mesurés entre 12h et 14h.

3.3.3. Potentiel hydrique et Potentiel osmotique

Le potentiel osmotique ψ_s à turgescence maximale a été mesuré sur la dernière paire de feuilles. Les feuilles jeunes ont été prélevées puis coupées. Elles ont été ensuite placées dans des tubes Eppendorf et mises dans l'azote liquide. Une fois que le contenu des tubes a fondu, l'extrait a été centrifugé à 15000g pendant 15 minutes à 4°C. Le filtrat a été récupéré et analysé pour estimer le potentiel osmotique.

Osmolarité (c) est estimée par osmomètre à pression de vapeur, WESCOR ,5500 est convertie en ψ_s (MPa) = -c (mosmoles kg⁻¹) x 2.58x10⁻³ Loi Vant't Hoff

Le potentiel hydrique foliaire a été mesuré au moyen d'une chambre à pression de SCHOLANDER. La mesure a été réalisée, entre 12 et 14 h de la journée, sur la dernière paire de feuilles.

3.3.4. La conductivité électrique

Le niveau de la salinité du sol est caractérisé par la conductivité électrique (CE) d'un extrait de pâte saturée. La mesure de la CE est réalisée à l'aide d'un conductimètre. La conductivité électrique correspond au mouvement de particules chargées à travers un matériau sous l'action d'un champ électrique. La conductance du liquide créant le contact entre les deux cellules est directement proportionnelle à la quantité de sels en solution et définit la CE de la solution. La conductivité électrique de la solution du sol a été mesurée

au niveau du premier horizon du sol (0 – 20 cm), en un point au voisinage de la touffe d'*Atriplex* qui a été échantillonnée pour la semence. La mesure doit être présentée en ds m^{-1} ($1 \text{ mmhos cm}^{-1} = 1 \text{ ds m}^{-1}$) [209]Kaira et Maynard 1991

3.3.5. Dosage des pigments chlorophylliens

Les teneurs en chlorophylles a et b et caroténoïdes sont déterminées selon le protocole de Lichtenthaler (1987) [210]. L'extraction est réalisée à froid par 25 ml d'acétone 80% pour environ 1 g de matière fraîche foliaire. Après 10 min de centrifugation à 5000 g, à 4°C, une mesure de l'absorbance est effectuée à 470, 663 et 645 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV-1605).

Les teneurs en pigments, exprimées en mg/g de PF, sont calculées à partir des équations suivantes :

$$\text{Chla} = 11,24 A_{663} - 2,04 A_{645}$$

$$\text{Chlb} = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{663}$$

$$\text{Chla} + \text{chlb} = 7,05 A_{663} - 18,09 A_{645}$$

$$\text{Cx} + \text{c} = 1000 A_{470} - 1,90 \text{ Ca} - 63,14 \text{ Cb} / 214$$

Chla et Chlb : Concentration en chlorophylles a et b ; Cx + c : Concentration en caroténoïdes).

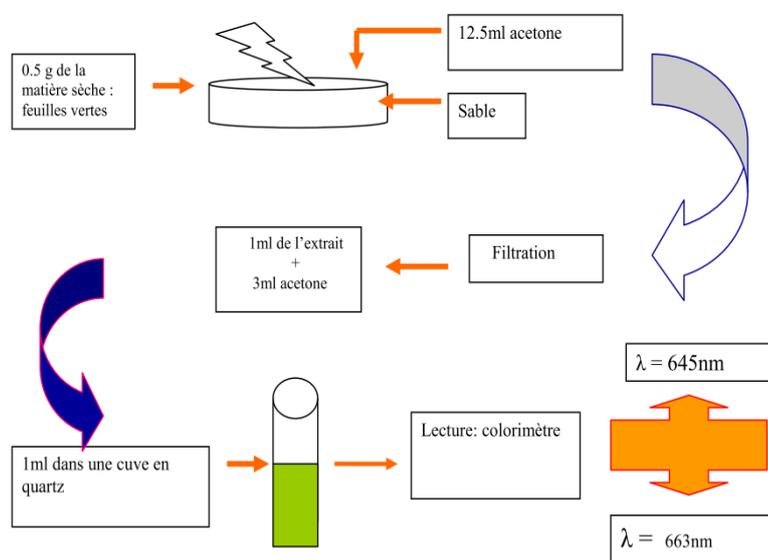


Figure 3.1 : Dosage de la chlorophylle

3.3.6 Estimation de peroxydation des lipides (MDA)

Les plantes soumises à des stress abiotiques (stress salin.) présentent une chaîne de peroxydation de lipides amenant finalement à la production de malondialdéhyde (MDA)(Figure 3.2).

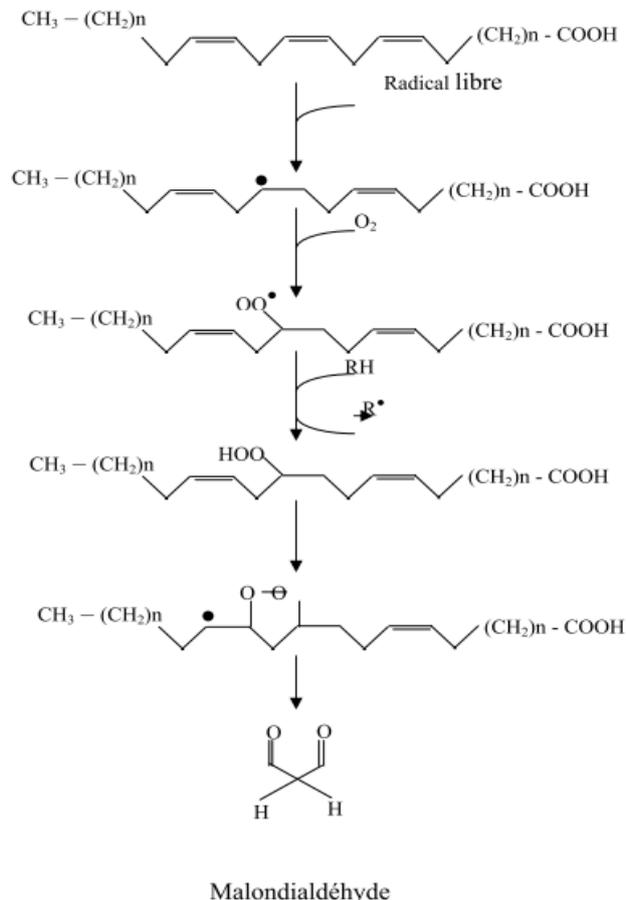


Figure 3.2 : Formation de malondialdéhyde suite à la progression de la chaîne de peroxydation des lipides en réponse à un stress oxydatif [211].

La peroxydation des lipides est estimée par mesure du malondialdéhyde (MDA) produit, capable de réagir avec l'acide 2-thiobarbiturique (Figure 3.3).

L'extraction et le dosage du MDA ont été réalisés selon les méthodes de Minotti et Aust (1987)[212] et Iturbe-Ormaetxe et al. (1998)[213]. L'extraction est réalisée par broyage d'environ 1 g de matière végétale foliaire congelée avec un mélange constitué de 5 ml d'acide métaphosphorique (5 %, p/v) et de 100 μl de butylhydroxytoluène (2 %, p/v dans l'éthanol). Après 30 min de contact, l'homogénat est centrifugé à 5 000 g pendant 20 min à 4°C. A 4 ml de surnageant, sont additionnés à 400 μl de butylhydroxytoluène (2 %, p/v dans l'éthanol).

p/v dans l'éthanol), 2 ml de HCl (25 %, v/v) et 2 ml d'acide 2-thiobarbiturique (1 %, p/v préparé dans NaOH, 50 mM).

L'homogénat est alors incubé à 95°C pendant 30 min et la réaction est arrêtée par refroidissement du mélange dans de la glace. Pour l'extraction du chromogène, 3 ml de 1butanol sont ajoutés à l'homogénat et l'ensemble est agité vigoureusement. Après 5 min de centrifugation à 500 g, l'absorbance est mesurée à 532 nm. Le contenu en MDA est calculé en utilisant le coefficient d'extinction molaire du MDA ($\epsilon = 155 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Le blanc est réalisé en remplaçant l'acide 2-thiobarbiturique par NaOH (50 mM).

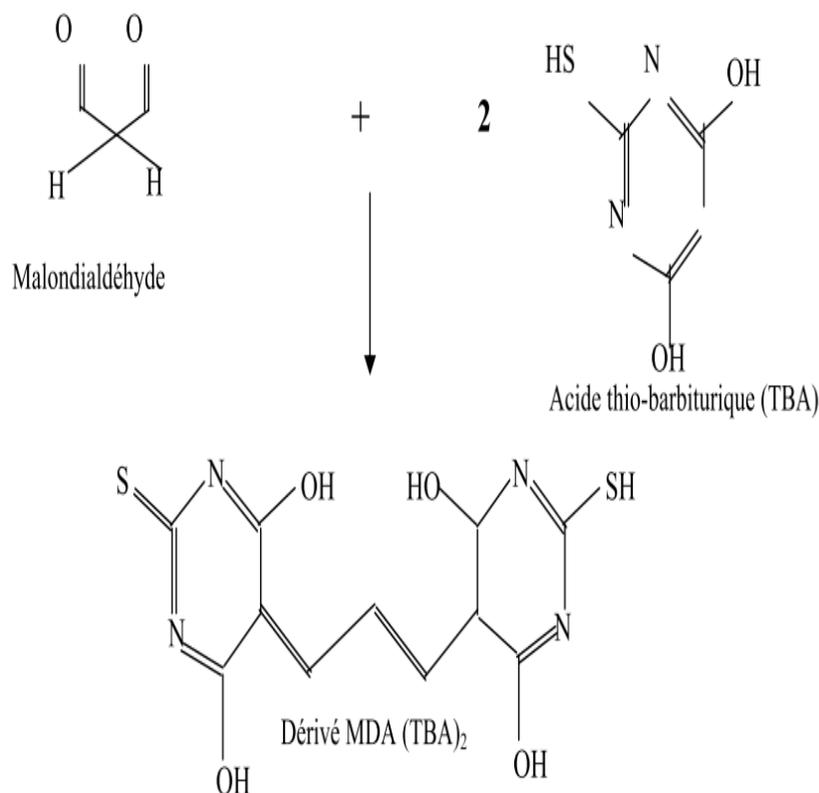


Figure :3.3 : Réaction de condensation du MDA avec l'acide thio-barbiturique formant le dérivé coloré :MDA (TBA)₂, mesuré par spectrophotométrie à 532nm.

3.3.7. Mesure du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La teneur de H₂O₂ est déterminée selon [214]Sergiev et al. (1997). Le matériel végétal (500 mg des tissus racinaires) est broyé à froid dans 2 ml d'une solution d'acide trichloroacétique (TCA) 0,1%. Après centrifugation à 10000 g pendant 20 minutes, 0.5 ml du surnageant est ajouté à 0.5 ml du tampon phosphate de potassium 10mM (pH 7) et 1 ml d'une solution 1M du KI.

L'absorbance est mesurée à 390 nm et la teneur en H₂O₂ est déterminée à l'aide d'une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions.

3.3.8. Dosage des sucres solubles totaux

En milieu acide et à chaud, les glucides solubles sont dégradés en furfural qui forme avec l'anthrone un composé bleu dont l'absorbance est mesurée au spectrophotomètre à 625 nm [215].

Nous avons procédé au dosage des sucres solubles dans les feuilles des plantes selon la méthode de Dubois, 1956 [216]. Elle consiste à mettre 100mg de matière fraîche dans des tubes à essai contenant 3ml de méthanol à 80%. On laisse à température ambiante pendant 48 heures. Au moment du dosage, les tubes sont placés dans une étuve à 80°C pour faire évaporer l'alcool. Dans chaque tube, on ajoute 20ml d'eau distillée. C'est la solution à analyser. Dans des tubes à essai propre, on introduit 1ml de la solution à doser auquel on ajoute 1ml de phénol à 5%. Les tubes sont soigneusement agités. On ajoute alors 5ml d'acide sulfurique concentré (96%, d=1.89) à l'aide d'une burette dont le jet tombe brutalement sur la surface du liquide. La température atteint alors environ 110°C. Après une agitation rapide au vortex, les tubes sont maintenus pendant 45mn à 5°C. Après un séjour de 30mn à l'obscurité, les mesures d'absorbance sont effectuées à une longueur d'onde de 485 nm. Enfin, les résultats des densités optiques sont rapportés sur une courbe étalon des sucres solubles.

3.3.9. Dosage de la proline

La proline est dosée selon la technique utilisée par la méthode [217] simplifiée et mise au point par Dreier et Goring (1974) et modifiée par Monneveux et Nemmar (1986).

Le principe est la quantification de la réaction proline-ninhydrine par mesure spectrophotométrique. La proline se couple avec la ninhydrine en formant un complexe coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proline dans l'échantillon. On met 100 mg de matière fraîche végétale dans des tubes à essai et on ajoute 2 ml de Méthanol à 40 %. Les tubes couverts (pour éviter la volatilisation de l'alcool) sont portés à l'ébullition au bain-marie à 85 °C pendant 60 min. Après refroidissement, 1 ml de la solution d'extraction est ajoutée à 1ml 1 ml de la solution d'extraction est ajouté 1 ml d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1 ml du mélange eau distillée -acide acétique –acide ortho phosphorique

L'ensemble est porté à ébullition au bain Marie durant 30 min. Après refroidissement des solutions, on ajoute 5 ml de toluène dans chaque tube. Après agitation au vortex

On procède à la lecture de la densité optique des échantillons avec le spectrophotomètre à la longueur d'onde de 528 nm (figure 3.4).

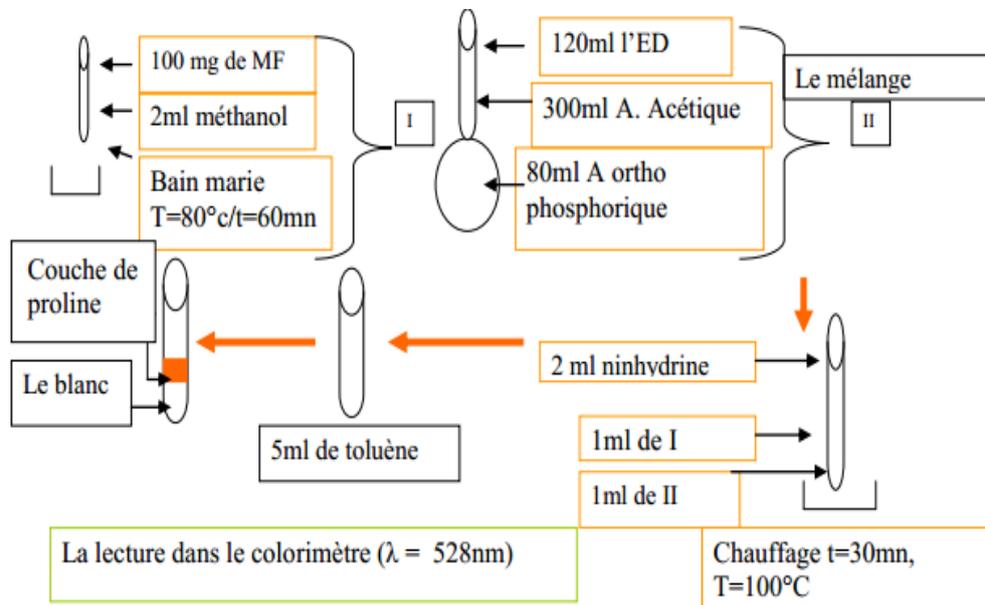


Figure 3. 4 : Dosage de la proline

3.3.10. Détermination de la teneur en acides aminés libres totaux

Tous les acides aminés réagissent avec la ninhydrine à 100°C pour former le pourpre de Ruheman [218].

Environ 1 g de matière fraîche foliaire est mélangé à 7 ml d'eau distillée dans un tube en verre. Les tubes, bouchés par une bille d'agate, sont placés dans un bain-marie bouillant (100°C) pendant 1 h. Après refroidissement dans de la glace, le mélange est broyé au Potter. Puis centrifugé à 5000 g pendant 10 min, à 4°C . Le culot subit une deuxième extraction avec 7 ml d'eau distillée (1 h au bain-marie à 100°C) puis le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 10 min et à 4°C . Les deux surnageants sont récupérés et filtrés sur un papier filtre.

Une partie aliquote de l'extrait (200 μl) est mélangée à 500 μl de tampon citrate (160 mM, pH 4,6 ajusté avec HCl 25 %). Après homogénéisation au vortex, 1 ml du mélange réactionnel ninhydrine-acide ascorbique est ajouté au broyat. Les tubes sont agités vigoureusement, et placés au bain-marie bouillant à 100°C pendant 20 min. Après refroidissement dans de la glace pilée, 3 ml d'éthanol à 70 % sont ajoutés et l'ensemble est agité vigoureusement. L'absorbance du chromogène est mesurée à 570 nm.

La solution de ninhydrine (54 mM : 0,575 g de ninhydrine dans 60 ml d'éthanol à 70%) est préparée extemporanément et additionnée de 2 ml d'acide ascorbique (1%, p/v). La réaction se déroule dans un milieu tamponné à pH 4,6.

Une courbe étalon est réalisée à partir d'une solution mère de leucine à 5 mM préparée dans l'eau distillée pour des valeurs comprises entre 0 et 200 nmoles de leucine. Les résultats seront exprimés en $\mu\text{moles d'équivalents leucine.g}^{-1}$ M.F.

3.3.11. Dosage des protéines solubles

Le dosage des protéines solubles s'est effectuée par la méthode BCA (voir paragraphe 3.3.14.3)

3.3.12. Dosage des composés ammoniums quaternaires(glycine bétaine)

Les plantes confrontées au stress hydrique et salin durant 21 jours ont été récoltées ; les racines et les feuilles ont été coupées en segments de 1cm de long, placés dans des tubes Eppendorff percés de 4 orifices et stockés à -20 °C. Les échantillons sont soumis à trois cycles de congélation –décongélation. Les tubes sont centrifugés à 15000g pendant 15 minutes. L'analyse des composés d'ammonium quaternaires porte sur le suc tissulaire recueilli.

Une aliquote de 100 μl a été diluée par un volume identique de H_2SO_4 2N et incubée dans de la glace durant 1h. Un réactif KI-I2 préparé selon les indications de[219] est ajouté aux échantillons à raison de 200 μl et l'ensemble est conservé durant 16h à une température comprise entre 0° et 4°C avant d'être centrifugé à 15000g pendant 15 minutes à 0°C. Les cristaux recueillis dans le culot sont ensuite dissous dans 9ml de 1,2dichloroéthane. Après deux heures d'incubation à température ambiante, l'absorbance est estimée à 365nm. Les teneurs en composés d'ammoniums quaternaire du suc cellulaire sont estimées en se référant à une gamme d'étalon préparée à partir de glycine bétaine pure.

3.3.13. Dosage des ions : par spectrophotométrie à flamme

Les teneurs en Na, K, ont été déterminés par digestion à l'acide nitrique et dosage par spectrophotométrie de flamme en émission.

Le dosage des cations Na^+ et K^+ dans les feuilles et les racines :Après séchage à l'étuve à 70°C pendant 72 heures, 100mg de matière sèche sont broyés et mis dans un creuset en porcelaine puis incinérés à 500°C pendant 5heures au four à moufle. Après refroidissement, 2 ml de HNO_3 /capsule sont ajoutés puis on remet au four pendant 1 heure. La cendre obtenue est dissoute dans 3 ml d' HCl (6N) puis filtrée et le volume est

amené à 50 ml. A partir de cette solution, les dosages de Na⁺ et K⁺ sont effectués par photométrie de flamme (Flame photometer corning 400).

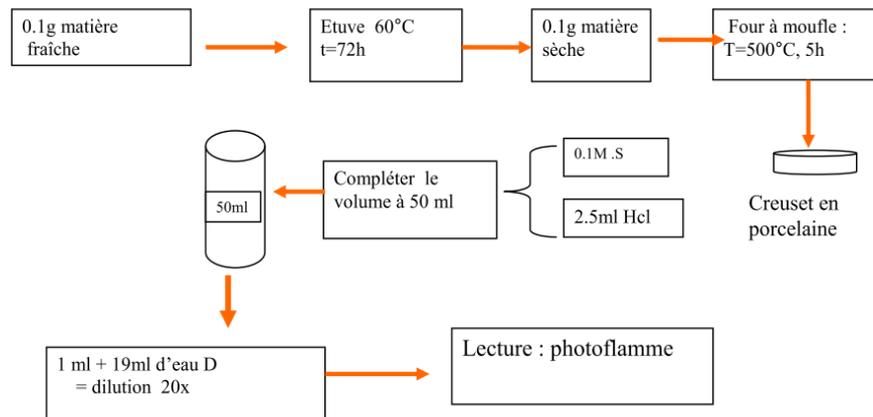


Figure 3. 5 Détermination des ions potassium Na⁺ et K⁺

3.3.14. Recherche des protéines de stress, par Electrophorèse SDS PAGE en conditions dénaturantes

3.3.14.1.Extraction des protéines solubles

Des échantillons de feuilles des deux écotypes de l'*Atriplex halimus* (stressées ou non) sont prélevées et plongées dans l'azote liquide. Ils sont conservés dans le congélateur à -80°C. Les échantillons sont broyés dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, puis repris dans 4ml de solution tampon de broyage Tris contenant un inhibiteur de protéase et un antioxydant. (Tableau 3.2) Pour faciliter l'extraction des protéines, les tubes sont placés sous forte agitation (248T) pendant 20 minutes à 4°C, puis centrifugé à 4°C pendant 20minutes à 20 000 rpm centrifugeuse (JA Beckmen). Le culot contient les membranes et débris cellulaires et le surnageant les protéines solubles . 1,5ml du surnageant sont prélevés et précipités avec 3ml d'acétone 80% et stocker au congélateur à -20°C au minimum pendant la nuit.

3.3.14.2. Extraction des protéines membranaires foliaires

Des échantillons de feuilles sont placés dans l'azote liquide. Le matériel végétal est broyé dans un mortier et la poudre obtenue est reprise dans 5ml de tampon d'extraction (tableau3.3)

Les débris végétaux sont filtrés sur une mousseline de porosité 48 µm. Les tubes contenant le filtrat sont placés dans de la glace puis sont agités dans la chambre froide pendant 30 minutes à 248t puis sont centrifugés pendant 20 minutes à 4°C à 20000rpm.

Le surnageant correspond à la fraction protéique soluble. 1,5ml du surnageant est précipité avec 3ml d'acétone 100%. Les tubes sont placés à -20°C pendant la nuit.

Le culot correspond à la fraction membranaire est suspendu dans un tampon Tris=50mM pH=8, SDS 1% permettant de solubiliser les protéines liées aux membranes. Les tubes contenant les culots sont agités dans la chambre froide à 4°C à 248t pendant 1heure.

Tableau 3.2: Tampon d'extraction des protéines.

	concentration
Tris-HCL pH8	50mM
β mercaptoéthanol	50mM
PMSF	1mM

Tableau3.3 :Tampon Tris-SDS

	concentration
Tris pH=8	50mM
SDS	1%

3.3.14.3. Dosage des protéines au BCA (Acide bicinchoninique)

Cette méthode permet de doser des quantités de protéines entre 2 et 100µg par tube. 100µl de protéines solubles et 200µl de protéines membranaires sont précipités à 80% d'acétone. Ces échantillons sont prélevés et centrifugés pendant 10 minutes à 14 000rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 50µl de SDS 0,2%(sodium Dodecyl Sulfate). Un blanc est préparé avec 50µl de SDS 0,2 %, ainsi que le réactif de couleur verte composé de 50 volumes de BCA incolore (9ml) et d'un volume de sulfate de cuivre bleue (180µl). 1ml de ce réactif est mis dans chaque tube à doser, on vortexe et on met les tubes à l'étuve à incuber pendant 30 minutes à 37°C. Une coloration violette apparaît correspondant à la formation de complexes colorés BCA-cuivre-protéines. La mesure de l'absorbance à 562nm est réalisée au spectrophotomètre mono faisceau UV-visible « Varian Cary 50 Scan). Les échantillons sont lus contre le blanc du dosage. La gamme est mémorisée dans le spectrophotomètre et les résultats sont donnés en µg par ml .

La quantité de solution à prélever pour avoir 200µg de protéines solubles et 100µg de protéines membranaires sont calculées d'après ces résultats. Les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 14000rpm à 4°C dans une chambre froide. Le surnageant est éliminé et le culot est ressolubilisé dans le tampon SBx1+DDT (tampon de charge

des protéines avec colorant et agent réducteur) (tableau 3.4). Une dénaturation à chaud est réalisée en mettant les tubes Eppendorf pendant 3 minutes à 95°C. Les tubes sont centrifugés quelques secondes pour culotter les protéines non solubilisées et stockées à -20°C.

Tableau 3.4 : Tampon de charge des protéines+DTT(x4) pour l'électrophorèse des protéines

	Concentration	Volume pour 10ml
Tris pH 6,8	0,24M	4,8ml
Glycérol	40%	4ml
DTT	0,4M	0,617g
SDS	8%	0,8g
Bleu de bromophénol	0,08	8mg

3.3.14.4. Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

Les protéines sont séparées par une électrophorèse SDS-PAGE [220]. Elle est réalisée pour séparer les protéines en fonction de leur vitesse de déplacement à un gel d'acrylamide sous l'effet d'un champ électrique. La migration se fait dans un tampon SDS-PAGE (Tableau 3.5) en présence d'un détergent anionique, le SDS qui dénature les protéines et les charge négativement de façon uniforme. Les protéines migrent essentiellement en fonction de leur taille. Le système d'électrophorèse utilisé est une cellule Mini-Protéine-II(BIO-RAD)

Tableau 3.5 : Tampon de migration SDS-PAGE (10X)

	Concentration	Pour 2L de solution
Tris HCL Ph6 ,8	250mM	60,6g
Glycine	1,92M	288,4g
SDS	1%	20g

La migration se déroule en 2 phases distinctes : une dans le gel de concentration (tableau 3.6) pour regrouper les protéines au même niveau (15 minutes à 90V), et l'autre dans le gel de séparation (tableau 3.7) pour séparer les protéines selon leur taille (150V jusqu'à la sortie du front de migration du gel). Les plus grosses molécules sont retenues dans les mailles du gel d'acrylamide migrent plus lentement.

Tableau 3.6: Composition des gels de concentration d'acrylamide à 5% (m/v)

	Concentration	Pour 20ml (4gels)
Eau		6ml
Acrylogel	40% (m/v)acrylamide	1,25ml
Tris-HCL pH=6,8	1,5M	2,5ml
SDS	10% (m/v)	100µl
APS	10% (m/v)	100µl
Temed	T-9281 Sigma	10µl

Tableau 3.7: Composition du gel de séparation d'acrylamide à 13% (m/v)

	Concentration	Pour 20ml (4gels)
Eau		8,1ml
Acrylogel	40% (m/v)	6,5ml
Tris-HCL pH=8,8	1,5M	5ml
SDS	10% (m/v)	200µl
APS	10% (m/v)	200µl
Temed	T-9281 Sigma	8µl

3.3.14.5. Révélation des protéines au bleu de Coumassie

Après électrophorèse en conditions dénaturantes, les protéines sont révélées au bleu de Coumassie pour vérifier le chargement. On récupère le gel, il est rincé 3 fois 5 minutes à l'eau bidistillée, puis on le met dans 10ml de solution de Bleu de coumassie « Biosafe » (Bio-Rad). Pendant 1 heure sous agitation. Ce traitement permet de révéler les protéines, les marqueurs de taille et de vérifier l'homogénéité du chargement. Après rinçage dans de l'eau, le gel est coloré est ensuite scanné avec le système Odyssey (LICOR) et traité avec le logiciel associé). La révélation au bleu de Coumassie permet une détection de protéine à un seuil de sensibilité d'environ 0,1µg.

3.3.14.6. Electro-transfert des protéines sur membrane Nitrocellulose :western Blot

Cette technique permet d'immobiliser les protéines sur une membrane de nitrocellulose par des liaisons covalentes. On utilise un « électro-blotter « Tran-Blot SD », (BIO-RAD) composé d'une anode en platine et d'une cathode en acier inox (figure3.6) . Sur le socle (anode), on dépose successivement un papier épais, une feuille de papier Watman, la membrane de nitrocellulose (0,45µm de porosité, Pall-Gelman Sciences), le gel d'électrophorèse est surmonté d'un papier épais. Le tout est préalablement trempé dans un tampon de transfert SDS-PAGE contenant 10% d'éthanol (Tableau 3.8).

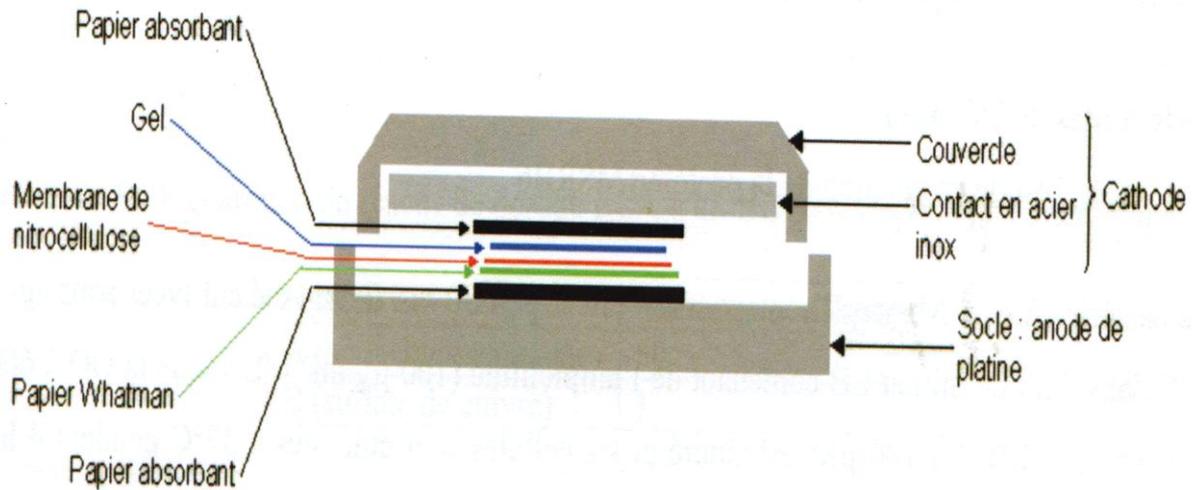


Figure :3. 6 schéma du système de transfert des protéines sur membrane nitrocellulose

Tableau 3.8 Tampon de Transfert SDS-PAGE x10.

	Concentration
Tampon SDS-PAGE	1X
Ethanol	10%

On applique un voltage de 10V pendant 30 minutes. La membrane est ensuite trempée quelques minutes dans une solution de rouge Ponceau (tableau3.9) afin de vérifier le transfert des protéines sur la membrane et de repérer le marqueur de taille. La membrane est rincée à l'eau bidistillée pour éliminer le rouge

Tableau 3.9. Solution de Rouge de Ponceau

	Concentration
Rouge de Ponceau	2%
TCA	3%

3.3.14.7. révélation immunologique

Le principe de cette manipulation est de révéler spécifiquement une protéine immobilisée sur une membrane en utilisant un anticorps dirigé contre elle.

a) Révélation avec la phosphatase alcaline

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant 30 minutes à température ambiante dans une solution de passivation contenant 5% de lait écrémé . Ce mélange très riche en

protéines permet de bloquer les sites non spécifiques de fixation des anticorps. La membrane est ensuite incubée dans 10ml de TBST 1X contenant l'un des anticorps primaire spécifique issus de sérum de lapin ou de souris, dans les conditions représentées dans le tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Anticorps primaires utilisés au laboratoire et condition d'incubation

Antigène utilisé(production chez le lapin)	Cible protéique	Dilution	Temps D'incubation	Température d'incubation
Séquence de 17acides aminés issues de MsrB1(I77MC ,I77LZ)	MsrB1 et MsrB2	1/500	2H	ambiante
MsrAchloroplastique du peuplier(I3OJR)	PMsrA4	1/2000	45 min	ambiante
CDSP34	CDSP34	1/500	Toute la nuit	4°C
CDSP32(I3635)	CDSP32	1/1000	toute la nuit	4°C
PrxQ	prxQ	1/2000	Toute la nuit	4°C
2 Cyst-Prx (BaS1)I3I09	Bas1	1/10000	1H	ambiante
PrxIIE	PrXIIE	1/2000	Toute la nuit	4°C

Chaque membrane est ensuite rincée 3fois 10 minutes avec du tampon TBSTx1 (tableau 3.11), puis incubée avec 10ml de tampon TBST1x contenant l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (sigma) pendant 1 heure dilution au 1/10000ième. Cet anticorps est dirigé contre les immunoglobulines G de lapin et se fixe donc sur l'anticorps primaire. Après 3 rinçage de 10 minutes dans du TBST 1x, la membrane est incubée quelques minutes dans le tampon phosphatase alcaline (tableau 3.12) afin de remonter le pH à 9,5 qui est optimal pour l'activité de l'enzyme.

Tableau 3.11 : Tampon TBS-Tween (10X) et TBS (10X)

	TBST	TBS
Tris pH8	250mM	121,2
NaCl	1,4M	58,44
KCl	27mM	74,55
Tween 20	2%	

Chaque membrane est ensuite mise en présence du tampon de réaction contenant du NBT (tableau 3.13) et du BCIP (tableau 3.14) : 66µl de chaque solution sont utilisées pour 10ml de tampon phosphatase alcaline. L'énergie libérée par la déphosphorylation du BCIP entraîne l'apparition d'un précipité violet de NBT. Ceci indique la reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire, et révèle donc la position de la protéine recherchée.

L'intensité de chaque bande révèle le niveau d'expression de la protéine recherchée. La révélation est arrêtée par ajout d'eau bidistillée.

Tableau 3.12 : Tampon phosphate alcaline

	Concentration
Tris -HCLpH9	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂ , 6H ₂ O	5mM

Tableau 3.13: Solution NBT

	Concentration
NBT=Nitro-bleue-tétrazolium	5% p/v)
Diméthylformamide	70%(v/v)

Tableau3.14 : Solution de BCIP

	Concentration
BCIP=5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphate	2,5%(p/v)
Diméthylformamide	97.5%(v/v)

b) Technique basée sur la fluorescence (LICOR)

Cette technique est utilisée pour la 2cyst-prx oxydée pour cela, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire produit chez le lapin (dilué au 1/4000 dans TBST) contre la forme suroxydée de la 2 Cyst Prx (LAB Frontier) pendant 2H ou avec l'anticorps I3109 (dilué au 1/10000 dans TBST) produit aussi chez le lapin et dirigé contre toutes les formes de 2 Cyst Prx pendant 1 heure sous agitation à température ambiante. Après 3 lavages au TBST, la membrane est incubée pendant 30 minutes dans du TBST avec les anticorps secondaires produit chez la chèvre : soit un anti-IGG de lapin couplé à une molécule fluorescente « Alexa fluor 680 »(Invitrogen) (dilution au 1/10000), pour détecter l'anticorps contre la forme suroxydée, soit un anti-IGG de lapin couplé à la phosphatase alcaline(SIGMA A3687 au 1/10 000) pour détecter l'anticorps I3109, à température ambiante, sous agitation et à l'obscurité. Trois étapes de lavage de la membrane avec du TBST sont réalisés. Un lavage supplémentaire à l'obscurité de la membrane est réalisé avec du TBS(tableau3.11) pour la révélation de la forme suroxydée.

La révélation suroxydée de la 2 Cys-Prx est effectuée en utilisant le scanner Odyssey (LICOR) et le logiciel associé. La molécule Alexa fluor 680 absorbe à 680nm et réémet un signal de fluorescence rouge. La quantité totale de la 2 Cyst Prx est révélée par l'incubation de la membrane dans 10 ml de tampon phosphatase alcaline à pH 9.5(Tableau3.15), 66 µl de NBT à 5% (tableau 3.16) et 66 µl de BCIP à 2.5% (tableau3.17) jusqu'à l'apparition d'un précipité coloré de formazan. Le principe de cette révélation est basée sur la déphosphorylation du substrat BCIP par la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps. Ceci libère de l'énergie qui est capté par le NBT et résulte en un précipité violet à l'endroit où il y a eu déphosphorylation.

Tableau3.15 composition du Tampon PBS Ph 7.4

composé	Concentration
NaCL	137mM
KCL	47mM
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	2mM

3.3.14.8. Numérisation des gels ,des membranes et analyse par logiciel

Après migration et coloration au bleu de Coomassie et immunodétection les gels et membranes de nitrocellulose sont numérisés à l'aide de l'Image Scanner (Odyssey

LICOR et le logiciel associé). Les paramètres utilisés sont les suivants : travail en transmission, source rouge, image 16 bits et résolution à 300 dpi.

3.3.15. Analyse de l'activité des enzymes anti-oxydantes : catalase ,Peroxydase et MSR

Extraction des enzymes. Deux cents milligrammes de feuilles sont broyées dans l'azote liquide et homogénéisées dans 1ml de tampon 50Mm Tris-HCl (pH 8,0), en présence de 1mM PMSF. Après centrifugation,(16,000xg, 20min à,4°C) le surnageant est utilisé pour la détermination de la teneur en protéines solubles totales ainsi que l'activité de la catalase et Peroxydases et MSR

3.3.15.1 Dosage des protéines solubles totales.

Les protéines solubles sont dosées selon la méthode de bicinchoninic acid (BC Assay Reagent, Interchim, Montluçon, France). La teneur en protéines (mg.g^{-1} poids frais) est déterminée par référence à une gamme étalon préparée à partir d'une solution contenant le réactif Acide bicinchoninique.

3.3.15.2. Mesure de l'activité des MSR par HPLC

L'activité des MSR des extraits de feuilles a été dosée en recherchant la réduction d'un substrat synthétique le Dabsyl-Metso en présence du DTE [221]. La préparation du Dabsyl-MetO a été décrit par Vierrados santos et al.,2007 [222]. Des échantillons de feuilles ont été broyés dans l'azote liquide, la poudre a été remise en suspension dans des tubes de 2ml (le nombre de tubes varie suivant le nombre d'échantillons) dans 800 μl de tampon HEPES dont la composition est :15mM HEPES Ph=8,10mM de MgCl_2 ,30mM KCL ,1mM phénylméthylsulfonylefluoride (PMSF). Les extraits sont centrifugés à15000g pendant 15minutes à 4°C . On prélève le surnageant (500 μl) ensuite ils sont transférés dans de nouveau tubes et le dosage des protéines a été effectuée par la méthode décrite ci-dessus(Méthode BCA) (Appendice B).

On prépare une autre série de tubes de 1,5ml ,on met dans chaque tube 45 μl de SDS(0,2%)+5 μl de protéines (qu'on prélève dans les 500 μl du surnageant),dans le tube témoin on met 45 μl de SDS(0,2%),on rajoute 1ml de réactif A et B (réactif BCA)dans les tubes témoin et essais . On met les échantillons dans l'étuve à 37°C pendant 30minutes, ensuite on dose les protéines au spectrophotomètre (Appendice B)

Le mélange réactionnel contient 300 μg de protéines , 15Mm HEPES, Ph 8 ,10mM MgCl_2 ,30mM de KCL,20mM DTE,0,25mM Dabsyl-MetSO dans un volume de 100 μl , le tout est incubé au thermomixer pendant 3H à37°C à450rpm . La réaction a été stoppée en ajoutant 900 μl d'ethanol- acétate 29mM, Ph 4,16 (50 :50,V/V). Après centrifugation à 13000g pendant 30 min à 4°C , 500 μl sont prélevés et mis dans tubes spéciaux pour

HPLC, 160µl sont prélevés et analysés par HPLC en phase inverse du Dabsyl-Met (voir tableau Appendice B).

Lors d'une chromatographie en phase inverse, la séparation des molécules se fait suivant leur degré d'hydrophobicité. La colonne utilisée porte une résine couplée à de longues chaînes carbonées (C18) la rendant très hydrophobe. Colonne C18 En milieu acide, les molécules à séparer ont un degré d'hydrophobicité leur permettant de s'adsorber sur la résine. L'élution nécessite l'ajout en quantité croissante d'un solvant apolaire. Les molécules sont désorbées de la résine lorsque le degré d'hydrophobicité du solvant est supérieur à celui de la résine. Le Dabsyl-MetSO étant plus hydrophobe que la forme réduite, est élué plus rapidement.

Les différents solvants utilisés ont été : le solvant A (acétate 29Mm, Ph4) et le solvant B (acétonitrile). Le débit a été de 0,8ml.min⁻¹ à température ambiante. La longueur d'onde du détecteur a été réglée à 466nm pour déterminer l'absorbance. La colonne utilisée est de type « Symmetry C18 » 5µm, 3X250mm (Waters, Milford, MA). Le programme utilisé pour l'analyse des réactions enzymatiques démarre à 30% de solvant B pour atteindre 67% en 2min, puis 100% en 0,5 min. Après 3,3min la concentration en solvant redescend à 30% en 0,2min. La résine est équilibrée à 20% pendant 4,3 min. Le programme dure 8 min. Le flux est de 1,0ml.min⁻¹ à température ambiante. Dans ces conditions le Dabsyl-MetSO est élué à 3min et le Dabsyl-Met est élué à 4,3 min.

3.3.15.3. Mesures de l'Activité des Catalases par Spectrophotométrie

Mesure de l'activité enzymatique. L'activité CAT est mesurée selon la méthode Aebi, (1984) [223] en suivant la diminution de l'absorbance du milieu réactionnel (50Mm de tampon potassium phosphate pH 7, 10Mm de H₂O₂ (Sigma Aldrich) + 100µg de protéines foliaires) à 240 nm pendant 2 min, après addition de H₂O₂. La décomposition de H₂O₂ a été déterminée en suivant le déclin dans l'absorbance à 240 nm pendant 1 min. La quantité de CAT est calculée sur la base du coefficient d'extinction molaire $S = 40 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.3.15.4. Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPOX)

Le dosage repose sur l'utilisation du gaïacol comme substrat des peroxydases. En présence de l'eau oxygénée il y a formation de tétragaïacol qui présente un maximum d'absorption à 470nm permettant donc de déterminer l'activité enzymatique. (figure 3.7)

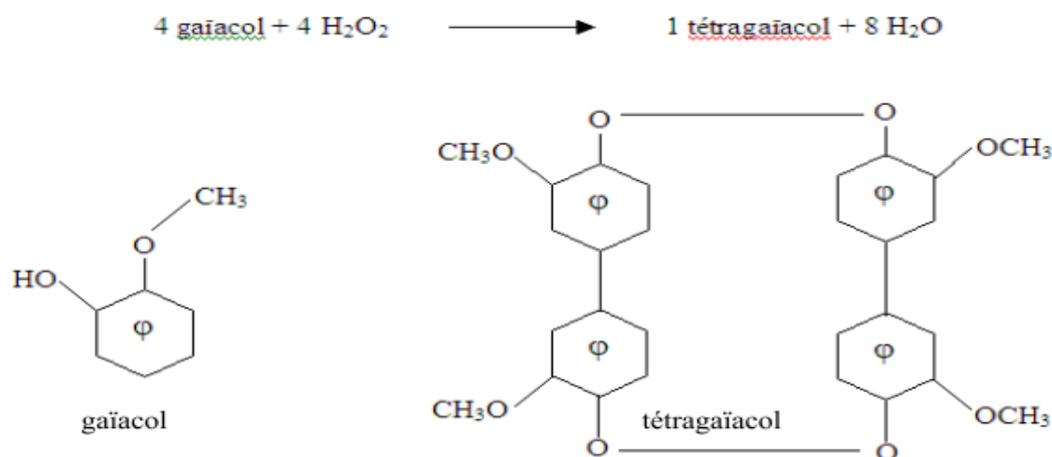


Figure 3.7: réaction d'oxydation du gaïacol en tétragaïacol en présence du H2O2 [224] permettant de mesurer l'activité de la GPOX.

L'extraction de la GPOX est réalisée à partir de 500 mg de matière végétale fraîche par 6 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6,5), dans de la glace. Après une centrifugation de 10 min à 5000 g, le surnageant est récupéré et maintenu à 4°C jusqu'à utilisation. L'activité GPOX est déterminée selon le protocole décrit par Mac Adam et al., (1992)[224] légèrement modifié. A 100 µl d'extrait enzymatique est ajouté le mélange réactionnel constitué de 2,7 ml de tampon phosphate (100 mM, pH 6,5), 100 µl d'une solution de gaïacol (18 mM) et 100 µl de H2O2 (obtenu en diluant 100 fois une solution commerciale à 3 %). La réaction débute dès l'addition de 100 µl d'extrait enzymatique au mélange réactionnel (volume final de 3 ml).

L'activité enzymatique est suivie en fonction du temps à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV-1605) par mesure de l'absorbance à 470 nm. L'activité enzymatique est exprimée en µmol gaïacol oxydé. min⁻¹.g⁻¹ M.F., en utilisant la valeur de coefficient d'extinction de tétragaïacol (ϵ : 26,6 mM⁻¹.cm⁻¹).

3.3.16. Caractérisation des antioxydants de nature non enzymatique

3.3.16.1 Dosage des phénols totaux :

La teneur en phénols totaux des extraits des plantes a été déterminée par la méthode de Singleton et Ross (1965) [225] utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Un volume de 200 µl pour chaque extrait est introduit dans des tubes à essais, le mélange (1 ml de Folin Ciocalteu dilué 10 fois et 0.8 ml de carbonate de sodium à 7.5 %) est additionné. Les tubes sont agités et conservés durant 30 min.

L'absorbance est mesurée à 765 nm en utilisant le spectrophotomètre Jenway 6405 UV/Vis. Une courbe d'étalonnage à différente concentration d'acide gallique a été préparée.

Les teneurs en phénols totaux dans les extraits sont exprimées en milligramme (mg) équivalent d'acide gallique par gramme (g) du poids de la matière sèche (mg EAG/ g MS).

3.3.16.2. Dosage des flavonoïdes :

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode colorimétrique adaptée par Zhishen et al (1999)[226]. Une quantité de 500 µl de solution méthanolique de catéchine à différentes concentrations ou de l'extrait méthanolique dilués est ajoutée à 1500 µl de l'eau distillée. Au temps zéro, 150 µl de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5 % est ajouté au mélange. Après 5 min, 150 µl de trichlorure d'aluminium (AlCl₃) à 10 % (m/v) est rajouté. Après l'incubation de 6 min à la température ambiante, 500 µl d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1 M) est additionné Immédiatement, le mélange est complètement agité. L'absorbance de la solution de couleur rosâtre est mesurée à 510 nm contre le blanc. La teneur en flavonoïdes totaux des extraits des de feuilles est exprimée en milligramme (mg) équivalents de catéchine par gramme (g) du poids de la matière sèche (EC)/g.MS

3.3.17. Analyses statistiques :

Les expériences décrites ci-dessus ont été répétées au minimum trois fois et les résultats montrent les mêmes tendances.

Les données expérimentales sont soumises à une analyse de la variance en utilisant le logiciel spécifique « statistica version 6 » les groupes homogènes ont été réalisés par le logiciel « excel stat 2009) en utilisant le Test de Newmen-Keuls

Pour la deuxième partie de notre travail: Les données expérimentales sont soumises à une analyse de la variance à 2 facteurs : populations et traitements(Nacl ,PEG) en utilisant le test t de Student (Sigma stat).

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Réponses physiologiques et biochimiques des plantules d'*Atriplex halimus* au stress salin

4.1.1. Effets du NaCl sur la croissance relative, le contenu relatif en eau et le potentiel osmotique

4.1.1.1. la croissance relative

L'examen de la figure 4.1 montre que l'addition du NaCl induit une augmentation de la croissance relative de la partie aérienne des plantes à 150mM, ceci confirme le caractère halophile de l'*Atriplex halimus*. cet effet stimulant disparaît à 300mM où il se produit une diminution de cette croissance. L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif des doses de NaCl ($p < 0.001$) (Appendice C, tableau29). Le test de Newman et keuls a permis de classer les moyennes relatives à 4groupes homogènes (Appendice C, tableau1). La figure 4.1 montre que l'addition du NaCl aux plantules d'*Atriplex halimus* provoque une diminution significative de la croissance relative des racines. L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif des doses de NaCl ($p < 0.001$) (Appendice C, tableau30). Le test de Newman et keuls a permis de classer les moyennes relatives à 3groupes homogènes (Appendice C, tableau2).

4.1.1.2. Le contenu relatif en eau

Le contenu relatif en eau est in affecté par le NaCl aux niveaux des racines (Appendice C, tableau4). L'analyse de la variance montre des résultats non significatifs (Appendice C, tableau30). Par contre au niveau des feuilles, une déshydratation est observée en présence de 450 et 600mM de NaCl (Figure 4.1B) une diminution très significative est observée pour le contenu relatif en eau. Cette diminution est respectivement de 30% et 35% par rapport au témoin. L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif des doses de NaCl ($p < 0.001$) (Appendice C, tableau31). Le test de Newman et Keuls a permis de classer les moyennes à 3 groupes homogènes (Appendice C, tableau3)

4.1.1.3. Le potentiel osmotique

Le potentiel osmotique du suc cellulaire extrait des feuilles et des racines diminue avec l'augmentation de la salinité dans le milieu (figure 4.2). Au niveau des feuilles, il est toujours nettement négatif que celui des racines. Le sel a donc induit une diminution du

potentiel osmotique dans tous les cas. L'analyse de la variance montre un effet très hautement significatif des doses de NaCl ($p < 0.001$) au niveau des feuilles (Appendice C, tableau 33) et des racines (Appendice C, tableau 34). Le test de Newman et Keuls a permis de classer les moyennes à 4 groupes homogènes (Appendice C, tableau 5 et 6)

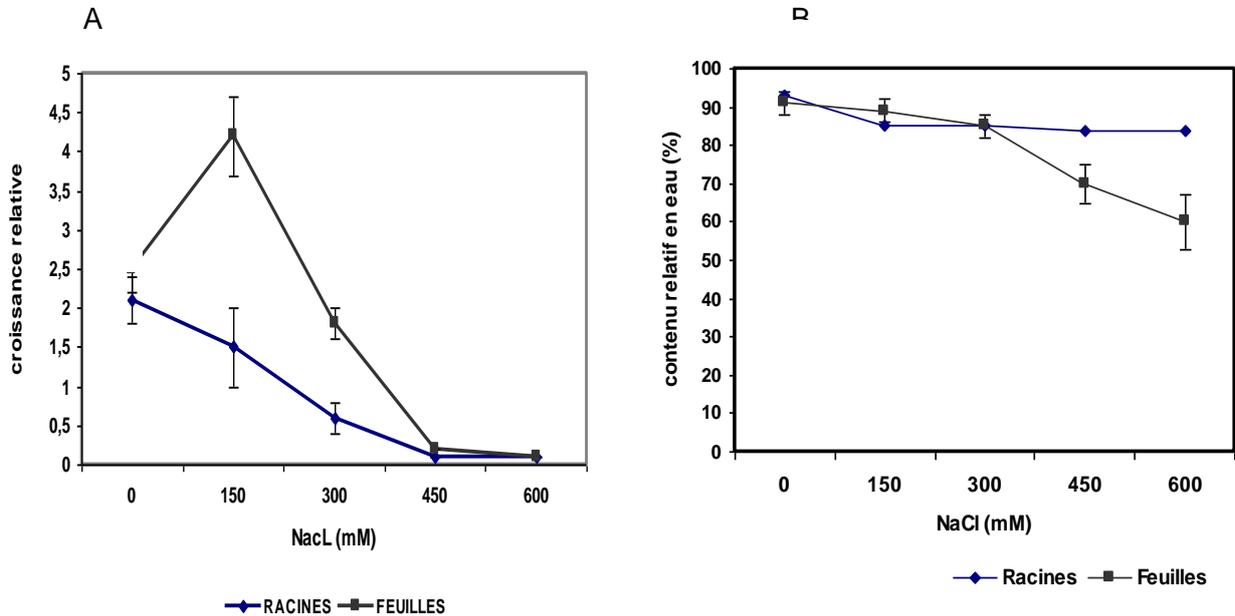


Figure 4.1 : Effet du stress salin sur la croissance relative des feuilles et des racines (A) et leur contenu relatif en eau (B). Les plantes sont exposées au NaCl pendant 18J. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences indépendantes. Les bars verticales représentent les écarts types. (avec 6 mesures chacune).

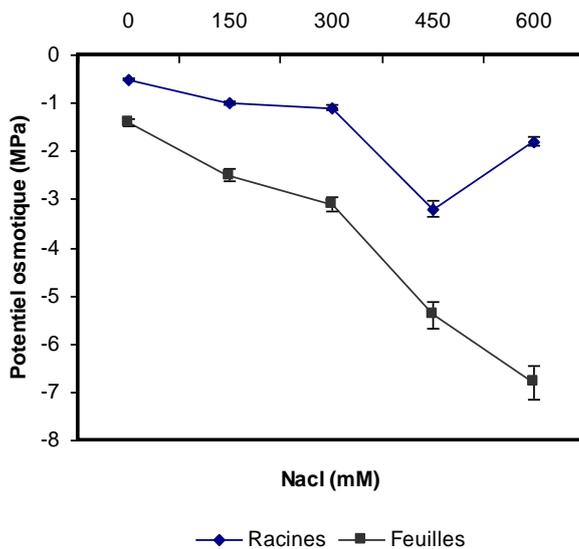


Figure 4.2: Effet du stress salin sur le potentiel osmotique au niveau des feuilles, et des racines. Les plantes sont exposées au NaCl pendant 18J. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences indépendantes. Les bars verticales représentent les écarts types.

4.1.2. accumulation des solutés inorganiques Na⁺ et K⁺

La figure 4.3 A présente les teneurs en Na⁺ en fonction des concentrations en NaCl. La teneur en Na⁺ au niveau des feuilles augmente avec la concentration en NaCl, à 150mM sa teneur atteint 200µmoles /g de MS. Elle se poursuit jusqu'à 600mM où la concentration en Na⁺ tissulaire représente environ 350µmoles/g de MS. L'analyse de la variance montre que l'augmentation de concentration en NaCl, a un effet très significative sur l'accumulation de Na⁺ tissulaire.(Tableau 33, 34, appendice C). Par ailleurs le test Newman et Keuls au seuil de 5% (figure 4.3A), permet de classer les différents traitements dans 4 groupes homogènes .(Tableau7, appendice C)

Pour les Teneurs en Na⁺ au niveau des racines , L'analyse de la variance aboutit à un effet très hautement significatif des concentrations en NaCl sur les teneurs en sodium et le test de Newman-Keuls au seuil de 5% (tableau 34 ,appendice C) classent les moyennes en 4 groupes homogènes .Par ailleurs, il faut souligner que pour tous les traitements, les teneurs en Na⁺ enregistrées au niveau de la partie aérienne sont supérieures à celles enregistrées dans la partie racinaire. La capacité de ce végétal à accumuler du sodium est donc préférentiellement localisée dans sa partie aérienne.

La teneur en K⁺ des tissus de la partie aérienne diminue progressivement au fur et à mesure que la concentration en chlorure de sodium augmente, cette diminution se poursuit jusqu' à 450mM. L'analyse de la variance montre qu'il existe une différence très hautement significative entre les différents traitements (P<0.0001) (tableau 35 ,appendice C) . Le test de Newman et Keuls au seuil de 5% (figure 4.3B), révèle que ce sel affecte particulièrement l'assimilation du potassium entre les concentrations de 150,300,450mM de NaCl tableau 9 ,appendice C)

La teneur en K⁺ des tissus de la partie souterraine diminue progressivement au fur et à mesure que la concentration en chlorure de sodium augmente. L'analyse de la variance montre qu'il existe une différence très hautement significative entre les différents traitements (P<0,0001)(Tableau 36 ,appendice C et le test de Newman-Keuls au seuil de 5% (tableau10,appendice D)classent les moyennes en 3classes. Les teneurs enregistrées dans la partie racinaire des plantes traitées par 0, 150mM ,300Mm de NaCl présentent des moyennes respectives de 54.30 ,40.52 et 30.25 µmol /g MS.

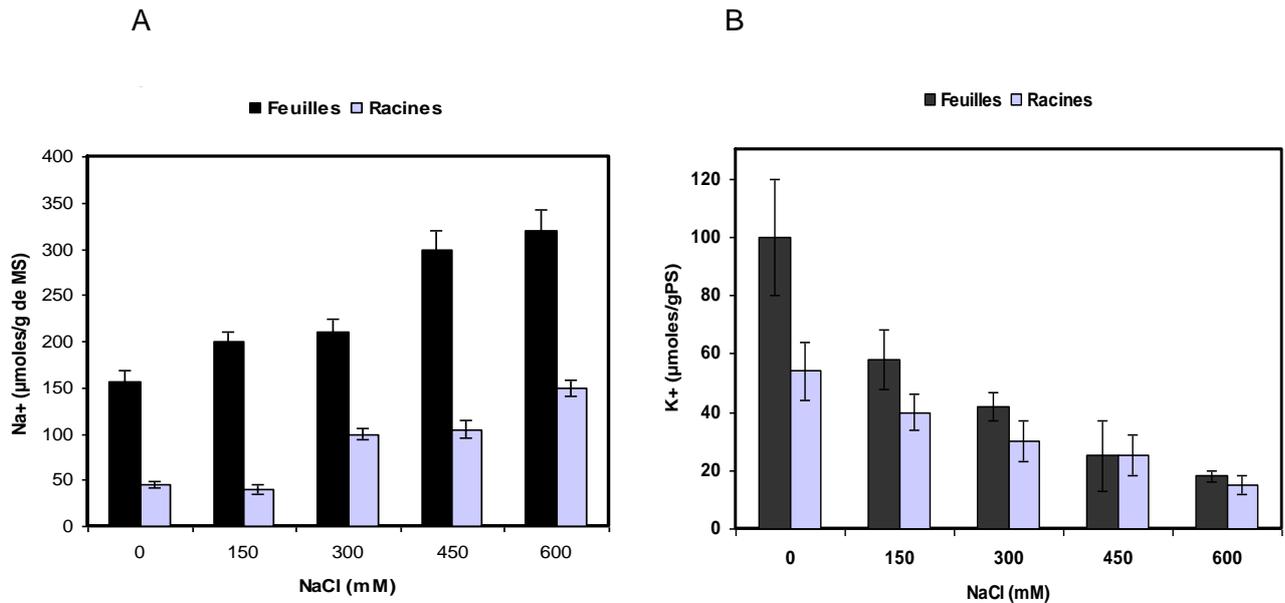


Figure 4.3 : Effet du stress salin sur l'accumulation de Na⁺(A) et K⁺(B) au niveau des feuilles et des racines. Les plantes sont exposés pendant 18J au sel . Chaque valeur représente la moyenne de 6 répétitions+ écart-type. Les bars verticales représentent les écarts types.

Le potassium accuse une réduction notable de sa teneur pour une concentration 150mM NaCl. Cette teneur est peu modifiée au niveau des racines quand la concentration dépasse les 450 mM de NaCl. Plus généralement, il faut signaler qu'en dehors des fortes concentrations de NaCl, les teneurs en K⁺ sont toujours plus élevées au niveau de la partie aérienne par rapport à la partie racinaire.

En établissant la relation entre les teneurs en Na⁺ et le poids sec des feuilles , une corrélation négative est observée entre le poids sec des feuilles et accumulation de sodium ($r = -0,8$, $F=8,2$, $p=0,071$) chez *Atriplex halimus* (figure 4.4 a), de même nous avons établie la relation entre le taux de croissance relative des plantules et le rapport K⁺/Na⁺. La figure4.4 B nous montre une corrélation négative entre ces deux paramètres

($r = -0,79$, $F=8,1$ $p= 0,52$).En ce qui concerne la relation entre le contenu relatif en eau et la teneur en Na⁺, la figure 4.4C montre une corrélation positif entre ces deux paramètres($r= 0,48$, $F=1,2$ $p= 0,43$).

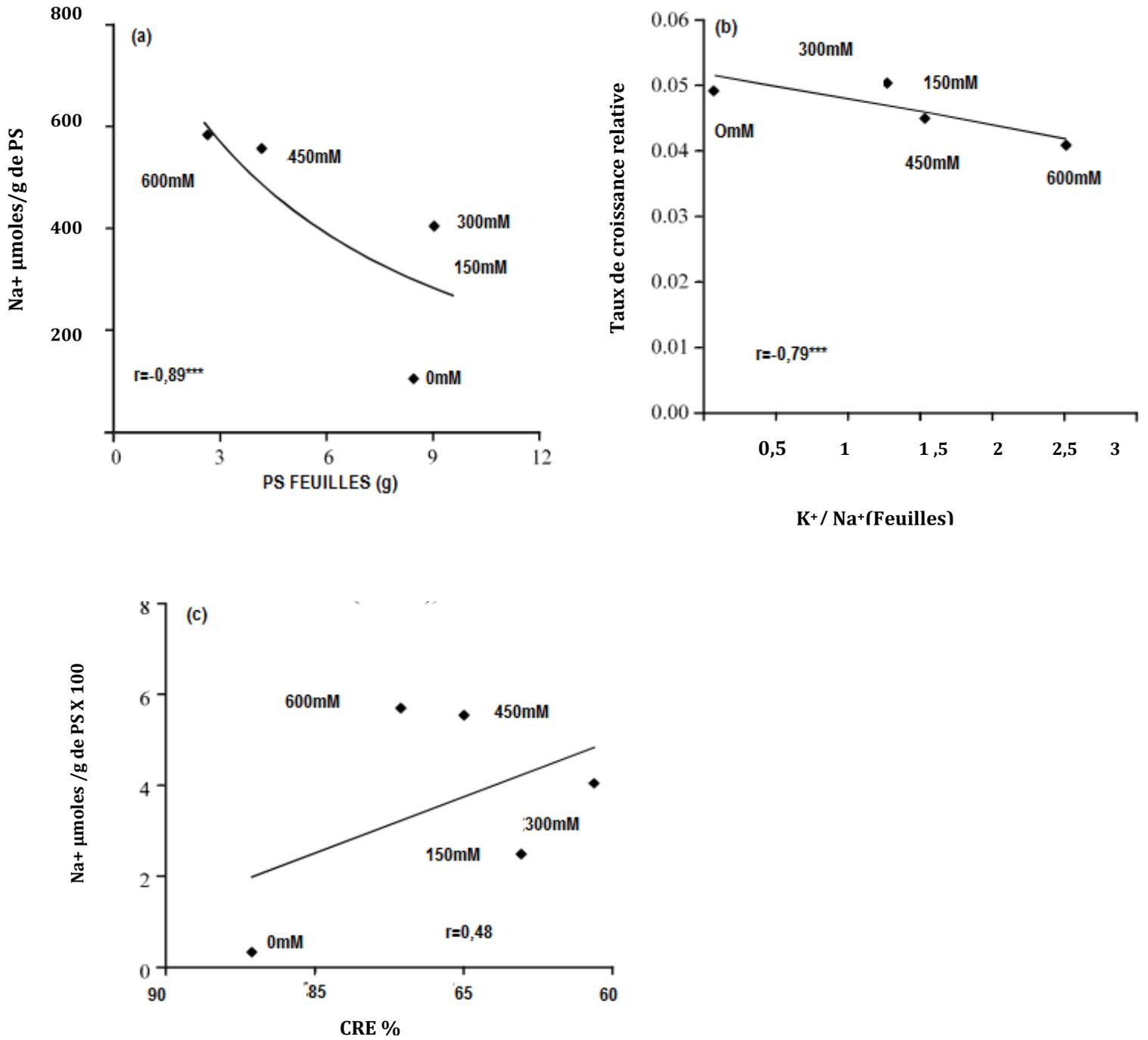


Figure 4.4 Corrélation entre le poids sec des feuilles et la teneur en Na⁺ (A), le taux de croissance des plantules et le rapport K⁺/ Na⁺ (B), le contenu relatif en eau et la teneur en Na⁺ (C) .

4.1.3 Accumulation des solutés organiques

4.1.3.1 La proline

Le métabolisme des végétaux est perturbé par le stress salin et notamment le métabolisme des acides aminés libres dont la proline constitue un marqueur de la résistance des plantes aux contraintes abiotiques.

L'analyse de la variance à un critère de classification montre une différence très hautement significative ($p < 0,0001$) (Appendice C, tableau 37). L'accumulation de la proline, dans les feuilles et les racines, augmente progressivement avec l'intensité du stress salin. La teneur en proline totale augmente de 7 fois à 300mM de NaCl par rapport au témoin au niveau des feuilles. Pour la partie racinaire, la figure 4.5A montre une accumulation de cet acide aminé dans les racines des plants cultivés en présence des fortes concentrations salines (la teneur en proline est de 0.5 $\mu\text{moles/g MS}$ pour le témoin, et elle est de 50 $\mu\text{moles/g MS}$ pour 450mM de NaCl). L'analyse de la variance montre un effet positif et très hautement significatif des concentrations en NaCl sur la teneur en proline au niveau de la partie racinaire du végétal ($P < 0.0001$) (Appendice C, tableau 38). Par ailleurs, il faut souligner que pour tous les traitements, les teneurs en proline observées au niveau de la partie aérienne sont supérieures à celles observées dans la partie racinaire. La capacité de ce végétal à accumuler la proline est donc préférentiellement localisée dans sa partie aérienne

4.1.4.2 Acides aminés

La figure 4.5C montre que la salinité provoque une accumulation des acides aminés dans la partie aérienne de l'*Atriplex halimus*. Cette accumulation est d'autant plus importante que la concentration en sel dans le milieu est élevée. L'analyse statistique indique que l'action de la salinité sur l'accumulation des acides aminés est significative (Appendice C, tableau 39). Au niveau des racines, la contrainte saline ne produit aucune différence significative sur l'accumulation des acides aminés (Appendice C, tableau 40)..

4.1.4.3. Sucres solubles totaux

La figure 4.5B montre que la salinité provoque une accumulation des sucres totaux dans la partie aérienne de l'*Atriplex halimus*. Cette accumulation est d'autant plus importante que la concentration en sel dans le milieu est élevée. La quantité accumulée des sucres totaux est de l'ordre de 7,5 $\mu\text{moles/g PF}$ pour le témoin alors qu'elle atteint 70 $\mu\text{moles/g PF}$ pour la concentration la plus stressante (600mM de NaCl). L'analyse de la variance montre une différence très hautement significative entre les différents traitements

de NaCl utilisés ($p < 0,0001$) (Tableau 41, appendice C) et le test de Newman-Keuls au seuil de 5% (tableau13, appendice C) classent les moyennes en 4 classes

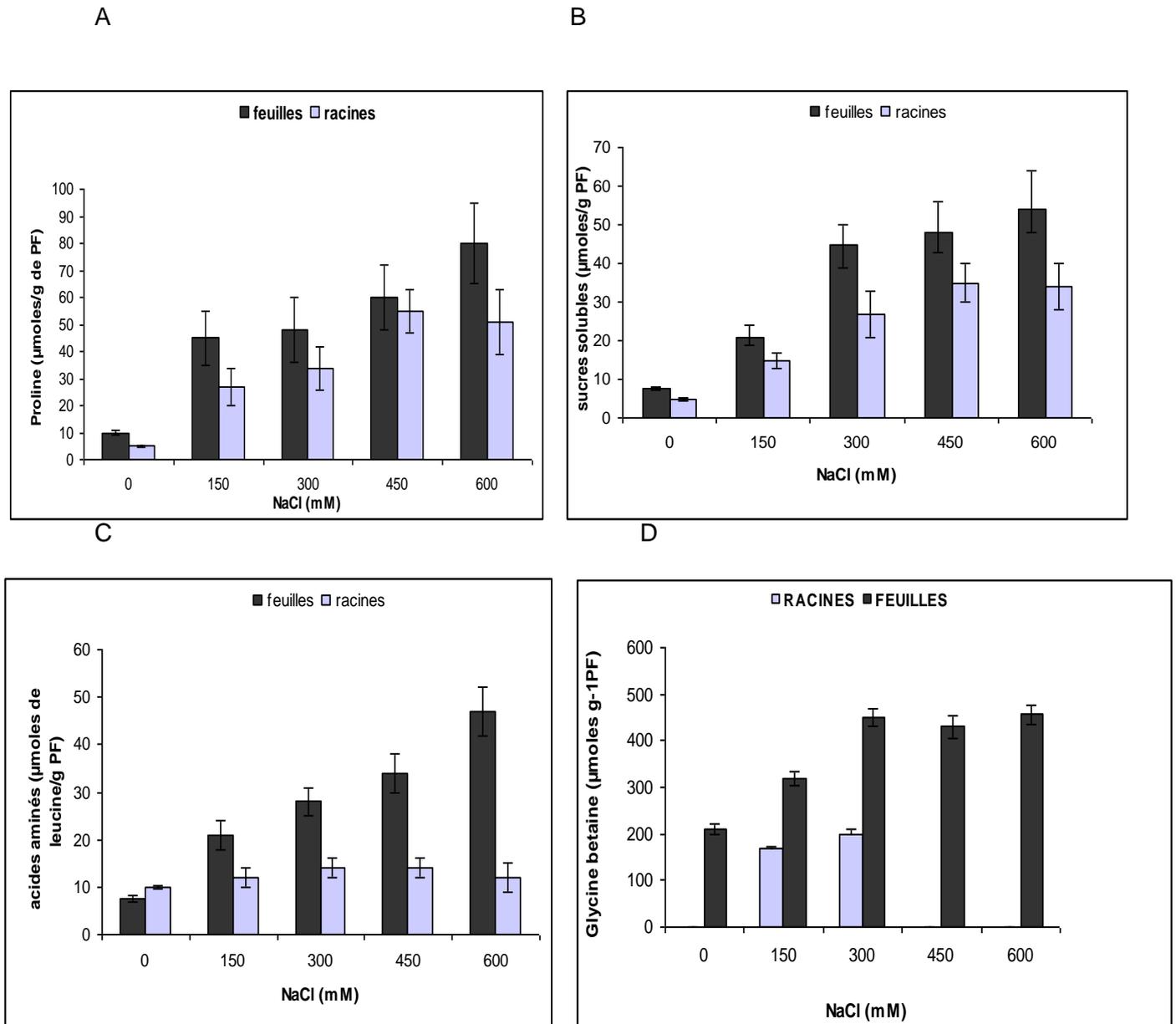


Figure 4.5 : Effet du stress salin sur accumulation de la Proline (A), sucres solubles totaux(B), acides aminés totaux (C) et Glycine bétaine (D) au niveau des feuilles, racines des plantules d'*Atriplex halimus*. Les plantes sont exposées pendant 18J à différentes concentrations en NaCl. Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences indépendantes (avec 6 répétitions chacune) ± ET.

La figure 4.5B montre une différence significative de l'accumulation des sucres solubles totaux dans la partie racinaire avec l'augmentation des concentrations de NaCl. (Tableau 42 , appendice C et le test de Newman-Keuls au seuil de 5% (tableau14, appendice C) classent les moyennes en 4 classes .Plus généralement, il s'avère que pour tous les

traitements, les teneurs des sucres totaux enregistrées sont plus importantes au niveau de la partie aérienne par rapport à la partie racinaire.

4.1.4.4. Glycine bétaine

Le stress salin induit une augmentation très hautement significative des teneurs en composés ammonium quaternaire particulièrement la glycine bétaine au niveau des parties aériennes (figure 4.5D). A 150mM et 300mM de NaCl on enregistre une augmentation de (+140% et 250% par rapport au témoin). L'analyse de la variance montre que l'augmentation progressive de la concentration NaCl a un effet très hautement significatif sur l'accumulation de la glycine bétaine au niveau de la partie aérienne ($P < 0.0001$). (Tableau 36, appendice C et le test de Newman-Keuls au seuil de 5% (tableau 17, appendice C) classent les moyennes en 4 classes. Au niveau des racines, ce composé n'est pas détecté chez les plantes non stressées mais apparaît chez les plantes exposées à 150 et 300mM de NaCl ; à des doses de 450 et 600mM, la glycine bétaine n'est pas détectée.

Au niveau des parties souterraines, les taux relatifs d'accumulation des composés d'ammonium quaternaire (glycine bétaine) demeurent relativement faibles à l'échelle de l'ensemble des tissus.

4.1.4. Effet du NaCl sur la teneur en pigments chlorophylliens

Les résultats obtenus montrent que le stress salin influence la moyenne de la teneur en chlorophylle (a), chlorophylle (b) et chlorophylle (a+b) (Figure 4.6)

Le stress salin appliqué à 150, 300, 450mM n'induit pas de grandes variations de la teneur en chlorophylle (a), (b), (a+b) et caroténoïdes. L'analyse de la variance à un critère de classification confirme ces résultats en montrant qu'il n'y a pas de différence significative entre les traitements. Par contre à 600mM on constate une diminution très significative ($p < 0,001$) des teneurs en chl a et chl b, les teneurs en caroténoïdes ne varient pas.

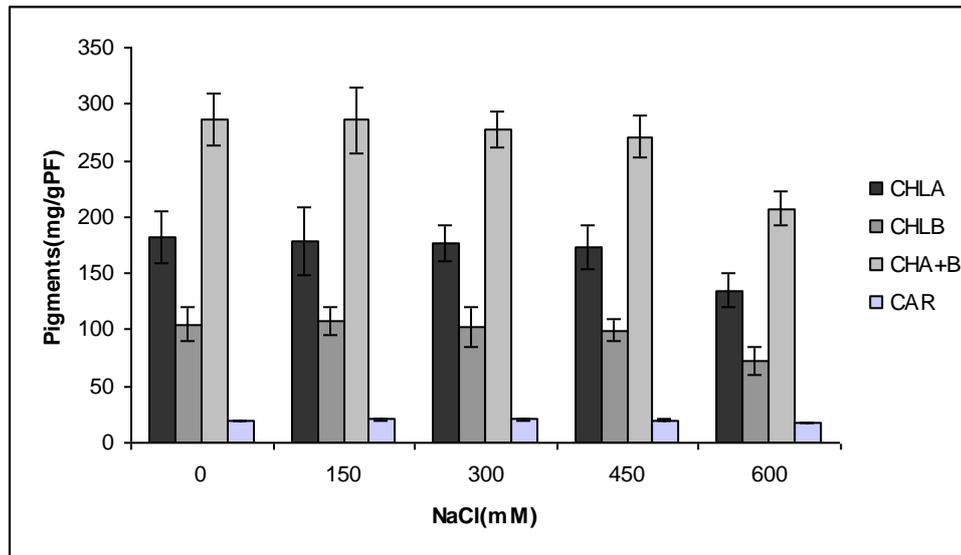


Figure 4.6. Teneurs des pigments foliaires en fonction de l'intensité du stress salin au niveau des feuilles d'*Atriplex halimus*. Les valeurs représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes \pm ES. (avec 6 mesures chacune)

4.1.5. Effet du NaCl sur la teneur en MDA et la quantité H₂O₂

La teneur en malondialdéhyde (MDA) constitue un indicateur de la peroxydation des lipides a été mesurée au niveau des feuilles. Le MDA s'accumule de façon significative L'application de NaCl à des plantules d'*Atriplex halimus* pendant 18j se traduit par une augmentation significative de 139% et 178% par rapport au témoin à 450mM et 600mM de NaCl. La quantité de H₂O₂ diminue significativement (-9% et -12%) par rapport au témoin à 150 et 300mM. A 450Mm et 600mM, il y a une augmentation significative de la concentration de H₂O₂ respectivement de 135% et 241% par rapport au témoin. (Tableau 4.1). Une corrélation positive ($r=0,87$, $F=146,2$, $p<0,0001$) a été observée entre la teneur en MDA et accumulation de H₂O₂ (figure 4.7A). Nous avons également observée une corrélation négative entre la croissance relative et la teneur en MDA ($r=-0,95$, $F=132,2$, $p<0,0001$) (figure 4.7B).

Tableau 4.1: Evolution de la teneur en MDA et H₂O₂ au niveau des feuilles d'*Atriplex halimus* en fonction de l'intensité du stress salin. Les valeurs représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes \pm ET. (avec 6 mesures chacune). Des lettres différentes indiquent une différence significative à $p = 0,05$ (test Newman et Keuls au seuil de 5%)

Traitements	Teneur en MDA nmoles/g de PF	Quantité H ₂ O ₂ μ moles/g de PF
0	7,3+0,4 ^c	14,2+1,2 ^c
150mM	6,8+0,6 ^c	13,8+1,0 ^c
300mM	7,1+0,5 ^c	15,1+1,3 ^c
450mM	10,4+0,7 ^b	19,2+1,6 ^b
600mM	13,7+0,9 ^a	34,4+2,5 ^a

4.1.6. Accumulation des composés phénoliques et des flavonoïdes

Tableau 4.2 :Teneurs en polyphénols totaux , flavonoïdes au niveau des feuilles des plantules d'*Atriplex halimus* . Les plantes sont exposées pendant 18J à différentes concentrations de NaCl . Les bars verticales représentent les écarts types. Les valeurs représentent les moyennes de 3 expériences indépendantes \pm ET. (avec 6 mesures chacune). Des lettres différentes indiquent une différence significative à $p = 0,05$ (test Newman et Keuls au seuil de 5%) a mg équivalent d'acide gallique/ g de la matière sèche. B mg équivalent de catéchine/g de la matière sèche.

Traitements (NaCl mM)	Teneurs en Polyphénols totaux (mg EAG/g MS) ^a	Teneurs en Flavonoïdes (mg EC/g MS) ^b
0	15,2+ 1,5 ^c	7,2+0,2 ^c
150	21,6+1,7 ^a	9,5+0,1 ^a
300	16,8+1,2 ^b	8,7+0,4 ^b
450	15,9+1,3 ^b	7,3+0,6 ^c
600	16,2+1 ,1 ^b	7,6+0,4 ^c

Le stress salin appliqué à 150 mM induit une variation de la teneur en phénols totaux (+136% par rapport au témoin) ,les concentrations entre 300et 600Mm induisent aucun différences significatives. L'analyse de la variance à un critère de classification confirme ces résultats en montrant qu'il n y a pas une différence significative entre les traitements. Le sel induit une augmentation significative des flavonoïdes entre 150 et 300mM on note une augmentation de 150%par rapport au témoin puis une diminution de leur teneur entre 450mM et 600mM

Une corrélation négative est observée entre la teneur en MDA et accumulation des phénols ($r=-0,39$, $F=1,9$, $p=0,145$)(figure 4.7C)

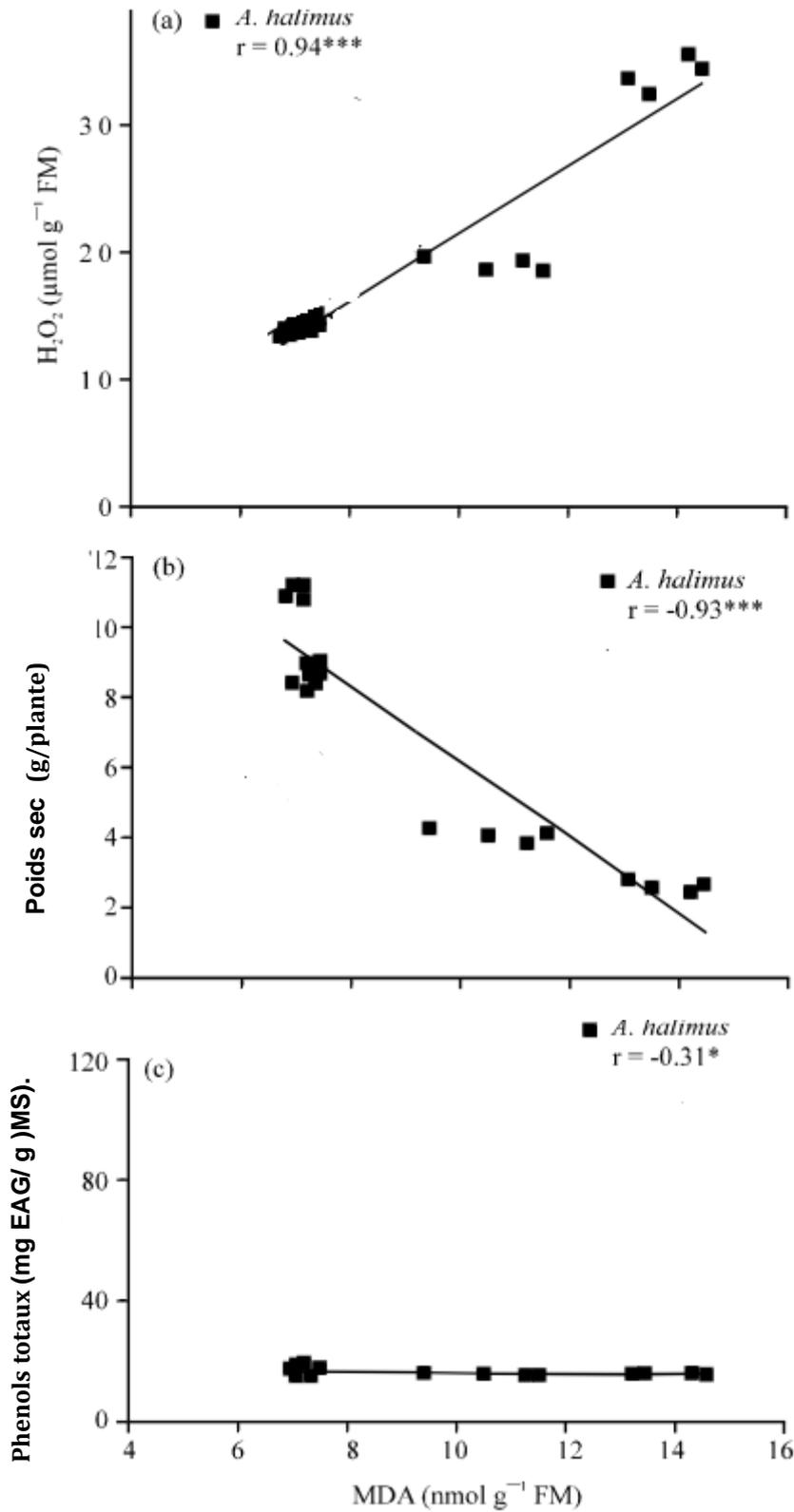


Figure 4.7 Corrélation entre la quantité H₂O₂ (A), le poids sec des plantules (B), la teneur en phénols totaux (C) et la teneur en MDA.

4.1.7. Accumulation des protéines solubles et activités enzymatiques des peroxydases et catalases

4.1.7.1 Protéines solubles

Une diminution significative des teneurs en protéines solubles a été observé aussi bien au niveau des feuilles et des racines (figure 4.37). Cette diminution expliquerait en partie l'augmentation des teneurs en acides aminés et serait due soit à une augmentation de l'activité protéiniques soit à une diminution de la synthèse protéique.

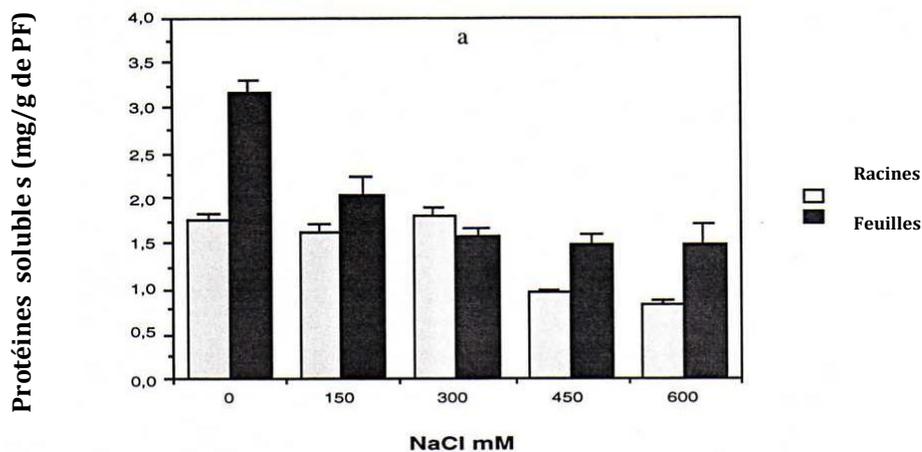


Figure 4.8: Effet du stress salin sur les teneurs en Protéines au niveau des feuilles et des racines. Les plantes sont exposés pendant 18J aux différentes concentrations de NaCl. Chaque valeur représente la moyenne de 5 expériences indépendantes. Les bars verticales représentent les écarts types

La quantité accumulée des protéines solubles au niveau des feuilles est de l'ordre de 3,25mg/g de PF pour le témoin alors qu'elle atteint respectivement 2,3mg /g PF et 1,75mg/g de PF pour la concentration stressante (150mM et 300mM de NaCl). L'analyse de la variance montre une différence très hautement significative entre les différents traitements de NaCl utilisés ($p < 0,0001$). A partir de 300mM les concentrations des protéines ne sont pas significativement différentes.

Au niveau des racines, une diminution significative est observée à partir de la concentration de 450Mm de NaCl.

Afin de compléter l'évaluation de l'impact du NaCl sur l'état physiologique de la plante, des dosages d'activités enzymatiques connues pour être impliquées dans les réactions de défense des végétaux ont été réalisés. En effet, les activités enzymatiques choisies sont

généralement suivies pour témoigner de la présence d'un stress oxydatif catalase (CAT), peroxydase (POD)

4.1.7.2. Activités des Peroxydases :

Les peroxydases sont des enzymes synthétisées par les plantes et appartiennent à une famille hétérogène. Il est toujours suggéré que l'augmentation des peroxydases peut aussi contribuer à la résistance à la salinité vue qu'elles sont impliqués dans la détoxification des espèces réactives à l'oxygène produites en conditions de stress [227] [228]. Le dosage de l'activité des peroxydases a été faite séparément dans les tissus racinaires et aériens. L'évolution de l'activité du guaiacol peroxydase en réponse à la salinité est illustrée dans la figure 4.9.

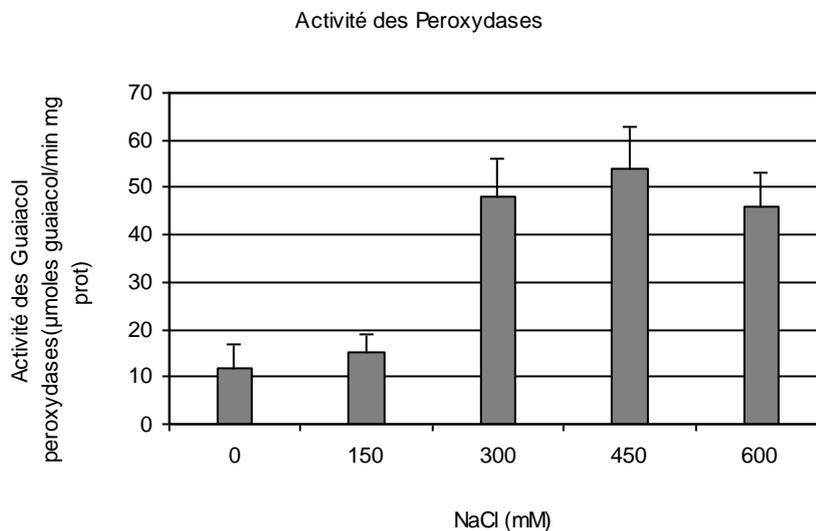


Figure 4.9: Activités des guaiacol peroxydases au niveau des feuilles d'*Atriplex halimus*. Les plantes sont exposées pendant 18J. Chaque valeur représente la moyenne de 10 répétitions. Les bars verticales représentent les écarts types

Les activités peroxydases sont susceptibles d'intervenir à titre majeur dans les mécanismes de résistance au stress. Le fait qu'*Atriplex halimus* présente un métabolisme en C4 rend probable une stimulation de la photorespiration en condition de stress et une activité des peroxydases et catalases. Par ailleurs, d'après nos résultats, il semblerait que l'activité spécifique de la peroxydase (Figure 4.9) ait tendance à s'accroître significativement au niveau des feuilles avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu. Les taux d'augmentation ont atteint 450% et 550% par rapport au témoin, respectivement pour les concentrations de 300mM et 450mM

L'analyse de la variance a un seul critère de classification montre une différence très hautement significative ($P < 0.001$), (tableau 46, appendice C). Le test de Newman et keuls

fait ressortir 3 groupements homogènes (A) , (B) et (C)(tableau 27,appendice C), (au niveau des racines cette activité est nulle (données non représentées).

4.7.1.3. Activités des catalases :

Au niveau des feuilles d'*Atriplex halimus*, le stress Salin a provoqué une intensification de l'activité des catalases. Les taux d'augmentation ont atteint (102%,183%, 133%,89% (Figure 4.10) par rapport aux plantes non stressées, respectivement à (150,300 ,450 ,600mM,. Cependant, les moyennes respectives (Appendice C, tableau 47) sont statistiquement différentes ; l'analyse de la variance a un seul critère de classification montre une différence significative ($P=0.003$), (Appendice C, tableau 47). Le test de Newman et keuls fait ressortir trois groupements homogènes (Appendice C, tableau 28) .

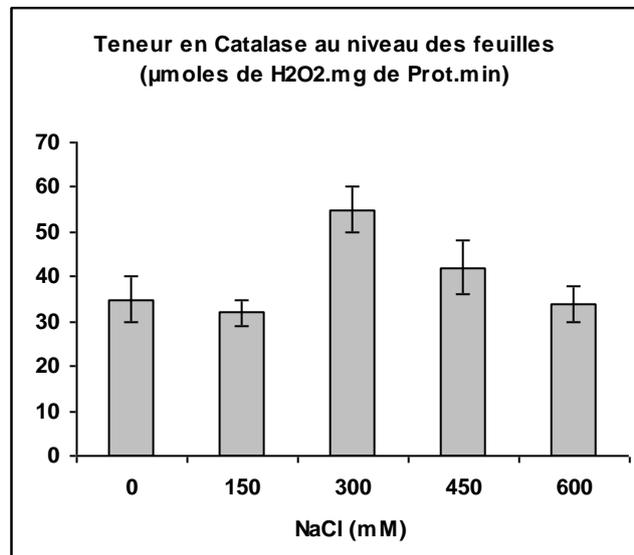


Figure 4.10:Activités des Catalases au niveau des feuilles d'*Atriplex halimus* . Les plantes sont exposées pendant 18J aux traitements NaCl . Chaque valeur représente la moyenne de 10 répétitions. Les bars verticales représentent les écarts types

CHAPITRE 4 :

Résultats et discussion

4.3. Participation des protéines à thiols et la glycine bétaine dans la réponse de deux populations d'*Atriplex halimus* au stress hydrique et salin

4.3.1. description de la localité des deux populations d'*Atriplex halimus*

Les graines des deux populations d'*Atriplex halimus* ont été récoltées dans deux régions d'Algérie, la région de Djelfa et Laghouat. Ces 2 populations se distinguent par leurs caractéristiques climatiques et leurs types de sols. Tableau 4.3

Tableau 4.3 : Caractéristiques climatiques et types de sol des 2 régions :Djelfa et Laghouat

Localisation Géographique	Temp moy Annuelle	Pluv moy Annuelle	Hum moy Annuelle	Conductivité électrique
Djelfa	28 °C	307 mm	56 %	3.32 ± 0,40 deciSiemens.m ⁻¹
Laghouat	24 °C	145 mm	40 %	8.20 ± 1,30 deciSiemens.m ⁻¹

Les moyennes annuelles d'humidité, de températures et de pluviométrie ont été calculées à partir de moyennes de 5 années consécutives :de 2007 à2011 obtenus par les stations bioclimatologiques des deux régions. La conductivité électrique est mesurée à partir de prélèvements des sols des deux régions en suivant le protocole de Kaira et Maynard 1992 [242]. Les valeurs représentées sont la moyenne de 10 valeurs indépendantes

La région de Djelfa est caractérisée par un climat semi-aride avec une moyenne annuelle de température et pluviométrie de 28°C et 307mm respectivement, par contre la conductivité électrique est de 3,32 déciSiemens.m⁻¹. La région de Laghouat est caractérisée par un niveau de salinité très fort du sol (8,2déciSiemens.m⁻¹) dont la pluviométrie est moins importante que la région de Djelfa (145mm).Les populations d'*Atriplex halimus* issues de cette région vivent dans un environnement fortement salin.

4.3.2. Effets d'un déficit hydrique, du PEG et une forte salinité sur la croissance ,le statut hydrique et les concentrations d'ions

Nous avons étudié les effets du stress hydrique sur les 2 populations d'*Atriplex* cultivées dans les conditions in vivo. Sous conditions de contrôle les plantules en provenance de la région de Djelfa et Laghouat présentent un poids frais , un poids sec et un contenu relatif en eau similaire (tableau 4.4) . Sous conditions de stress hydrique par arrêt d'arrosage

pendant 14 jours ou un arrosage avec une solution de PEG 8000 à 20% pendant 12 J (Tableau 4.5) une réduction significative au seuil de $p < 0,05\%$ de la croissance des plantules des 2 populations a été observée. Cependant nos résultats indiquent que les 2 populations ne diffèrent pas selon leur réponse au stress hydrique par arrêt d'arrosage pendant 14 j ou application du PEG

Tableau 4.4 : Effet d'un déficit hydrique sur le poids frais, le poids sec et la teneur relative en eau des deux populations d'*Atriplex halimus*. Les plantules âgées de 4 semaines ont subi un arrêt d'arrosage de 14 jours.

Les valeurs représentent les moyennes de 5 expériences indépendantes (avec 6 répétitions chacune) \pm ET. Les moyennes ont été obtenues sur 6 plants par traitement et par populations.

* Valeurs de Laghouat sont significativement différentes de celles de Djelfa au seuil de $P < 0,05\%$ (t-test)

Population	Traitements		
	PF (g)	PS (g)	TRE (%)
Control			
Djelfa	2.31 \pm 0.22	0.26 \pm 0.01	84.7 \pm 2.8
Laghouat	2.61 \pm 0.20*	0.25 \pm 0.02	83.0 \pm 6.4
Déficit hydrique			
Djelfa	0.77 \pm 0.14	0.11 \pm 0.04	58.4 \pm 2.0
Laghouat	0.90 \pm 0.18	0.15 \pm 0.04	61.0 \pm 4.2

Tableau 4.5 : Effet d'un traitement par le PEG 20% sur le poids frais, le poids sec et la teneur relative en eau des deux populations

Les plantules âgées de 4 semaines ont subi un arrosage avec une solution de 20% de PEG 8000 pendant 12 jours. Les valeurs représentent les moyennes obtenues sur 6 plants par traitement et par populations. L'expérience a été refaite 5 fois.

Populations	Traitements		
	PF (g)	PS (g)	TRE (%)
Control			
Djelfa	2.38 \pm 0.23	0.19 \pm 0.02	85.8 \pm 1.7
Laghouat	2.20 \pm 0.25	0.23 \pm 0.05	86.4 \pm 1.6
PEG 20%			
Djelfa	0.51 \pm 0.09	0.07 \pm 0.01	71.5 \pm 0.9
Laghouat	0.59 \pm 0.10	0.08 \pm 0.01	73.6 \pm 2.4

Nous avons analysé les effets d'une forte salinité (300mM et 600mM), sous condition de contrôle les 2 populations présentent un même poids frais et poids sec (tableau 4.6). Après une exposition à 300mM de NaCl, la croissance des plantes des 2 populations diminue de façon significative, cette diminution est plus accentuée chez Djelfa que Laghouat dans les 2 expériences. La réduction du poids frais et du poids sec a été respectivement de 55% et 30% chez la population de Djelfa et Laghouat (dans

l'expérience1). A 600mM cette réduction de la croissance est de 74% chez Djelfa et 56% chez Laghouat.

Pour le statut hydrique, les 2 populations montrent une même valeur de potentiel hydrique et osmotique (tableau4.7) avec une même croissance. Les plantules quant elles sont exposées à 300mM de NaCl il y a une diminution significative du potentiel hydrique et osmotique chez Laghouat par rapport à Djelfa. A 600Mm le potentiel hydrique et osmotique diminuent encore plus avec une valeur significative du potentiel osmotique particulièrement chez Laghouat (tableau4.7)

Nous avons également mesuré la concentration en ions Na^+ et K^+ chez les 2 populations. La concentration des ions K^+ est la même sous condition témoin et stressé chez la population Laghouat (données non représentées). Cette population exposée à 600mM montre une quantité significativement plus élevée en Na^+ que Djelfa respectivement $1,5\mu\text{mol.g}^{-1}$ de PS chez Laghouat et $1\mu\text{mol.g}^{-1}$ chez Djelfa (tableau 4.8).

Tableau 4.6 : Effet d'un NaCL sur le poids frais, le poids sec des plantules des deux populations d'*Atriplex halimus*. Chaque valeur représente la moyenne de 10 mesures indépendantes Les plantules âgées de 4 semaines (pour l'expérience1et2) ont subit un arrosage avec une solution de Na CL (300mM et 600mM) pendant 18 jours. les valeurs représentent les moyennes obtenues sur 6 plants par traitement et par population. L'expérience a été refaite cinq fois.

*Valeurs de Laghouat sont significativement différentes de celles de Djelfa au seuil de 5% ($p < 0,05$ t-test)

** Valeurs de Laghouat significativement différentes de celles de Djelfa au seuil de 1% ($p < 0,01$ t-test)

*** Valeurs de Laghouat significativement différentes de celles de Djelfa au seuil de 0,1% ($p < 0,001$)

Traitements	expérience 1		Expérience 2	
	PF (g)	PS (g)	PF (g)	PS (g)
Control				
Djelfa	3.44 ± 0.51	0.62 ± 0.14	3.95 ± 0.58	0.64 ± 0.18
Laghouat	3.87 ± 0.43	0.60 ± 0.05	4.41 ± 0.62	0.67 ± 0.08
NaCl 300mM				
Djelfa	2.41 ± 0.17	0.28 ± 0.07	2.60 ± 0.16	0.40 ± 0.10
Laghouat	2.95 ± 0.25***	0.42 ± 0.07**	3.44 ± 0.67*	0.56 ± 0.07**
NaCl 600mM				
Djelfa	1.34 ± 0.56	0.16 ± 0.03	2.01 ± 0.22	0.28 ± 0.04
Laghouat	2.01 ± 0.53	0.40 ± 0.13***	2.86 ± 0.42***	0.40 ± 0.08**

Tableau 4.7: Potentiel hydrique et osmotique des feuilles des 2 populations d'*Atriplex halimus* A l'issue de 14 jours de traitement par arrêt d'arrosage pour le déficit hydrique et arrosage avec une solution saline à 300mM et 600mM de NaCl pendant 18J. Chaque valeur représente la moyenne de 5 expériences indépendantes.** les valeurs sont significativement différentes au seuil de 0, 1% (p<0,001) t-test

Traitements Populations	Potentiel hydrique		Potentiel osmotique	
	(ψ_w)	MPa	(ψ_s)	MPa
Control				
Djelfa	-0.50 ± 0.01		-1.35 ± 0.09	
Laghouat	-0.49 ± 0.03		-1.33 ± 0.11	
Déficit hydrique				
Djelfa	- 0.82 ± 0.02		-1.76 ± 0.07	
Laghouat	-0.79 ± 0.02		-1.75 ± 0.11	
NaCl 300mM				
Djelfa	-0.90 ± 0.02		-3.45 ± 0.05	
Laghouat	-0.86 ± 0.03		-4.25 ± 0.06***	
NaCl 600mM				
Djelfa	-1.15 ± 0.04		-7.17 ± 0.08	
Laghouat	-1.49 ± 0.06***		-8.15 ± 0.08***	

Tableau 4.8 : Effet du stress salin sur l'accumulation de Na⁺ et K⁺ au niveau des feuilles des 2 populations d'*Atriplex halimus*. Chaque valeur représente la moyenne de 5 expériences indépendantes

*Valeurs de Laghouat sont significativement différentes de celles de Djelfa au seuil de 5% (p<0,05 t-test)

** Valeurs de Laghouat significativement différentes de celles de Djelfa au seuil de 1%(p<0,01 t-test)

*** Valeurs de Laghouat significativement différentes de celles de Djelfa au seuil de 0,1%(p<0,001)

Traitements Populations	Na ⁺	K ⁺
	($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{PS}$)	($\mu\text{mol.g}^{-1}\text{PS}$)
Control		
Djelfa	98 ± 3	1195 ± 34
Laghouat	104 ± 3	1087 ± 71**
NaCl 300mM		
Djelfa	706 ± 17	1018 ± 94
Laghouat	921 ± 47***	912 ± 41*
NaCl 600mM		
Djelfa	998 ± 25	713 ± 62
Laghouat	1479 ± 91***	652 ± 50

4.3.3. Effets du stress salin et stress hydrique sur l'accumulation des solutés organiques

Nous avons évalué la concentration des composés organiques qui participent à la tolérance des plantes au stress osmotique.

La figure 4.11A montre que la réduction de la fréquence d'arrosage des plantes induit une augmentation des sucres solubles chez les 2 populations. Elle augmente respectivement de 30 et 45 $\mu\text{moles g PF}^{-1}$ chez les deux populations. Après un traitement au NaCl les plantules de Djelfa et Laghouat accumulent respectivement une concentration similaire et élevée en sucres solubles (52 et 61 $\mu\text{moles g PF}^{-1}$) après un traitement respectif à 300mM

et 600mM de NaCl. Nos données statistiques ne révèlent aucune différence significative entre les 2 populations.(figure 4.11A)

La réduction d'arrosage des plantules d'*Atriplex halimus* induit une augmentation significative de la teneur en proline au niveau des feuilles chez les 2 populations. Cette augmentation est plus marquée chez la population de Djelfa que Laghouat, cette concentration est respectivement de 25,5 et 21,9 $\mu\text{moles g PF}^{-1}$. (Figure 4.11B).

Le traitement au NaCl induit une augmentation très hautement significative de la proline chez les 2 populations. Cette augmentation est plus marquée chez Laghouat que Djelfa aux deux concentrations de NaCl. A 300Mm de NaCl, elle est respectivement de 41,7 et 34,8 $\mu\text{moles g PF}^{-1}$.

Après un arrêt d'arrosage des plantules des deux populations d'*Atriplex halimus* de 14jours, on remarque une accumulation de la glycine betaine (ammonium quaternaire). Cette dernière est 3fois plus importante chez les plantules stressées. Cette augmentation est beaucoup plus marquée chez la population de Laghouat après un traitement au NaCl à 300mM et 600Mm (figure4.11C).Elle est respectivement de 5,1 et 6,0 $\mu\text{moles g PF}^{-1}$.

Ces résultats indiquent que la population de Laghouat accumule beaucoup plus de proline ,de glycine bétaine que la population de Djelfa suite à un traitement salin.

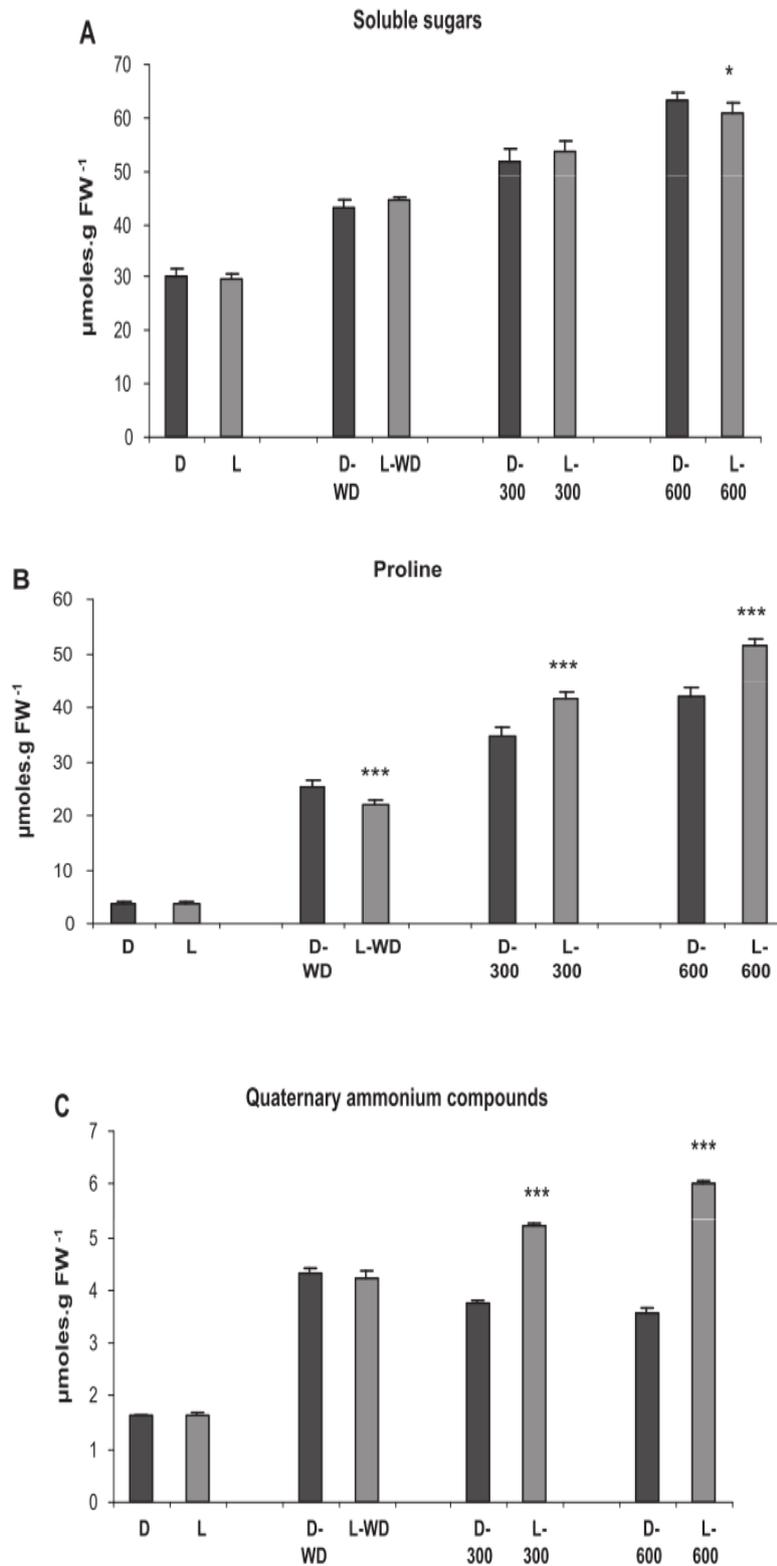


Figure 4.11 Effet du stress salin et hydrique sur l'accumulation de sucres solubles (A), la proline (B) et glycinebétaine (C) au niveau des feuilles des 2 populations d'*Atriplex halimus*. Chaque valeur représente la moyenne de 5 mesures indépendantes.

*** Valeurs de Laghouat significativement différentes de celles de Djelfa. Significatif au seuil de 0,1%

4.3.4 . Analyse des protéines par électrophorèse SDS-PAGE

4.3.4.1. Etude des profils protéiques et immunodétections

4.3.4.1.1. Etude de la composition protéique foliaire totale.

Dans les conditions expérimentales de phytotron, les plantules des 2 populations d'*Atriplex halimus* sont soumises à un déficit hydrique de 14J par arrêt d'arrosage et un arrosage avec une solution de 300mM et 600mM de NaCl. Quant aux échantillons témoins ils sont prélevés sur des plantes bien arrosées.

Après extraction et séparation par électrophorèse, les protéines sont révélées par une coloration au bleu de Coumassie (figure 4.12). Nous avons utilisé *Arabidopsis thaliana* pour comparer l' *Atriplex halimus* à cette espèce . L'analyse des gels SDS-PAGE révèle au bleu de Coumassie deux protéines abondantes. Elles correspondent à la petite sous unité de la Rubisco à 14KDa et la grande sous unité de la Rubisco à 50KDa. La Rubisco est une protéine végétale la plus abondante est responsable de l'assimilation du CO₂ .Le bleu de Coumassie permet seulement de vérifier l'homogénéité de chargement entre les différentes pistes de protéines (figure 4.12 et 4.13)(la correction se porte surtout sur l'homogénéité de chargement de la grande sous unité de la Rubisco). Dans le cas d'une hétérogénéité de chargement une correction est apportée.

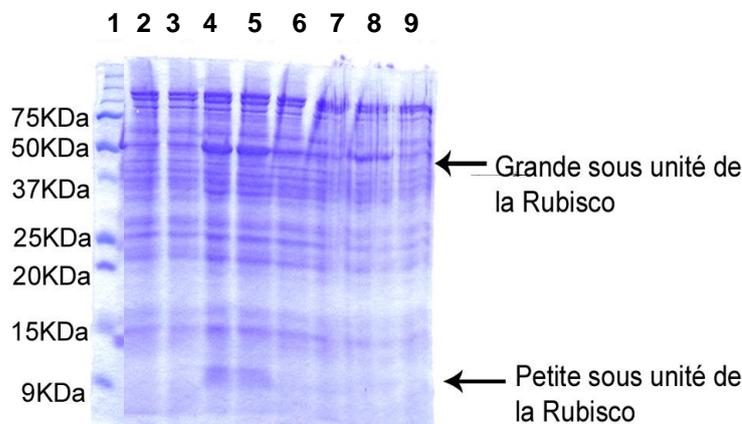


Figure 4.12 : Profil SDS-PAGE révélé au bleu de Coumassie de protéines foliaires d'*Atriplex halimus* témoins et soumises à un déficit hydrique de 14jours et 17J
 Piste1 Marqueur moléculaire, Piste 2 :plante témoin Djelfa, Piste 3 : plante de Djelfa soumises à un déficit hydrique de 14J, Piste 4 :plante de Djelfa très stressée (17J),Piste 5 : plante témoin Laghouat Piste 6 ;plante de Laghouat soumise à un déficit hydrique de 14J, Piste7 :plante de Laghouat très stressée(17J)

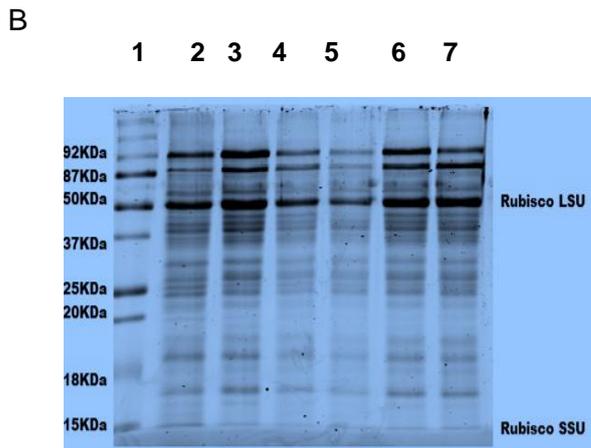


Figure 4.13: Profil SDS-PAGE au bleu de coumassie des protéines foliaires solubles des plantes des deux populations d'*Atriplex halimus* soumises à un stress salin.

Piste1 Marqueur moléculaire, Piste 2 :plante Témoin Djelfa, Piste 3 : plante de Djelfa soumise à un arrosage par un solution saline de 300mM pendant 18J, Piste 4 : plante de Djelfa soumise à un arrosage par un solution saline de 600mM pendant 18J, Piste 5 : plante de Laghouat témoin, Piste6 : plante de Laghouat soumise à un arrosage par un solution saline de 300mM pendant 18J ,Piste 7 :plante de Laghouat soumise à un arrosage par une solution saline de 600mM pendant 18J .

4.3.4.2 Immunodétection avec des anticorps dirigés contre des protéines connues et synthétisées en réponse au déficit hydrique et au stress salin.

Nous avons essayé de chercher si les protéines végétales synthétisées en condition de stress et qui participent à des mécanismes de protection contre le stress dans le chloroplaste de la pomme de terre et d'*Arabidopsis thaliana* sont présentes chez les deux populations d' *Atriplex halimus*. Nous avons également étudié l'abondance de ces protéines. Ils s'agit de protéines chloroplastiques solubles comme la CDSP32,Glutarédoxine, BaS1 (2Cyst-Prx), MSRB1,MSRB2, PRXQ, PrxIIE, 2Cyst-Prx oxydée et la protéine membranaire CDSP34.

4.3.4.2.1 Quantité de protéine CDSP32 (thiorédoxine)

La quantité de CDSP32 est d'abord analysé chez le type sauvage d' *Arabidopsis thaliana* et les feuilles témoins et stressées d' *Atriplex halimus* après 11j et 14 jours de stress.

L'immunodétection sur membrane permet grâce à l'anticorps I635 de révéler spécifiquement la thiorédoxine CDSP32. La figure 4.14 montre que la quantité de CDSP32 est présente chez le type sauvage d' *Arabidopsis thaliana* par contre chez les deux populations d' *Atriplex halimus* , elle est absente, l'anticorps anti-StCDSP32 utilisé ne reconnaît pas la CDSP32 de l'Atriplex.(figure4.14piste 2à 6).

Nous avons utilisé un anticorps de la pomme de terre, ce dernier ne reconnaît pas la protéine de l'Atriplex qui est une Chénopodiacée. Nos résultats indiquent que les

anticorps utilisés dirigés contre l'extrémité N terminale de la protéine ne reconnaissent pas la CDSP32 de l'Atriplex, c'est pour cela aucun signal n'a été observé. Nous avons également analysé une glutarédoxine qui joue le rôle de donneur d'électrons aux protéines chloroplastique Prx et Msr, Anticorps primaire utilisé provient du peuplier, aucun signal n'a été détecté (données non représentées).

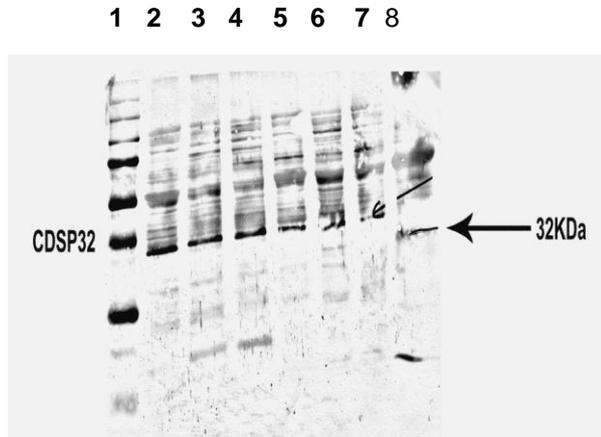


Figure 4.14 : Immunodétection sur membrane de la protéine CDSP32 dans les extraits protéiques solubles de feuilles témoins et stressées des deux populations d'*Atriplex halimus*. Puits chargés avec 25µg de protéines. Anticorps anti-StCDSP32 dilués au 1/500e
 Piste1 Marqueur moléculaire, Piste 2 :plante témoin Djelfa, Piste 3 : plante de Djelfa stressée soumise à un déficit hydrique de 14J, Piste 4 :plante de Djelfa très stressée (17J),Piste 5 : plante témoin Laghouat Piste 6 plante de Laghouat soumise à un déficit hydrique de 14J, Piste7 :plante de Laghouat très stressée(17J) Piste 8 :plante de pomme de terre (témoin)

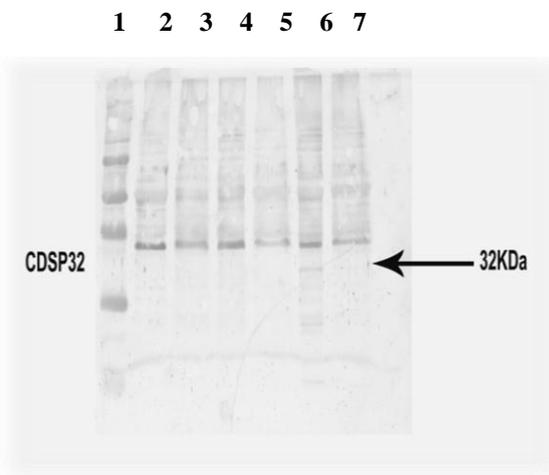


Figure 4.15 Immunodétection sur membrane de la protéine CDSP32 dans les extraits protéiques solubles de feuilles témoins et stressées au NaCl des deux populations d'*Atriplex halimus* Puits chargés avec 25µg de protéines. Anticorps anti-StCDSP32 dilués au 1/500e
 Piste1 Marqueur moléculaire, Piste 2 :plante Témoin Djelfa, Piste 3 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par un solution saline de 300mM pendant 18J, Piste 4 : plante de Djelfa soumise à un arrosage par un solution saline de 600mM pendant 18J, Piste 5 : plante de Laghouat témoin, Piste6 : plante de Djelfa soumise à un arrosage par un solution saline de 300mM pendant 18J ,Piste 7 :plante de Djelfa soumise à un arrosage par un solution saline de 600mM pendant 18J .

4.3.4.2.2. Etude de l'abondance de la protéine CDSP34

L'étude a été réalisée sur les deux populations d'*Atriplex halimus*. Nous avons cherché à déterminer le niveau de CDSP34 dans ces deux populations en conditions de stress hydrique et de stress salin. A l'aide de l'anticorps purifié, anti-CDSP34 nous avons testé la présence de cette protéine membranaire dans les extraits de plantes correspondants aux deux populations d'*Atriplex halimus*. Les figures 4.16 A,B,C,D présentent les résultats obtenus avec l'anticorps anti CDSP34

1- Western Blot

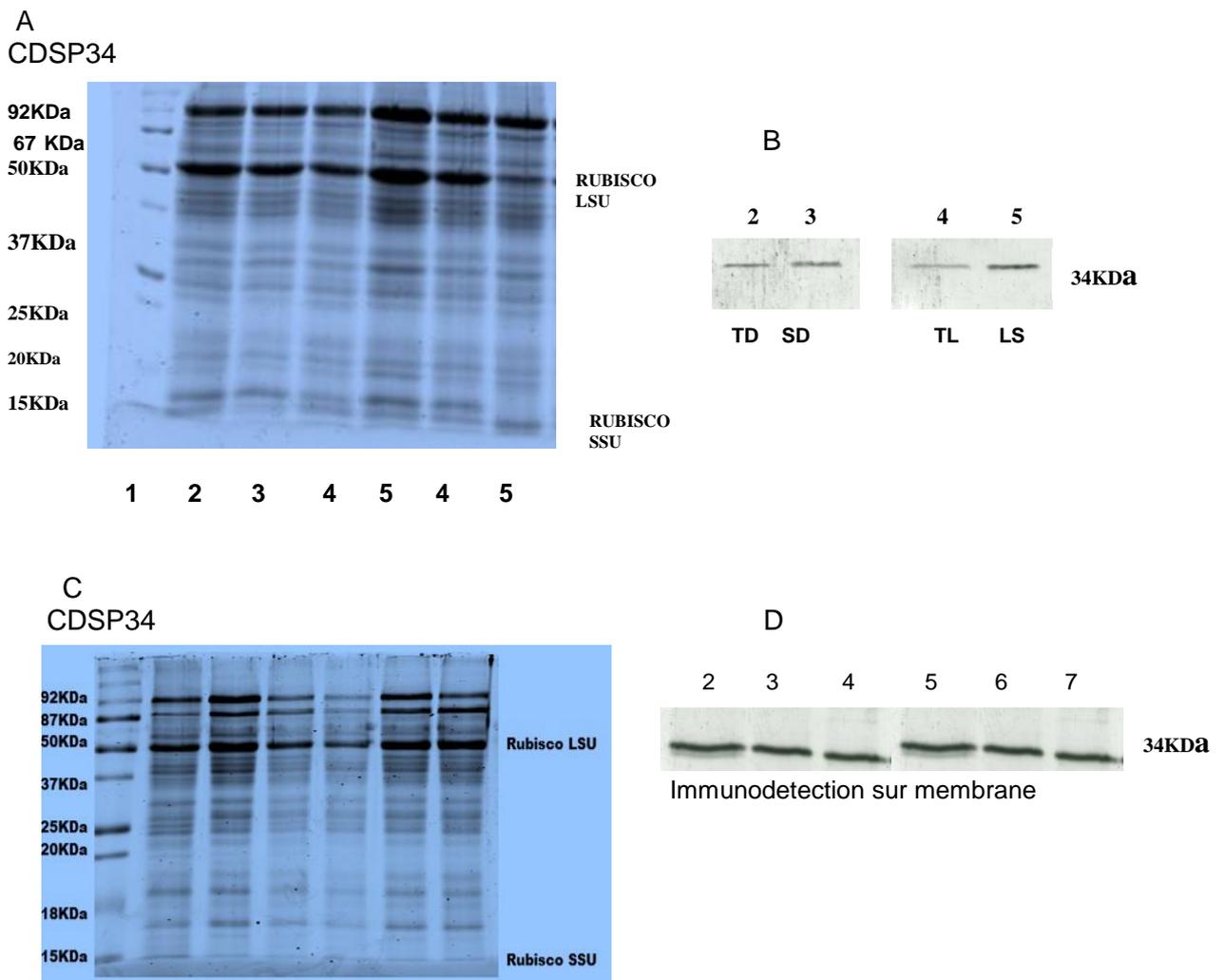


Figure 4.16 : Profil SDS-PAGE au bleu de coumassie des protéines membranaires des plantes des deux populations d'*Atriplex halimus* soumises à un stress hydrique (A) et un stress salin (C) Immuno détection sur membrane de la protéine CDSP34 dans les extraits protéiques membranaires de feuilles témoins et stressées, au stress hydrique (B) et au stress salin (D) des deux populations d'*Atriplex halimus*. Puits chargés avec 25µg de protéines. Anticorps dilués au 1/500^e

Figure 4.16A,B Piste 1 Marqueur moléculaire, Piste 2 : plante Témoin Djelfa, Piste 3 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrêt d'arrosage pendant 14J, Piste 4 : témoin Laghouat, Piste 5 : plante de Laghouat soumise à un arrêt d'arrosage de 14J

Figure 4.16 C,D :Piste1 Marqueur moléculaire, Piste 2 :plante Témoin Djelfa, Piste 3 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par un solution saline de 300mM pendant 18J, Piste 4 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par un solution saline de 600mM pendant 18J, Piste 5 : plante de Laghouat témoin, Piste6 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par un solution saline de 300mM pendant 18J ,Piste 7 :plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par un solution saline de 600mM pendant 18J . Rubisco LSU et SSU : grande et petite sous unité de la Rubisco respectivement.

La quantité de CDSP34 est analysée sur les plantes témoins et les plantes soumises à un stress hydrique par arrêt d'arrosage de 14J figure 4.16(A) et un arrosage par une solution saline de 300mM et 600mM pendant 18J figure 4.16(B) des plantules d' *Atriplex halimus* .

L'immunodétection sur membrane permet grâce à l'anticorps I635 de révéler spécifiquement la protéine membranaire thylakoidienne CDSP34. Les figures 4.16 (B) et (D) montrent que la quantité de CDSP34 est présente chez les deux populations d' *Atriplex halimus* , l'intensité de la bande correspondant à la CDSP34 est plus intense à celle observée chez les plantes témoins. Elle s'accumule suite à un stress hydrique chez la population de Djelfa et Laghouat(figure 4.16B piste 3 et 5).Le stress salin n'induit aucune différence d'accumulation de la CDSP34 (figure 4.16 D)

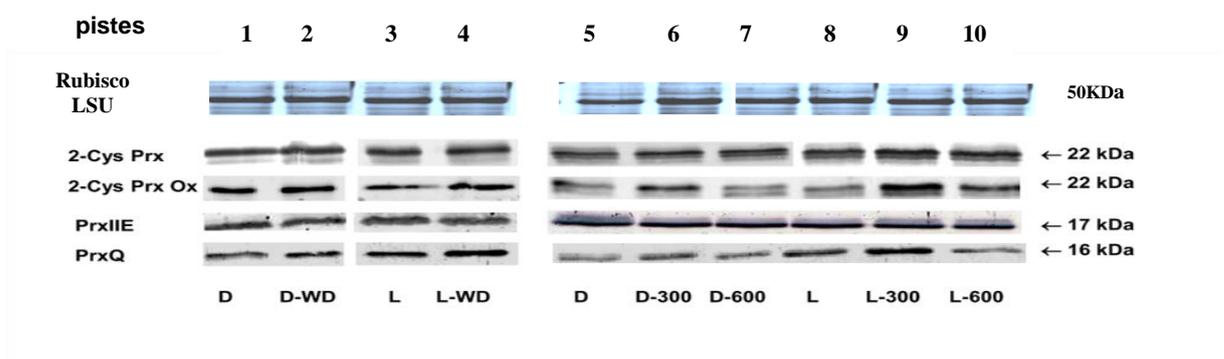
4.3.4.2.3. Mesure de l'abondance des Peroxyredoxines par SDS-PAGE

Les protéines de type thiol peroxydases comme les peroxyredoxines sont connues comme piègeurs de radicaux libres. Chez les 2 populations d'*Atriplex halimus* nous avons étudié les principales peroxyredoxines chloroplastiques, tout d'abord nous avons quantifié la 2-Cys Prx (BaS1), PrxQ et PRXII E. L'abondance des peroxyredoxines plastidiales a été étudiée chez les deux populations en utilisant des anticorps primaires dirigés contre elles. Pour la 2-Cys Prx (BaS1) et PrxII E nous avons utilisé l' anticorps primaire I3109 et l' anticorps primaire d'*Arabidopsis thaliana* . ils nous ont permis de révéler respectivement une bande à 22KDa pour la BaS1 et une bande à 17KDa pour la PrxII E (figure 4.17 A) pour la Prx Q ,l'anticorps primaire du peuplier, nous a permis de révéler la bande à 16KDa (figure 4.17 A).

Dans les conditions de témoin , les 2 populations Djelfa et Laghouat présentent des quantités de protéines similaires pour les trois peroxyredoxines chloroplastiques BaS1 ,Prx IIE et PrxQ (figure 4.17B) . Lorsqu'elles sont soumises à un déficit hydrique , aucun changement notable ne se produit dans les deux populations concernant l'abondance de Prxs par rapport aux conditions de contrôle . De même, la teneur en Prx 2 -Cys et PrxII E n'est pas modifié dans les plantes d'*Atriplex* imprégnées de sel (Fig. 4.17A et B) . En revanche, la quantité de PrxQ est particulièrement plus abondante chez les plantes Laghouat traitées à 300 mM NaCl.(figure 4.17A piste9 ligne PrxQ, figure 4.19B)

.L'analyse de la variance montre des différences significatives au seuils de 0,1% Test-t. Par ailleurs, nous avons étudié le niveau d'oxydation de la peroxyredoxine à 2 cystéines BAS1 à l'aide d'anticorps utilisé contre la protéine et contre la forme suroxydée (acide sulfinique) du résidu cystéine . L'abondance de la 2 Cys- Prx oxydée pourrait jouer un rôle essentiel dans processus de signalisation chez les plantes stressées. Nous avons observé que la quantité et le niveau d'oxydation de la 2-Cyst Prx oxy varie en fonction de l'intensité du stress. L'intensité de la bande est élevée à 300 mM NaCl chez les deux populations , mais dans une mesure beaucoup plus grande chez Laghouat par rapport à Djelfa .(figure 4.17 A piste 6 et 9 ligne 2-Cys Prx oxy, cette augmentation est significativement différente au seuil de 1% t-test (figure 4.17 B) . Le niveau d'oxydation de la 2-Cyst-Prx varie en fonction du stress hydrique .(figure 4.17 A piste 4 ligne 2-Cys Prx oxy),(figure 4.17B).

A-Western Blot



B-Quantification

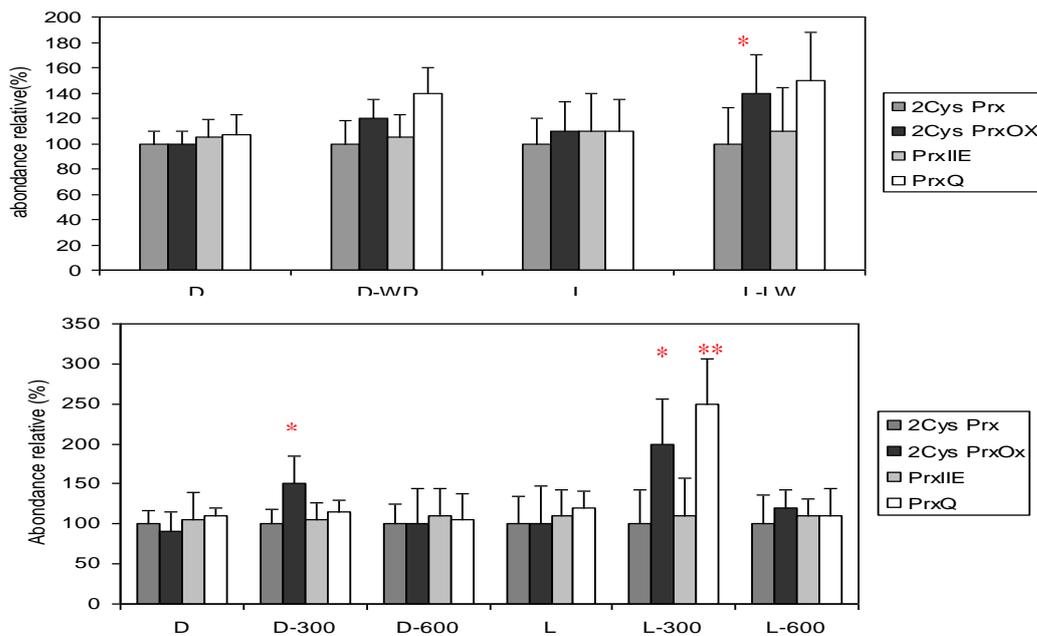


Figure 4.17 A Immunodetection sur membrane des protéines plastidiales, Bas1 , 2Cyst-Prx oxy, PrxIIIE, PrxQ dans les extraits de feuilles des plantes témoins et plantes stressées des 2

populations d'*Atriplex halimus* piste 1 :D,témoin Djelfa, piste 2 : L , témoin Laghouat ; piste3 D-WD, stress hydrique Djelfa ; piste4 :L-DW , stress hydrique Laghouat ; piste5 D-300,piste 6 D-600mM de NaCl, plantes de Djelfa traitées à 300,600mM de NaCl ; piste 7 et 8 L 300,600mM , plantes de Laghouat traitées à 300,600mM de NaCl . Des western blot similaires ont été obtenus sur 5 expériences indépendantes. Les protéines solubles ont été séparées sur gel SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose (15µg de protéines par piste). La grosse sous unité de la RUBISCO (révélation au bleue de Coomassie) est présentée pour montrer le chargement homogène des pistes. Figure 4.17 B, L'histogramme B représente la quantification de la quantité des protéines chloroplastiques effectuée à partir de 5 expériences indépendantes .

** les valeurs sont significativement différentes au seuil de 1% ($p < 0,01$) t-test

* les valeurs sont significativement différentes au seuil de 5% ($p < 0,05$) t-test

4.3.4.2.4. Détection et quantification des MSRs par électrophorèse SDS-PAGE

Les protéines Msr sont connues comme des enzymes qui réparent les méthionine oxydées. Elles jouent un rôle très important dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales (Laugier et al.,2010).L'abondance des MSR plastidiales a été étudiée chez les deux populations d'*Atriplex halimus* en utilisant des anticorps primaires dirigés contre elles. Pour la MsrB1 nous avons utilisé anticorps primaire d'*Arabidopsis thaliana* (I77LZ), il nous a permis de révéler la bande à 17KDa (figure 4.18A, ligne MsrB1) . pour la MsrB2 ,anticorps primaire du peuplier (MC77), nous a permis de révéler la bande à 15KDa (figure 4.18 A ,ligne MSRB2).L'anticorps anti MsrA4 révèle deux bandes (une forme oxydée et une forme réduite) vers 25KDa chez *Atriplex halimus* comme chez *Arabidopsis thaliana*, (Viera Dos santos et al.,2005) figure 4.18 A ,ligne MSRA4). La quantité de protéine MsrB2 varie peu chez les deux populations sous conditions de stress salin et hydrique. A 300Mm de NaCl une variation statistiquement significative ($p < 0,01$) de l'intensité de la bande de la MsrB1 et MsrA4 ont été observées chez la population de Laghouat à 300Mm (figure4.18A, piste 9, ligne MsrB2 et figure 4.18B) (figure 4.18 A piste 9,ligne MSRA4) ,en parallèle nous avons étudié l'activité des MSR chez les deux populations.

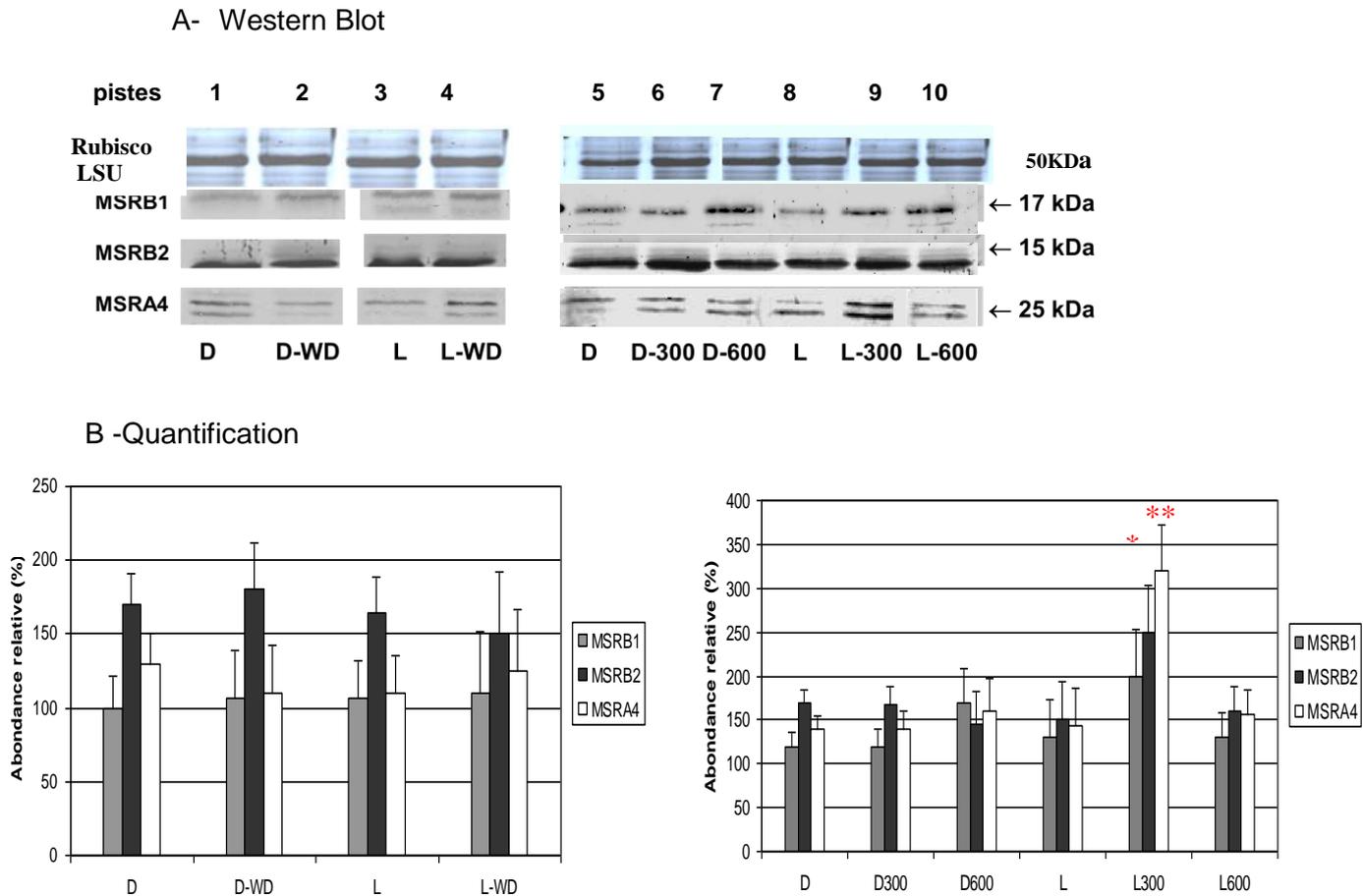


Figure 4.18A. Immunodetection sur membrane des protéines plastidiales, MsrB1 ,MsrB2,MsrA4 dans les extraits de feuilles des plantes témoins et plantes stressées des 2 populations d’Atriplex halimus des D,témoin Dejfa, L , témoin Laghouat ;D-WD, stress hydrique Djelfa ;L-DW , stress hydrique Laghouat ;D-300,D-600mM de NaCl, plantes de Djelfa traitées à 300,600mM de NaCl ;L 300,600Mm , plantes de Laghouat traitées à 300,600mM de NaCl . Des western blot similaires ont été obtenus sur 3 expériences indépendantes. Les protéines solubles ont été séparées sur gel SDS-PAGE, puis transférés sur membrane de nitrocellulose (25µg de protéines ont été déposées respectivement pour MsrB1 et MsrB2 et 8µg pour la MsrA4 par piste. La grosse sous unité de la RUBISCO (révélation au bleue de Coumassie) est présentée pour montrer le chargement homogène des pistes. Figure 4.18 B les histogrammes représentent la quantification des protéines chloroplastiques effectuée à partir de 5 expériences indépendantes.

** les valeurs sont significativement différentes au seuil de 1% (p<0,01) t-test

4.3.4.2.5 Mesures de l'abondance des catalases par SDS PAGE

Les Catalases sont connues comme des enzymes qui détournent les ROS. Elles jouent un rôle très important dans la réponse des plantes aux contraintes environnementales. L'abondance des Catalases enzyme présente au niveau des peroxysomes a été étudiée chez les deux populations d'*Atriplex halimus* en utilisant des anticorps primaires dirigés contre elle. L'anticorps primaire anti-catalase, après révélation basée sur la fluorescence (LICOR), nous a permis de révéler la bande à 50KDa (figure 4.21 B) Aucune différence significative d'accumulation des catalases n'a été observée entre les témoins et stressés. (données non représentées)

A western Blot

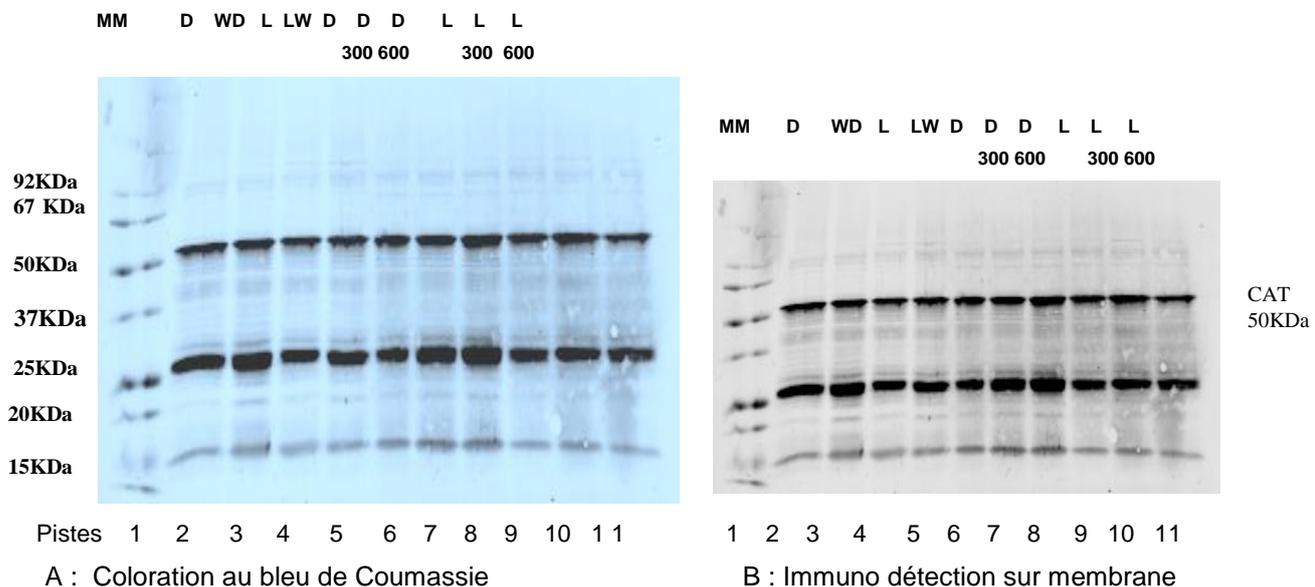


Figure 4.19: Immuno détection sur membrane de la protéine CDSP34 dans les extraits protéiques membranaires de feuilles témoins et stressés, au stress hydrique (A) et au stress salin (B) des deux populations d'*Atriplex halimus*. Puits chargés avec 25 µg de protéines. Anticorps dilués au 1/500^e

Piste 1 Marqueur moléculaire, Piste 2 : plante Témoin Djelfa, Piste 3 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par une solution saline de 300mM pendant 18J, Piste 4 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par une solution saline de 600mM pendant 18J, Piste 5 : plante de Laghouat témoin, Piste 6 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par une solution saline de 300mM pendant 18J, Piste 7 : plante de Djelfa stressée soumise à un arrosage par une solution saline de 600mM pendant 18J.

4.3.5. Mesures des activités enzymatiques

4.3.5.1. Activité des MSR par HPLC

L'activité des MSR des extraits de feuilles a été dosée en recherchant la réduction d'un substrat synthétique le Dabsyl-Metso en présence du DTE [207]. Chez les plantules d'*Atriplex*, en condition témoin l'activité totale des Msr est de 50 pmoles Met mg prot⁻¹ min⁻¹. (figure 4.20B) (Appendice B, Bilan activité Msr). Cette valeur est comparable aux valeurs trouvées chez *Arabidopsis thaliana* [207] après un déficit hydrique et un stress

salin aucune différence significative d'activité des Msr n'a été observé chez la population de Djelfa, cependant chez la population de Laghouat, sous condition de déficit hydrique il y a une diminution significative de cette activité. 50 pmoles Met mg protéine⁻¹min⁻¹ chez les témoins contre 32 pmoles Met mg protéine⁻¹min⁻¹ (figure 4.20 B). Au contraire sous condition de forte salinité (300mM de NaCl), les plantules issues de la population de Laghouat présentent une forte activité des Msr (59 pmoles Met mg protéine⁻¹min⁻¹ contre 44,5 pmoles Met mg protéine⁻¹min⁻¹ chez les témoins ($p < 0,01$ t-test) (Figure 4.20B), (Appendice B, Bilan activité Msr), (figure 4.20 A,B,C,D). Ces résultats montrent clairement une réponse différentielle des 2 populations concernant leur activité des Msr.

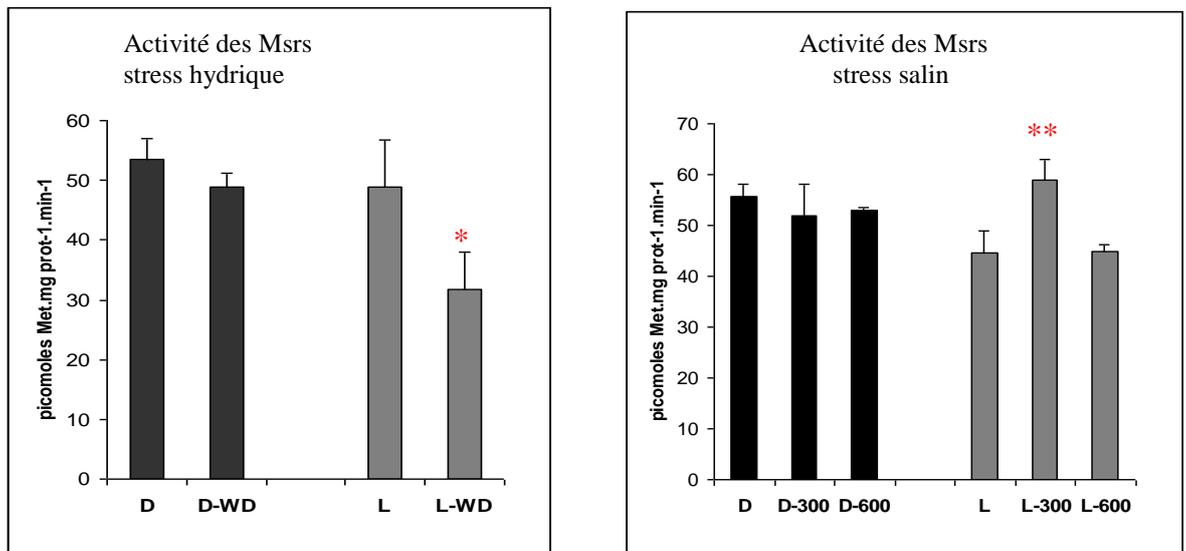


Figure 4.20 Effet du stress hydrique (A) et du stress salin(B) sur les activités des Methionines sulfoxydes réductases (Msr) au niveau feuilles des 2 populations d'*Atriplex halimus*. D, témoin Djelfa, L, témoin Laghouat ;D-WD, stress hydrique Djelfa ;L-DW, stress hydrique Laghouat ;D-300,D-600mM de NaCl, plantes de Djelfa traitées à 300,600mM de NaCl ;L 300,600mM, plantes de Laghouat traitées à 300,600mM de NaCl. Chaque valeur représente la moyenne de 5 mesures indépendantes.** les valeurs sont significativement différentes au seuil de 1% ($p < 0,01$) t-test

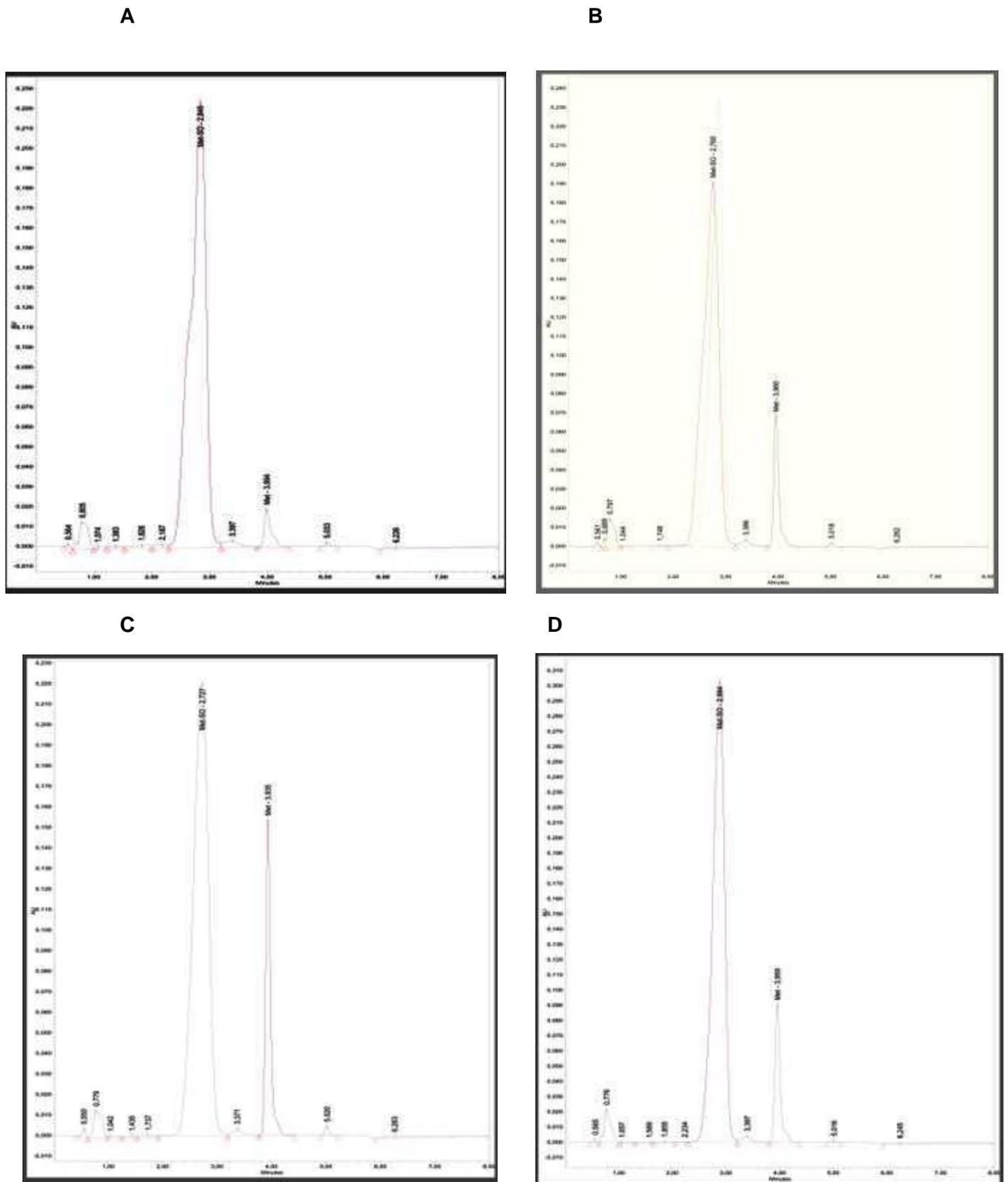


Figure 4.21: Profil chromatographique de l'extrait des plantules témoins et stressées. A : profil chromatographique (témoin Dabsyl)-B profil chromatographique témoin (extraits de plantes non stressées) -

C profil chromatographique (extraits de plantes De laghouat traitées avec 300mM de NaCl)-D profil chromatographique (extraits de plantes de Djelfa traitées avec 300mM de NaCl)

4.3.5.2. Activité des Catalases

L'activité des catalases des extraits de feuilles a été mesurée par spectrophotométrie en mesurant la quantité de H₂O₂ consommées à 240nm par les protéines solubles des extraits de plantes.(appendice B, bilan activité des catalases)

En conditions témoins et stress hydrique les 2 populations d'*Atriplex* présentent une même activité des catalases (28 μ moles H₂O₂ mg Prot⁻¹min⁻¹)Figure4.22A.

Lorsqu'elles sont exposées au sel, les plantes Djelfa affichent une activité catalase réduite (- 23%) par rapport aux conditions de contrôle. En revanche, l'activité de la catalase des plantules de la population de Laghouat exposée à 300 mM de NaCl est significativement différente au seuil de 1% (p<0,01)par rapport au témoin (Fig. 4.22B). Notons qu'à 600 mM de NaCl les deux populations affichent des niveaux similaires d'activité de la catalase. Ces données révèlent un comportement différencié en ce qui concerne l'activité des catalases dans les populations Djelfa et Laghouat exposé à 300 mM NaCl.

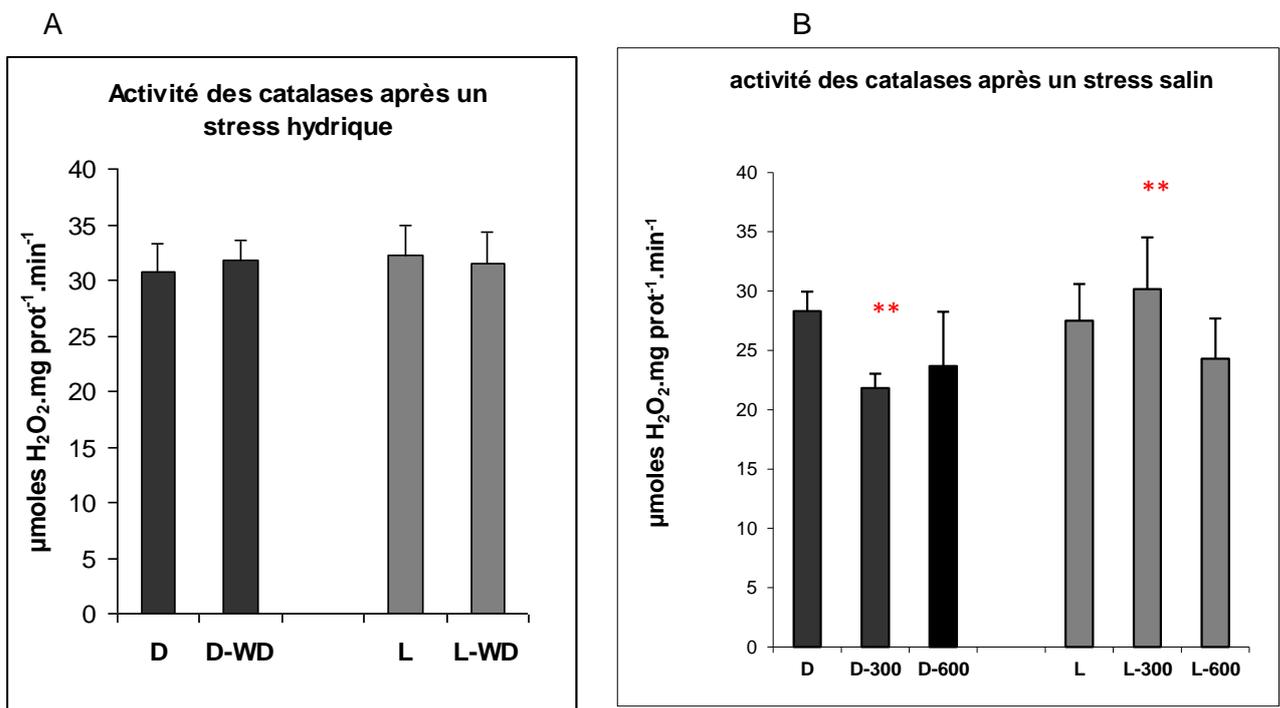


Figure4.22 Effets du stress s hydrique (A) et salin(B) sur l'activité des catalases (μ moles H₂O₂.mg prot⁻¹min⁻¹) an niveau des extraits de feuilles des deux populations d'*Atriplex halimus* :D,témoin Djelfa, L , témoin Laghouat ;D-WD, stress hydrique Djelfa ;L-DW , stress hydrique Laghouat ;D-300,D-600mM de NaCl, plantes de Djelfa traitées à 300,600mM de Nacl ;L 300,600mM , plantes de Laghouat traitées à 300,600mM de NaCl .Chaque valeur représente la moyenne de 5 mesures indépendantes.** valeur significativement différente au seuil de 1% (p<0,01) t-test

CHAPITRE 5 :

Discussion

Générale

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE

L'objectif de cette thèse est de comprendre les mécanismes de tolérance d'un espèce xéro-halophyte *Atriplex halimus* en condition de salinité et sécheresse .Pour cela , nous avons procédé par des études des paramètres physiologiques et biochimiques.

Dans la première partie de ce travail, les travaux ont été réalisés in situ. Nous avons étudié les effets du stress salin sur les plantules d'*Atriplex halimus* .Cela nous a ainsi permis d'identifier des marqueurs biochimiques de tolérance à la salinité chez cette espèce.

Dans la deuxième partie, nous avons mis en évidence la grande variabilité des composés biochimiques de deux populations algériennes d'*Atriplex halimus* en relation avec les conditions écologiques

1.Réponses physiologiques et biochimiques des plantules d'*Atriplex halimus* cultivées in situ au stress salin

Cette étude a été abordée par la recherche de marqueurs biochimiques (proline, sucres solubles, glycine betaine et chlorophylle) et d'indicateur de stress oxydatif, éventuellement la réponse antioxydante par la voie enzymatique.

Nos résultats montrent que les concentrations de 150mM de NaCl ont conduit à une stimulation de la production de matière sèche chez *Atriplex halimus*. Dans notre étude cette stimulation est associée à une augmentation de la concentration en Na⁺ foliaire (figure 4.30A).

Des réponses analogues ont été signalées chez d'autres halophytes telles que *Atriplex hortensis* [229], *Atriplex centralasiatica* [230] *Atriplex nummularia* [231], *Crithmum maritimum* [232], et *Cakile maritima* [233] .

Nos travaux ont mis en évidence la réduction très marquée du potentiel osmotique foliaire chez les plantes d'*Atriplex halimus* confrontée au stress salin : cette réduction peut être observée indépendamment de toute déshydratation tissulaire et résulte bien d'un processus actif d'accumulation de solutés organiques correspondant à un ajustement osmotique. L'accumulation d'ions inorganiques, de proline et sucres solubles au niveau des plantes entières permet d'expliquer l'importance quantitative de tel processus.

Chez les halophytes et notamment chez *Atriplex halimus* la stimulation de la croissance des plantes est observée à des concentration modérée en sel ,A des concentrations élevées le sel peut avoir des effets néfastes sur la croissance relative (figure 4.1). Des corélations négatives entre la croissance relative et le taux de Na⁺ R=-0,79** ont été

observées (figure 4.4a). La quantité de Na^+ contribue à la diminution de la croissance au niveau des plantes due à la toxicité des ions toxiques.

L'effet dépressif de la salinité sur la croissance des plantes peut avoir deux causes principales et non exclusives relatives aux difficultés d'alimentation en eau et en nutriments, et à la toxicité des ions accumulés en excès dans la plante [234]. Nos résultats suggèrent que la réduction de la production de la matière sèche observée consécutivement à l'addition de NaCl dans le milieu serait imputable à l'action défavorable du sodium accumulé dans les tissus. En effet, l'analyse minérale des plantes après 30 jours de développement montre que l'accumulation de Na^+ dans les organes aériens atteint des niveaux élevés, conduisant à la réduction de la matière sèche des plantules, particulièrement à la plus forte concentration en sel (600mM). Mais cette accumulation massive de Na^+ dans les tissus foliaires s'accompagne d'une diminution des teneurs en K^+ d'autant plus prononcée que la concentration en NaCl dans le milieu est plus élevée. Il est bien établi que la présence de Na^+ , Cl^- en grandes quantités dans le milieu entraîne une compétition au niveau des sites d'absorption de K^+ , Ca^{2+} et NO_3^- , se manifestant par la limitation de l'absorption de ces éléments nutritifs essentiels chez les halophytes [235] [236]. Nos résultats montrent une corrélation négative entre le poids sec des feuilles ($R = -0,89$), le taux de croissance relative ($R = -0,79$) et la sélectivité des ions Na^+/K^+ (figure 4.4 a, b). Ils montrent également que l'accumulation de Na^+ permet à la plante de maintenir son contenu relatif en eau (figure 4.1b). Une corrélation positive est observée entre l'accumulation de Na^+ et le maintien de la turgescence des cellules d'*Atriplex halimus* ($r = 0,48$) (figure 4.4c). Il apparaît chez cette espèce que la tolérance au sel est due à l'utilisation de Na^+ comme osmoticum. L'*Atriplex halimus* accumule des ions inorganiques particulièrement les ions Na^+ .

L'ajustement osmotique apparaît aujourd'hui comme un mécanisme majeur d'adaptation aux stress ioniques et osmotiques. Ce phénomène s'exprime par la capacité d'un végétal à accumuler, au niveau cytoplasmique et de manière active des ions tels que les ions K^+ et Na^+ et Cl^- [237] ou de composés organiques tels les sucres solubles et certains amino-acides comme la proline [238] [239]. Ainsi, l'ajustement osmotique permet le maintien de nombreuses fonctions physiologiques (photosynthèse, transpiration, croissance...) et peut intervenir à tous les stades du développement du végétal [240].

L'accumulation de ces composés organiques a été mise en évidence chez plusieurs espèces végétales soumises à la contrainte saline. Cette accumulation varie dans de larges proportions suivant l'espèce, le stade de développement et le niveau de la salinité. Les résultats obtenus montrent que l'accumulation de la proline et des sucres solubles totaux augmente avec la concentration saline dans les deux parties de la plante. Ce

résultat suggère l'utilisation par le végétal de ces composés dans l'ajustement osmotique [241]. Des corrélations négatives existent (Appendice C ,tableau47) entre la teneur totale en proline et la croissance relative de la plante ($r=-0,949$, $p=0,014$). De même nous avons observé des corrélations négatives significatives (Appendice C ,tableau47) entre la teneur totale en sucres solubles chez *A. halimus* et la croissance ($r=-0,901$, $p=0,037$).

Ces résultats corroborent ceux obtenus par Karimi et al. (2005) [242], Heidari-Sharifabad et Mirzaie-Nodoushan (2006) [243] et Song et al. (2006) [244], qui notent une augmentation de la teneur de la proline et des sucres totaux chez *Kochia prostrata*, *Salsola dendroides* et *Suaeda physophora* soumises à un stress salin. Il faut signaler que dans notre cas, les teneurs de ces deux solutés sont plus élevées au niveau de la partie aérienne par rapport à la partie racinaire. L'accumulation de certains solutés organiques (connus sous le nom d'osmo protectants) est une adaptation métabolique commune trouvée dans des diverses plantes soumises au stress salin ils contribuent à la croissance des plantes et retardent la sénescence foliaire [245]. Ces corps dissous protègent les protéines et les membranes cellulaires contre des dommages causés par la concentration élevée des ions inorganiques. Ces osmoprotectants protègent également les mécanismes métaboliques contre les dommages oxydatifs[246].L'ajustement osmotique a été considéré comme un mécanisme important dans la tolérance des plantes à la salinité. Ce mécanisme est un résultat de l'accumulation des corps organiques compatibles (tels que la proline et les sucres solubles) [247]. Cette réponse au stress salin permet éventuellement de maintenir la turgescence foliaire à une valeur positive, en dépit d'un abaissement du potentiel hydrique du milieu. [248].

L'ajustement osmotique favorise la production de matière sèche en conditions hydriques limitantes, en augmentant ou en maintenant la consommation globale en eau et la tolérance de la plante à la déshydratation [249]. La proline a été identifiée en tant qu'osmoprotecteur compatible et efficace, elle s'accumule en particulier dans les feuilles, à des concentrations élevées chez les halophytes et les glycophytes en réponse aux stress salin et hydrique[239]. Les résultats obtenus montrent, d'une façon générale, que l'accumulation de la proline chez *Atriplex halimus* est stimulée par le stress salin. Des résultats similaires ont été signalés chez d'autres halophytes, tels que *Salvadora persica* [250] *Juncus kraussii* [251].et *Suaeda physophora* [252]. [253].

L'accumulation de la proline, induite par le stress salin, peut être le résultat de la stimulation de sa synthèse [254]. résultant d'une élévation de quantités de messagers codant pour l'enzyme glutamine synthétase qui convertit la glutamine semi aldéhyde en

proline [255]. La stimulation de la pyrroline-5-carboxylate synthétase par le stress salin est signalée chez plusieurs espèces [256] [257]. L'accumulation de la proline peut être aussi le résultat de la diminution de son oxydation ou du blocage de la Protéogénèse [258]; d'après Hien et al. (2003) [256], le sel induit une inhibition de l'activité de la proline déshydrogénase et de la proline oxydase. De même une hydrolyse des protéines riches en proline et/ou une synthèse activée de nouveau de cet acide aminé aboutissent à son accumulation dans les cellules [239].

A l'instar de la proline, les résultats montrent que les sucres solubles sont aussi accumulés dans les plantules d'*Atriplex halimus* lors de l'augmentation de la concentration des sels solubles dans le milieu. Des résultats analogues ont été rapportés chez plusieurs halophytes et glycophytes sous stress salin; tels que *Aegiceras corniculatum* ; *Nicotiana tabacum* [260] ; *Plantago coronopus* [261].

L'accumulation des sucres solubles dans les feuilles a été largement rapportée comme une réponse à la salinité. Ils participeraient au phénomène d'ajustement osmotique [262]. Les sucres accumulés viennent essentiellement de l'hydrolyse des réserves d'amidon ou du blocage de la glycolyse [263]. Dubey et Sing 1999 [264] ont observé une dégradation de l'amidon accompagnée d'une augmentation des teneurs en sucres solubles qui peut être attribuée à une augmentation de l'activité de l'amidon phosphorylase, de celle du glucose phosphatase synthétase et d'une diminution de l'activité de l'invertase. L'accumulation des sucres solubles peut être aussi le résultat d'une utilisation réduite plutôt que d'une augmentation de leur biosynthèse [265].

Chez les Chénopodiacées en générale et chez les espèces du genre *Atriplex*, la glycinebetaine s'accumule en condition du stress hydrique et salin et participe à l'ajustement osmotique tout en contribuant à la protection des structures cellulaires, particulièrement au niveau des membranes thylakoidiennes et les antennes collectrices du PSII [266]. Le stress salin induit une augmentation significative des teneurs en glycinebetaine au niveau des plantes entières. Il est néanmoins établi que la synthèse de la glycine betaine, le principale composé d'ammonium quaternaire intervenant dans la résistance chez les Chenopodiaceae se déroule au sein des chloroplaste [266]. Les teneurs cytosoliques demeurent relativement faibles mêmes en condition de stress [267]. Compte tenu de cette compartimentation, ces composés ont un rôle important dans l'ajustement osmotique des chloroplastes comme l'ont démontré [268], chez *Atriplex barclayana*.

Une synthèse chloroplastique expliquerait également l'absence de la glycinebétaine dans les racines des plantes non stressées dépourvus de chloroplastes fonctionnels. Nos résultats concordent avec ceux de Koheil et al., 1992[269] qui ont observé la présence de faibles teneurs en glycinebétaine au sein des racines des plantules d'*Atriplex halimus*. La présence de ces composés au niveau des racines exposées à 150mM et 300mM de NaCl devrait être en relation avec une stimulation de la translocation phloémienne de ces composés mise en évidence par Makela et al., 1996 [270]. Chez les plantes exposées à 450 et 600mM de NaCl, une accumulation essentiellement chloroplastique de la glycinebétaine doit aller de paire avec une accumulation de solutés compatibles. Des corrélations négatives significatives ont été observées entre la croissance des plantes et l'accumulation de glycines bétaine au niveau des plantes. De même nous avons observé des corrélations positives significatives entre les différents solutés organiques recherchés et la glycine bétaine (Appendice C, tableau 47)

Il est bien établi que les plantes soumises au stress salin sont exposées aux formes actives de l'oxygène (ROS) et à l'accumulation des radicaux libres liés aux dommages des membranes, à la peroxydation de lipides et à la dénaturation des protéines et de l'ADN [271]. [272].

L'accumulation excessive des ROS au niveau des cellules entraîne des dommages importants au niveau du compartiment chloroplastique, plusieurs antioxydants de nature non enzymatique contribuent à détoxifier les ROS en les piégeant comme par exemple les caroténoïdes, les chlorophylles, les flavonoïdes et les composés phénoliques [273]. Dans nos essais la chlorophylle a et b semble non affecter par les doses de NaCl entre 150Mm et 450Mm à 600Mm on note une nette diminution.

La réduction de la concentration des chlorophylles des plantes sous stress pourrait être attribuée à une activation de la dégradation enzymatique par des chlorophyllases [274].

Nos résultats suggèrent que chez *Atriplex halimus*, la teneur en chlorophylle (a+b) ne varie pas en fonction des traitements de NaCl (150mM, 300mM) cette espèce tolère une forte concentration de NaCl en élaborant normalement l'activité photosynthétique et la production de la matière organique.

Effectivement, des corrélations positives significatives (Appendice C, tableau 47) existent entre la teneur en chlorophylle totale et la croissance relative ($r=0,876$, $p=0,051$)

Nos résultats sont conformes avec ceux de Redondo-Gómez et al., (2007) [275]. Des plants d'*A. portulacoides* ont été soumis à un stress salin par des traitements de NaCl (0, 20, 200, 400 et 700mol m⁻³) pendant 60 jours. La fluorescence chlorophyllienne et la teneur en chlorophylles (a),(b) et totale n'ont pas été affectées par la salinité.

Nous considérons que le stress salin chez *Atriplex halimus* est en effet un stress oxydatif,

comme dans le cas de plusieurs autres espèces [276]. En effet, les processus de la dégradation oxydative semblent procéder dans les membranes photosynthétiques des plantes d'*Atriplex halimus* se développant dans des conditions salin très sévères. Dans cette étude, le contenu des chlorophylles demeure inchangé à des concentrations faibles de NaCl. Puis, la chlorophylle a diminue à 600mM de NaCl. En outre à 600mM de NaCl, la chlorophylle a diminue davantage que la chlorophylle b. Les teneurs en chlorophylles sont un facteur important pour la détermination de la capacité photosynthétique. Une diminution ou encore une stabilité du niveau chlorophyllien sont observées pendant des périodes de contraintes salines selon sa durée et sa sévérité [277] [278][279]. La structure interne du chloroplaste est un système membranaire complexe, connu sous le nom de membrane photosynthétique ou membrane thylacoïdale, sa stabilité dépend de la stabilité membranaire qui, sous conditions de sécheresse ou salinité, reste rarement intact [280]. Cependant, certains auteurs (Khayyat et al., 2007) [281]. ont remarqué une augmentation considérable des teneurs en chlorophylles lorsque le milieu de culture est déficient en eau ou salin. Majumdar et al. (1991) [282] ont rapporté un accroissement significatif de l'activité spécifique de la chlorophyllase, la première enzyme impliquée dans la dégradation de la chlorophylle sous l'effet du stress hydrique ou salin. Chez *Atriplex halimus* la quantité de chlA et chlB demeure inchangée entre 150mM et 450mM. Des résultats similaires ont été observées chez *Artemisia anethifolia* [283] et *H. vulgare*, [284]. Suite à la détérioration membranaire, l'enzyme activée se met en contact avec son substrat et il s'en suit la perte des chlorophylles. Une autre enzyme impliquée dans la dégradation chlorophyllienne, il s'agit des peroxydases [285]. Sur des feuilles d'orge en sénescence, ces auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'activité des peroxydases conjointement à une diminution des teneurs chlorophylliennes.

L'augmentation de l'activité des peroxydases était rapportée aussi par [286] (Sancho et al., 1996, Chen et al., 1993 in Harinasut et al., 2003) [287] indiquent que l'augmentation de l'activité totale des peroxydases dans le milieu des cellules adaptées reflète le changement des propriétés mécaniques des parois cellulaires qui sont reliés aux processus d'adaptation à la salinité, les propriétés des parois cellulaires sont connues d'être modifiées par le stress salin. Il y a une relation étroite entre l'activité des peroxydases et le changement de la paroi et de l'intégrité membranaire sous le stress salin. Harinasut et al., 2003 [287].rapportent que la production des radicaux libres est responsable de la peroxydation des lipides membranaires. Cette peroxydation augmente en cas de stress salin. Leurs résultats montrent que la concentration de NaCl active l'expression de l'activité des peroxydases chez le melon [287]. Ce qui confère l'évidente conviction que la concentration de NaCl active l'expression de l'activité des peroxydases chez *Atriplex halimus*. L'*Atriplex* présente aussi une corrélation significative entre les

peroxydases foliaires et la croissance relative des plantes ($r=0.951, P=0.013$), (Appendice C ,tableau47)

De même, l'augmentation de la teneur en MDA foliaire, indicateur d'une dégradation oxydative des lipides membranaires, pourrait aussi expliquer cette diminution de l'activité photosynthétique. En effet, une dégradation lipidique entraînerait une perturbation des membranes thylacoïdales, une perte de l'intégrité des chloroplastes et par suite une diminution de l'activité photosynthétique [288].

Lorsque la photosynthèse est réduite, le taux de production du pouvoir redox domine le taux de sa réoxydation, principalement par réduction de CO_2 . Ainsi, une réduction de transport photosynthétique d'électron se produit et génère excessivement ROS dans le chloroplaste [289]. Différents mécanismes permettent de contrecarrer l'accumulation des produits toxiques. Dans notre étude, on s'est limité à la réponse de certaines enzymes impliquées dans le mécanisme de la détoxification. Les résultats obtenus mettent en évidence une variabilité dans la réponse enzymatique des plantes soumises aux contraintes salines.

La catalase décompose et détoxifie H_2O_2 pour former l'eau et l'oxygène [290].

Diverses réponses des activités de CAT au déficit hydrique et salin sont rapportées. Certaines études ont observé que le stress hydrique engendre des activités élevées de la catalase [291][292]. Dans notre étude, l'activité catalase a augmenté avec la contrainte saline. Une telle réponse est rapportée chez d'autres espèces [293] [294][295]. La diminution de l'activité CAT pourrait être attribuée à sa photo-inactivation [296][297]. L'inhibition de la synthèse de la protéine induite par le stress salin [298]. Ces auteurs expliquent en partie la diminution marquée de l'activité de CAT dans la lumière chez des plantes soumises à un stress hydrique [299]. Les autres enzymes de la détoxification de H_2O_2 sont les peroxydases. Elles sont situées dans le chloroplaste, le cytosol et l'apoplaste, et elles ont une affinité beaucoup plus élevée pour H_2O_2 que les catalases [300]. La molécule H_2O_2 peut diffuser librement à travers les membranes cellulaires et les peroxydases peuvent la détoxifier dans le chloroplaste [301][302]. Une augmentation significative des enzymes antioxydantes a été signalé chez les plantes tolérantes au sel et les plantes halophytes[303].

Nous avons noté également que le niveau des phénols totaux a augmenté dans les feuilles (Tableau4.2). Une telle augmentation sous stress salin suggère que ces composés pourraient contribuer à la protection de la plante aux méfaits de cette contrainte.

Cette constatation est en accord avec des résultats montrant que les poly-phénols sont

impliqués dans la tolérance de soja aux concentrations élevées en aluminium [304]. Par ailleurs, il a été décrit que la synthèse des composés phénoliques a été déclenchée dans les plantes en réponse aux stress biotiques et abiotiques [305]. Il a été proposé que des composés phyto-phénoliques, en particulier les flavonols et phénylpropanoïdes dans les vacuoles et les apoplastes sont capables de détoxifier le H₂O₂ en s'en servant comme donneurs d'électrons pour les phénols peroxydases (peroxydases gaïacols) localisés dans ces compartiments, ce qui entraîne la formation des radicaux phénoxyles [306].

2.Participation des protéines à thiols et la glycine bétaine dans la réponse de deux populations d'*Atriplex halimus* au stress hydrique et salin

La tolérance au stress hydrique et salin a été étudiée sur deux populations d'*Atriplex halimus*, une en provenance de la région de Djelfa et l'autre population en provenance de la région de Laghouat où les conditions écologiques sont représentées dans le tableau 4.1. Cependant aucune différence significative a été observée entre les deux populations quand elles sont soumises à un déficit hydrique ou un traitement avec du PEG 8000 (tableau 4.4). Le traitement par du NaCl induit chez la population de Laghouat une réponse différentielle. Les plantules de Laghouat présentent un poids frais et un poids sec significativement plus élevés que la population de Djelfa. La concentration élevée en Na⁺ chez les plantules de Laghouat en provenance d'une région aride (tableau 4.8) . Cette accumulation des ions Na⁺ est due à un maintien du potentiel osmotique bas et ainsi le Na⁺ pourrait contribuer au maintien de l'ajustement osmotique, nos résultats concordent avec ceux de Benhassine et al., 2008. [307]

Les solutés organiques comme les sucres solubles, la proline, les ammonium quaternaire sont connus comme osmorégulateurs présents chez les halophytes [307].

En accord avec ces chercheurs nos résultats indiquent que les deux populations accumulent ces solutés en conditions de stress hydrique et salin par rapport au témoin. La population de Laghouat accumule beaucoup plus de glycine bétaine et proline en condition de stress salin pour son ajustement osmotique que la population de Djelfa (figure 4.11C). Nos résultats sont en accord avec ceux de Benhassine et al., 2008 [307] où ils montrent que les populations d'*Atriplex halimus* qui vivent sur des sols salins accumulent beaucoup plus de glycine bétaine par rapport à celles qui vivent sur des sols faiblement salins. D'autres travaux qui ont été réalisés par Ait Saadi (2011) [308], cet auteur constate que la quantité de terpénoïdes chez deux espèces du genre *Pistacia* (*Pistacia atlantica* et *Pistacia lentiscus*) varie en fonction des populations situées dans les zones arides et semi-arides .

La réaction des organismes vivants à des situations défavorables et aux stress se traduit notamment par la synthèse rapide de polypeptides [309] .

Les protéines de stress jouent un rôle dans l'adaptation de la plante, et de ce fait, de nombreux chercheurs abordent la résistance au stress par l'isolement et l'étude de ces molécules [310]. Le sel induit des modifications qualitatives et quantitatives dans la synthèse des protéines, détectables par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Dans cette partie on s'est intéressée à la participation des protéines chloroplastiques comme les thiols réductase les méthionine sulfoxydes réductases qui réduisent la méthionine oxydées (Msr) et les peroxyredoxines (Prx) ainsi que les enzymes antioxydantes comme les catalases dans la réponse d'une halophyte *Atriplex halimus* au stress oxydant.

L'abondance de la protéine Bas1 et Prx II E a été étudié chez les deux populations d'*Atriplex halimus* soumis à divers stress abiotiques. En conditions témoins, aucune variation de la quantité de ces deux protéines n'a été observée. Nos résultats correspondent à ceux observés chez Lamkemeyer et al. 2006, [311], Navrot et al. 2006, [312] Rouhier et al. 2004) [313].

Dans certaines circonstances, l'expression de 2-Cys Prx et Prx IIE pourrait néanmoins répondre à des conditions de stress oxydant comme dans le cas d'un stress salin chez certaines espèces

La PrxQ a été identifiée comme cibles d'une autre protéine la Thiorédoxine (CDSP32) [314]. La CDSP32 n'a pas été détectée chez *Atriplex halimus* de même la glutaredoxine (données non présentées). La CDSP32, est une TRx spécifique présent dans le chloroplaste qui est capable d'interagir (donneurs des électrons) avec d'autres protéines chloroplastique Prxs (PrxQ et 2cyst-Prx), pourrait utiliser un mécanisme similaire au glutarédoxine [315] [316].

En condition de stress hydrique les peroxyredoxines 2 Cyst- Prx (BaS1), PrxIIE ne présentent aucune variation (Figure 4.17 A, B), mais on observe une variation de la Prx Q chez Laghouat traitée à 300mM de NaCl (figure 4.17A ligne Prx Q piste 9 figure 4.17B). Nos résultats sont en accord avec ceux de Gama et al., 2008 [317]. ces auteurs observent aucune variation de 2 Cyst- Prx (BaS1), PrxII E protéines chloroplastiques chez *arabidopsis thaliana* mais ils observent une variation de la prx Q après un déficit hydrique et un traitement photooxydant. Ces protéines participent à la protection de l'appareil photosynthétique des plantes exposées à un stress biotiques et abiotiques [311] [313]. Nos résultats montrent que les plantules issues de la population de Laghouat traitées avec 300Mm de NaCl présentent une accumulation significativement différente de la 2Cyst-Prx oxydée par rapport à Djelfa (Figure 4.17A ligne PrxOx piste 9, figure 4.17B). Cette protéine avait été décrite comme intervenant dans la protection de l'appareil photosynthétique contre le stress oxydant en utilisant des lignées antisens [318]. Les travaux de REY et al., 2007 [318] ont utilisé des mutants d'*Arabidopsis thaliana*

déficients en 2-Cyst Prx et en suféridoxine (enzyme responsable de la réduction de la forme suroxydée de la 2-Cyst Prx) . Ces mutants présentent une capacité photosynthétique supérieure au plante sauvage et moins de dommage généré par une forte luminosité . Ce rôle positif de la mutation pourrait être lié à l'état de suroxydation de la cystéine peroxydasique de la 2-Cys Prx et sa participation dans les mécanismes de signalisation .

Nos résultats suggèrent que le niveau des protéines 2Cyst-Prx et PrxII ne changent pas par contre la quantité de Prx Q et 2Cyt-Prx oxydée changent on constate qu'il y a une augmentation significative chez Laghouat par rapport à Djelfa. Chez *Atriplex halimus* nous avons étudié le niveau de suroxydation de la peroxydase par des méthodes immunologiques et observé que ce niveau varie avec le stress abiotique . Ces données suggèrent une participation possible de ce type de Prx dans le contrôle du métabolisme cellulaire en fonction du stress.

En ce qui concerne les Msr, nous observons aucun changement significatif de leur activité dans la réduction de la MetSO chez la population de Djelfa traitées au NaCl . Au contraire chez les plantules de Laghouat exposées à 300mM de NaCl montrent une activité significative des Msr par rapport au témoin (figure 4.20A,B) . Les mesures de l'activité des Msr à partir d'extrait de feuilles ont été révélées par HPLC. Par électrophorèse SDS PAGE, nous avons mesuré leur abondance chez la population de Laghouat traitées à 300mM de NaCl (figure 4.18A ligne MsrA,B piste 9, figure 4.18B). Plusieurs travaux montrent que les plantes exposées à un stress environnemental présentent une accumulation accrue de ces protéines et que ces systèmes antioxydants participent à la tolérance des plantes au stress oxydant [318] [319].

Les résultats obtenus indiquent que les deux populations accumulent ces protéines et présentent une forte activité des Msr et des catalases notamment chez la population de Laghouat traitée à 300mM de NaCl.

Les résultats présentés dans le cadre de cette étude suggèrent qu'une Réponse différentielle des 2 populations d'*Atriplex halimus* est en fonction de leur habitat. La population de Laghouat est plus tolérante à la salinité. A partir de nos résultats, nous supposons que les osmolytes et les systèmes antioxydants participent à la tolérance au stress salin chez la population de Laghouat. Ces travaux montrent la participation probable des réductases à thiols dans la réponse d'*Atriplex halimus* à une forte salinité et que le niveau d'oxydation de la BaS1 pourrait être associé au mécanisme de tolérance.

CHAPITRE 6 :

Conclusion et

perspectives

CHAPITRE 6 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les mécanismes de réponse aux stress, font intervenir un certain nombre de réactions au sein d'un processus physiologique. Chez les plantes, ces différentes étapes correspondent à la perception et la reconnaissance du stress, la transduction du signal qui en résulte à l'intérieur de la cellule, l'amplification de ce signal, la modification de l'expression de certains gènes et la production de molécules impliquées dans le rétablissement de l'homéostasie cellulaire. La chlorophylle, les molécules d'osmorégulation et les enzymes impliquées dans cette cascade de réactions peuvent être considérées comme des marqueurs de la réponse au stress salin.

Les études menées dans le cadre de ce travail ont permis d'élargir nos connaissances sur les réponses physiologiques, biochimiques sous condition de stress salin chez une espèce halophyte autochtone à intérêt fourrager *Atriplex halimus*. Ce travail a confirmé l'adaptation d'*Atriplex halimus* à la salinité et sa tendance à l'halophilie. En effet, l'influence de la salinité dans le milieu se traduit par une stimulation de la production de la matière sèche, particulièrement à 150 mM de NaCl. Au delà de ces concentrations salines, le sel affecte négativement la production de la matière sèche. Par ailleurs, la concentration saline provoque une diminution de la croissance, l'action dépressive du sel se fait davantage sentir au niveau des racines par rapport à la partie aérienne.

Le statut hydrique a chuté à des concentrations élevées de sel a permis à la plante de garder un statut hydrique proche de celui des témoins. Ainsi les valeurs du potentiel hydrique foliaire et de la teneur en eau relative étaient plus proches de celles des plantes témoins.

La proline, les sucres totaux et la Glycine bétaine sont accumulés en quantités relativement proportionnelles aux concentrations salines. Leurs teneurs sont corrélées négativement à la production de matière sèche. Ces osmotocums participent à l'ajustement osmotique des cellules du végétal en conditions salines.

Sur le plan biochimique, le stress salin induit un stress oxydatif au niveau des tissus foliaires de *Atriplex halimus*, comme indiqué par la production de malonyldialdéhyde au niveau des feuilles à 150 mM. La contrainte saline a montré l'induction d'un mécanisme antioxydant pour se protéger contre les radicaux libres pour des traitements de 300 mM de NaCl. Les organes souterrains n'ont pas été concernés par une telle réduction. (données non représentées). Des augmentations dans les activités des enzymes antioxydantes POX et CAT à 300 mM sont observées.

D'autre part, la différence dans les réponses enzymatiques POX et CAT est accompagnée d'un niveau plus élevé des composés phénoliques et des flavonoïdes dans les feuilles sous stress salin.

Dans le deuxième volet de ce travail nous avons exploré la variabilité de réponses de 2 populations d'*Atriplex halimus* différentes par leur habitat.

A 300mM de NaCl, les plantules de Laghouat accumulent de façon significative la proline, la glycine bêtaïne, les Prx Q et les Msrs. Elles présentent une forte activité de la catalase et des méthionine sulfoxyde réductases (Msrs) que la population de Djelfa. Le niveau d'oxydation et la signification physiologique de certaines protéines chloroplastiques comme la Prx à deux cystéines BAS1 à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine et la forme oxydée (acide sulfonique) du résidu de cystéine a été étudié. A partir de nos résultats, nous supposons que les osmolytes et les systèmes antioxydants participent à la tolérance au stress salin chez la population de Laghouat. Ces travaux montrent la participation probable des thiols réductases comme les MSR, Prx dans la tolérance d'*Atriplex halimus* à une forte salinité et que le niveau d'oxydation de la BaS1 pourrait être associé au mécanisme de tolérance.

Perspectives

Bien que ce travail ait tenté de caractériser la réaction d'une espèce fourragère vis-à-vis du stress salin, en se basant sur des critères physiologiques et biochimiques au stade de la croissance, rendant compte de l'aptitude de cette espèce à tolérer le sel, dans des conditions contrôlées, plusieurs autres questions restent encore posées et nécessitent d'être approfondies à savoir:

Il serait intéressant d'identifier d'autres marqueurs de résistance comme les enzymes antioxydantes non thiols les superoxydes dismutase (SOD), les glutathion peroxydases (GST) et ascorbates peroxydases (APX) et les systèmes antioxydants non enzymatiques qui sont essentiellement représentés par les caroténoïdes, α tocophérol. L'étude de ces systèmes antioxydants dans la protection de l'intégrité de l'appareil photosynthétique est une étape importante à explorer. Le stress hydrique et salin favorisent chez certaines espèces l'accumulation des composés terpéniques. Il serait intéressant d'étudier ces composés et les effets de ces facteurs abiotiques sur l'expression des gènes candidats impliqués dans la biosynthèse des marqueurs d'aridité et de salinité.

REFERENCES

REFERENCES

- [1] Rozema, J., Flowers, T., "Crops for a salinized world". Science 322, (2008) 1478–1480.
- [2] Mezni, M., Albouchi, A., Bizid, E., Hamza, M., « Effet de la salinité des eaux d'irrigation sur la nutrition minérale chez trois variétés de luzerne pérenne (*Medicago sativa*) ». Agronomie, 22, (2002), pp. 283-291.
- [3] Ben Naceur, M., Rahmoune, C., Sdiri, H., Meddahi, M. L., Selmi, M., "Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains de quelques variétés maghrébines de blé". Sciences et changements planétaires/ sécheresse. Vol. 12, n° 3, (2001) pp. 74-167.
- [4] Kylin, S.K., Quatrano, J.P., "Classification of diverse bread wheat-growing environments based on differential yield responses". Crop Sci., 31:(1975); 571-576.
- [5] Parida, A., et Das, J.C., "Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves". Physiol. Plant. 59: (2005) 189-195.
- [6] Brugnoli, T.J., Lauteri, A.R., "A decimal code for the growth stages of cereals". Weed Res., 14: (1991). 415-421.
- [7] Rathinasabapathi, S., Bekki, A., Trinchant, J. C., Rigaud, J., "Nitrogen fixation by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress". Physiol plant, 71: (2000), 61-67.
- [8] McCue, K.F., et Hanson, A.D., "Drought and salt tolerance :towards understanding and application". Trends Biotech, 8, (1990) 358-362.
- [9] Raymond, M.J., Smirnov, N., "Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential". Annals of Botany 89, (2002), 813–823.
- [10] Rhodes, D., Hanson, A.D., "Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants". Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44,(1993),357-384.
- [11] Tattini, Keller, F., Ludlow, M. M., "Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of Pigeonpea (*Cajanus cajan*)". Journal of Experimental Botany, 44 (265),(1996), 1351-1359.
- [12] Bohnert, J., Jensen, S., "The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*". Physiol Plant 1998; 104:169-74.
- [13] Smirnov, F., Smirnov, N., "The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation". New Phytol;125,(1993), 27-58

- [14] Hernandez , D.,Borsani O, Valpuesta V, Botella MA. « Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings”. *Plant Physiol* 126, (2001), 1024-1030.
- [15] Apel K, Hirt H..Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Ann Rev Plant Biol.*55, (2004),373–99.
- [16] Demiral T, Turkan I.,”Comparative lipid peroxidation, antioxidant systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance”. *Environ Exp Bot*;53: (2005)247–57.
- [17] Jithesh., Tsai YC, Hong CY, Liu LF, Kao CH. Expression of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in roots of rice seedlings in response to NaCl and H₂O₂. *J Plant Physiol* (2006) 162:291-299
- [18] Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdelly C. “Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*”. *Plant Physiol Biochem* (2007);45:244-9.
- [19] Tarrago,L., « Les Methionine sulfoxydes réductases de type B plastidiales d'*Arabidopsis thaliana* : Mécanismes de régénération par les thiorédoxines et les glutarédoxines, cibles potentielles et rôles physiologiques. Thèse de Doctorat .Université d'AIX-Marseille (2009),242p
- [20] Maalem, S., "Etude écophysiological de trois espèces halophytes du genre *Atriplex* (*A.canescens*, *A. halimus* et *A. nummularia*) soumises à l'engraisement phosphaté". Thèse de magistère en physiologie végétale et applications biotechnologiques. Université Baji Mokhtar, Annaba, Algérie, (2002) 76p
- [21] Mulas, M., "Potentialité d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification". Short and Medium, Term Priority Environmental Action Programme (SMAP) (2004). 91p
- [22]Chadefaut ,S.,et Emberger ,J.M., “The influence of sheep on pattern and process in *Atriplex vesicaria* populations from the Riverine Plain of New South Wales”. *Aust. J. Bot.* 26, (1960), 381-392
- [23] Francllet et le Houerou, "Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord". Doc. Tech n° 7, FAO, Rome, (1971) . 249p
- [24] Quezel ,F., et Santa ,M., “ Range management in Central Tunisia. Office of Livestock and Pastures” Ministry of Agriculture, Tunisia and Oregon State University, Corvallis OR (USA) (1962).
- [25] Abbad, A., Benchaabane, A. “The phenological study of *Atriplex halimus* L”. *Afr. J. Ecol.* 42: 69-73. (2004)

[26] Mattia, C., Bischetti, G.B., Gentile, F. "Biotechnical characteristics of root systems of typical Mediterranean species". *Plant Soil* 278: 23-32. (2005)

[27] Bouabdellah E. « La végétation steppique sur sols salés des hautes-plaines sud-Algéroises. Composition, structure et production, » Thèse Doc., Univ. Paris sud. Centre d'Orsay, (1992) 206 p.

[28] KIES,M., Huang J., & Reddman R.E., "Salt tolerance of *Hordeum* and *Brassica* species during germination and early seedling growth". *Can. J. Plant Sci.* 75(1977) 815-819.

[29] Mouhouche,M., "Etude comparative des activités phosphatasiques acides et des paramètres hydriques foliaires de cultivars de mil (*P. americanum* L.) soumis à des contraintes hydriques". Thèse de Doctorat, Université de Paris VII, (1998). 179 pp.

[30] Blum,J.P., "Restrictions to carbon dioxide conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress". *Plant Physiol.* 119: (1996). 1101–1106.

[31] Levitt, J., " Responses of plants to environmental stresses. I-Chilling, freezing and high temperature". Academic Press., New York, USA, 1980.607 pages.

[32]Taiz, M., "Stomatal closure of maize hybrids in response to soil drying". *Crop Sci.* 37: (1991). 803-807.

[33]Richter ,S., "Comparaison du comportement hydrique et de la capacité photosynthétique du maïs et du tournesol en conditions de contrainte hydrique. Conclusions sur l'efficience de l'eau". *Agronomie* 17: (1993) 17-24

[34] Plaut ,H.W.,et Federman.,M.J., "Increased chromosomal variation intransgenic versus non transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants". *Crop Sci.*,40: (1991). 524-533.

[35] Tourneux, H.W.,Lemaux, M.J., Cho,P.J., "Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm- supported culture". *Agricultural Sciences in China* 5: (1995), 572-578.

[36] Havaux ,M., " Rapid photosynthetic adaptation to heat stress triggered in potato leaves by moderately elevated temperature". *Plant Cell and environment* 16, (1993) 461-467

[37]Navari –Izzo, Fcluartacci . MF et Izzo R. "Lipid changes in maize seedling in response to field water deficit" .*J.Exp Bot.* 40,15, (1989). 675-680.

[38] Ferrari -Illiou, et Da Silva IV ;"Effet of water deficit on the lipid and fatty acid composition of cotton chloroplast". *Physiol plant* V 62, (1984)219-224.

[39] Meyer S.,Hung S.P.N., Trémolières ,A., "Energy coupling membrane lipids and structure of thylakoids of lupin plants submitted to water stress". *Photosynthesis Res.* V32, 5(1992), 769-780.

- [40] Navari –Izzo, Fcluartacci , M.F et Izzo R ., "Lipid composition of plasma membranes isolated from sunflower seedling grown under water stress". *Physiol Plant* V 87(1993), 508-514.
- [41] Kappus, H., "Lipid peroxydation : Mechanism, analyses enzymology and biological relevance". In sies H. (Eds), *oxydative stress*,Academics press. New york (1985),273-310
- [42] Robelin,M. , et Deraissac.,M., "Fonctionnement hydrique et adaptation à la sécheresse". In Gallais (Eds). *Physiologie du maïs Paris :INRA.* (1984) pp 345-376.
- [43] Turner ,N.C., "Adaptation to water deficits : a changing perspective. " *Aus.J.Plant Physiol.*13, (1986),175-190.
- [44] Deraissac ,H., Bewley J.D., & Black M., "Cellular events during germination and seedling growth". In: N.Y. Plenum Press. *Physiology of development and germination.* New York, USA, (1992)pp. 147-197
- [45] Belhassen, E., Dominique,T., Monneveux, P., "Adaptation génétique aux contraintes de la sécheresse". *Cahier Agriculture Vol 4,* (1995) 251-261
- [46] Gates, P., "La tolérance à la sécheresse, une réalité à valoriser". *Persp.Agric.* 198.(1995).62-67.
- [47] Badji ,J .,Feyen, S ., "Relation hydriques sol-plante-atmosphère". In bases physiologiques et agronomiques de la production végétale. *Agronomie Moderne.* (1994) 241-266
- [48] Gulias, J., Ceccarelli S., Grando,S., Hamblin,J., "Relationships between barley grain yield measured in low and high yielding environments". *Euphytica*, 64: (1992).49-58.
- [49] Turner, R., et Jones, M.F., " Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaine and other compatible solutes" .*Curr. Oppin. Plant Biol.* 5 (2000).250-257.
- [50] Monneveux ,M.,et Nemmar,J., . "Additive main effect and multiplicative interaction analysis of national turf grass performance trials". I. Interpretation of genotype x environments interaction. *Crop Sci.*, 42: (1986) 489-496.
- [51] Blum ,M.,et Ebercon ,V ., "Variability of chlorophyll content under fluctuating environment. " *Acta Fytotechnica & Zootechnica*, 4: (1986). 5-9.
- [52] Korichi, S., "Adaptation reaction of oat strains selected under stress and non stress environmental conditions". *Crop Sci.*, 4: (1990).55–58.
- [53] Ulrich,S., Garcia A., Rizzo,C.A., Uddin, SL., Bartos, D., Senadhira, TJ., "Sodium and potassium transport to the xylem are inherited independently in rice, and the mechanism of sodium: Potassium selectivity differs between rice and wheat". *Plant Cell Environ.*, 20(2002) 1167–1174

- [54] Abeles ,J.P., "Cold acclimation and freezing stress tolerance role of protein metabolism". *An. Rev. Plant Physiol.*, 41(2003) 187-223.
- [55] Garg,M.,Hernandez JA., A. Campillo, A. Jimenez, JJ. Alarcon, F. Sevilla.. "Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants". *New Phytol.*, 141(2002) 241-251.
- [56] Stewart, M., et Lee,S., "Molecular breeding for abiotic stress tolerance: drought perspective". *Proc Pak Acad Sci.*, 43(1974)189–210
- [57] Kauss, D.S., "Growth and sugar accumulation in durum wheat plants under water stress". *New Phytol.*, 132:(1977), 57-62.
- [58] Joyce,D., Bousquet, U., "Effect of far-red light on malate and potassium contents in cotton leaves. Relation to drought resistance". *Physiol.Plant*, 66, (1984)pp37-40
- [59]Paquin.,R., "Effet de l'humidité du sol sur la teneur de la proline libre et des sucres totaux de la luzerne endurcie au froid et à la sécheresse". *Can.J.Plant Scie.* 66, (1986). 95-101
- [60]Santoro ,M.,Duan D., Liu X., Khan X., & Gul B., "Effects of salt and water stress on the germination of *Chenopodium glaucum* L., seed". *Pak. J. Bot.* 36 (4)(1992) 793-800.
- [61] MC Michel ,J .P.,Jan K.P.,. "Inhibition of *Amaranthus caudatus* seed germination by polyethylene glycol-6000 and abscissa acid and its reversal by ethephon or 1aminocyclopropane-1-carboxylic acid". *Physiol.Plant.* 67 (4)(1977) 588-597.
- [62] Singh T.N., Struik, P.C., Aspinall,D., "Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley:a potential metabolic measure of drought resistance". *Nature*, 236: 188-190
- [63] Delauney ,A.J., Verma, D.P., "Prolin biosynrthesis and osmoregulation in plants". *Plant.J.* (1993),4,215-223
- [64] Oaks ,M.H.,May L.H., Milthrope F.L., " Drought resistance of corps plants". *Fields Corp. Abstr.* 15: (1970).171-179
- [65] Adams,P., Thomas ,J.C., Vermon,D.M., Bonhert,H.J.,Jensen,R.G., "distinct cellular and organismic response to salt stress". *plant cell physiol.*V33 n8 (1992). 1215-1223.
- [66] Stoop,J.M.H., Williamson,J.D., Pharr,D.M., "Mannitol metabolism in plant a method for coping with stress". *Trend Plant Scie.* 1 (5) (1996), 139-144
- [67] Stoop ,J.M.H.,Orcutt D. M. and Nilsen E. T., "Physiology of plants under stress. John Wiley and Sons, New York, (2000) 683 p.
- [68] Shen,B.,Jensen,R.G.,Bonhert,H.J., "Increased resistance to oxydative stress in transgenic plant by targeting mannitol biosynthesis to chloroplast". *Plant Physiol.* 113(1997),1177-1183.

- [69] Hanson ,H.M., “Variation in proteins synthesis in different regions of greening leaves of barley seedlings and effects of composed water stress”. J. Exp. Bot, 35: (1995)1450-1459
- [70] Hanson ,F., Amzallag, G.N., Lemer, H.R., Poljakoff-Mayber, A., “Induction of increased salt tolerance in Sorghum bicolor by NaCl treatment” .J: Exp. Bot. 41:(1985) 29-34
- [71]Robinson M.S.,Jones,D.,. Adams P., Thomas J.C., Vernon D.M, Bonhert H.J., Jensen R.G., “Distinct cellular and organismic responses to salt stress”. Plant. Cell. Phys.33: .(1986) 1215-1223
- [72] Rhodes ,J.,”Comparative physiology of salt and water stress plant. Cell and Environment”. 25: (1993). 239-250.
- [73] Xing et Rajashekar, Sharma, P.K., Hall, D.O. Interaction of salt stress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum. J. Plant Physiol. 138: (2001) 614-619.
- [74]Brouquisse Yeo, A.R., K.S. Lee, P. IZARD, P.J. Boursier and T.J. Flowers, “Short and Long Term Effects of Salinity on Leaf Growth in Rice (*Oryza sativa* L.”. J. Exp. Bot., 42: (1989). 881-889.
- [75] Kirsh,D., Sharma, N., Gupta, N.K..Gupta, S.Hasegawa, H ., “Effect of NaCl salinity on photosynthetic rate, transpiration rate, and oxidative stress tolerance in contrasting Wheat genotypes”, Photosynthetica, 43(2005) 609–613
- [76] Bauman, M. “Possibilities and limits of feed installation for pasture improvement in steppe regions of Western Morocco: preliminary results”. Awamia (Maroc); Revue Marocaine de la Recherche Agronomique. no 74,(1990) p. 84-104
- [77]Bensari,S. Beale C.V, Morison J.L, Long S.P, “Water use efficiency of C4 perennial grasses in a temperate climate”. Agriculture and forest Meteorology .96: (1990) 103-115
- [78] Fernandes, F.M., Arrabaça, M.C., Carvalho, L.M.M “Sucrose metabolism in *Lupinus albus* L. under salt stress”. *Biol. Plant.* 48(2), (2004) , 317-319
- [79] Mahajan, S., Tuteja, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch. Biochem. Biophys. 444: (2005) 139-158
- [80] Malcolm, C.V., Lindley, V.A., O’Leary, J.W., Runciman, H.V., Barrett-Lennard ,E.G. Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. Plant Soil 253, (2003), 171-185.
- [81] Rathinasabapathi, B.,“ Metabolic engineering for stress tolerance:Installing osmoprotectant synthesis pathways”. Ann. Bot. 86, (2000), 709-716
- [82] Flowers, T.J., Troke, P.F., et Yeo, A.R.,” The mechanisms of salt tolerance in halophytes”. Annu. Rev. Plant Physiol.28(1) (1977): 89–121.

- [83] Yamaguchi, T., et Blumwald, E. "Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities". *Trends Plant Sci.* 10(12) (2005): 615–620.
- [84] Glenn, E., Brown, J.J., et Blumwald, E. "Salt-tolerant mechanisms and crop potential of halophytes". *Crit. Rev. Plant Sci.* 18(2) : (1999). 227–255.
- [85] Apse, M.P., et Blumwald, E.. Na⁺ transport in plants. *FEBS Lett.* 581(12) : (2007). 2247–2254
- [86] Levigneron, A., Lopez, F., Vansuyt, G., « Les plantes face au stress salin ». *Cahiers Agricultures*, 4 : (1995) 263–273
- [87] Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P.A., Tester, M., Véry, A.A., Sentenac, H., et Casse, F. "Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance". *EMBO J.* 22(9) , (2003), 2004–2014.
- [88] Borsani, O., Valpuesta, V., et Botella, M.A. » Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach". *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 73(2) , (2003), 101–115
- [89] Ksouri, R., Megdiche, W., Koyro, H.-W., et Abdelly, C. "Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity". *Adv. Bot. Res.* 53 , (2010), 117–145.
- [90] Munns, R. "Comparative physiology of salt and water stress". *Plant Cell Environ.* 25(2) : (2002) 239–250.
- [91] Tester, M., et Davenport, R.J., "Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants". *ann. bot. (lond.)*, 91 (5) (2003) 503–527.
- [92] Blumwald, E., Grover, A., et Good, A.G., "Breeding for abiotic stress resistance: challenges and opportunities". 2004 « New directions for a diverse planet ». *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress*, 26 September– 1 October 2004, Brisbane, Australia.
- [93] Levigneron, A., Lopez, F., Vansuyt, G., Berthomieu, P., Fourcroy, P., Casse-delbart f. » Les plantes faces au stress salin ». *Cahiers Agri.* 4: (1995) 263-273.
- [94] Barkla, B.J., Zingarelli, L., Blumwald, E., et Smith, J.A.C. "Tonoplast Na⁺/H⁺ antiport activity and its energization by the vacuolar H⁺-ATPase in the halophytic plant *Mesembryanthemum crystallinum*." *Plant Physiol.* 109(2) :5 (2005) 549–556.
- [95] Blumwald, E., Aharon, G.S., et Apse, M.P. "Sodium transport in plant cells". *Biochim. Biophys. Acta*, 1465(1–2) : (2000). 140–151.
- [96] Bartels, D., et Sunkar, R., "Drought and salt tolerance in plants". *Crit. Rev. Plant Sci.* 24(1) : (2005). 23–58.

- [97] Amtmann, A., et Leigh, R., "Ion homeostasis. Abiotic stress adaptation in plants": Physiological, molecular and genomic foundation. Sous la direction de A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert et Govindjee. (2010) p. 245–262.
- [98] Shabala, S., et Cuin, T.A.. "Potassium transport and plant salt tolerance". *Physiol. Plant.*133(4) , (2008), 651–669.
- [99] Munns, R., Tester, M. "Mechanisms of salinity tolerance". *Annu. Rev. Plant Biol.* 59(1) : (2008) 651–681.
- [100] Sairam,R.K.,et Tyagi,A., "Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants". *Curr. Sci.*86 ;(2004)345-352
- [101]Maathuis, F.J.M., et Amtmann, A., "K⁺ nutrition and Na⁺ toxicity: the basis of cellular K⁺/Na⁺ ratios". *Ann. Bot. (Lond.)*, 84(2) : (1999) 123–133.
- [102] Yoshiba, Y., Nanjo, T., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., et Shinozaki, K., "Stress-responsive and developmental regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in *Arabidopsis thaliana*". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261 : (1999) 766–772.
- [103] Rhodes, D., Nadloska-Orczyk, A., et Rich, P.J., "Salinity, osmolytes and compatible solutes". Dans *Salinity: environment– plants–molecules*. Sous la direction de A. Lauchli et U. Luttge. Kluwer, Boston. (2002) p. 181–204.
- [104]Silva-Ortega, C.O., Ochoa-Alfaro, A.E., Reyes-Aguero, J.A.,Aguado-Santacruz, G.A., et Jimenez-Bremont, J.F., « Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear". *Plant Physiol. Biochem.*46(1) : (2007) 82–92.
- [105]Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D., et Somero, G.N. "Living with water stress: evolution of osmolyte systems".*Science*, 217(1982) : 1214–1222.
- [106] Silva-Ortega, C.O., Ochoa-Alfaro, A.E., Reyes-Aguero, J.A.,Aguado-Santacruz, G.A., et Jimenez-Bremont J.F." Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear". *Plant Physiol. Biochem.*46(1) , (2007), 82–92.
- [107]Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., et Verma, D.P.S. 2000." Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress". *Plant Physiol.*122(4) : 1129–1136.
- [108] Kocsy, G., Laurie, R., Szalai, G., Szilagyi, V., Simon-Sarkadi, L., Galiba, G., et De Ronde, J.A., "Genetic manipulation of proline levels affects antioxidants in soybean subjected to simultaneous drought and heat stresses." *Physiol. Plant.*124(2) : (2005) 227–235.
- [109] Ashraf, M., et Foolad, M.R. "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance". *Environ. Exp.Bot.*59(2) : (2007)206–216.
- [110] Majumder, A.L., Sengupta, S., et Goswami, L. "Osmolyte regulation in abiotic stress". Chap. 16. Dans *Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, molecular and*

genomic foundation. Sous la direction de A. Pareek, S.K. Sopory, H.J. Bohnert et Govindjee. (2010) 349–370.

[111] Sairam, R.K., et Tyagi, A. “Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants”. *Curr. Sci.* 86 : (2004) 407–421.

[112] Rathinasabapathi, B., “Metabolic engineering for stress tolerance”: Installing osmoprotectant synthesis pathways. *Ann. Bot. (Lond.)*, 86(4) : (2000) 709–716.

[113] Gorham, J. “Salt tolerance of plants”. *Sci. Prog.* 76 : (1992) 273–285

[114] Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi Shinozaki, K., et Shinozaki, K. “Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*”. *FEBS Lett.* 461(3) : (1999) 205–210.

[115] Halliwell, G., et Gutteridge, I.M., “Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress”. *New Phytologist*. 158: (2007) 455-463.

[116] Foyer, C.H., Noctor, G. “Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria”. *Physiol plant*, 119, (2003) 355-364.

[117] Rathinasabapathi, B., “Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways”. *Ann. Bot.* (2000) 86: 709-716.

[118] Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J. “Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress”. *Plant Cell Environ.* 21(1998): 535-553.

[119] Rejsiková, A., Patková, L., Eva Stodulková, E., Lipavská, H. “The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions”. *J. Plant Physiol.* 164: (2007) 174-184.

[120] Cordoba, A., Seffino, L.G., Moreno, H., Arias, C., Grunberg K., Zenoff, A., Taleisnik, E. “Characterization of the effect of high salinity on roots of *Chloris gayana* Kunth: carbohydrate and lipid accumulation and growth”. *Grass Forage Sci.* 56: (2001) 162-168.

[121] Fernandes, F.M., Arrabaça, M.C., Carvalho, L.M.M., “Sucrose metabolism in *Lupinus albus* L. under salt stress”. *Biol. Plant.* 48(2): (2004) 317-319.

[122] Mustard, J., Renault, S. “Effects of NaCl on water relations and cell wall elasticity and composition of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings”. *Physiol. Plant.* 121: (2004) 265-271

[123] Garcia, A.B., de Almeida, E.J., Iyer, S., Gerats, T., van Montagu, M., Caplan, A.B. “Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice”. *Plant Physiol.* 115: (1997) 159-169.

[124] Noiraud, N., Maurousset, L., Lemoine, R. “Transport of polyols in higher plants”. *Plant Physiol. Bioch.* 39: (2001) 71 7–728

- [125] Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7, 405-410.
- [126] Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 9, 490-498
- [127] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. "Free radical in biology and medicine". Oxford University Press, 4th revised Edition (2007)
- [128] Foyer, C.H., Noctor, G., "Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria". *Physiol Plant* 119. (2003): 355-364
- [129] Lawlor, D.W., "Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves stomata vs. metabolism and the role of ATP". *Ann Bot (Lond)*, 89 Spec No, (2002) 871-885.
- [130] Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., "Oxidative modifications to cellular components in plants". *Annu Rev Plant Biol*, 58, (2007) 459-481.
- [131] Miller, G., Mittler, R., "Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants". *Ann Bot (Lond)*, 98, (2006) 279-288.
- [132] Triantaphylides, C., Krischke, M., Hoeberichts, F.A., Ksas, B., Gresser, G., Havaux, M., Van Breusegem, F., Mueller, M.J., "Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants". *Plant Physiol*, 148, (2008) 960-968
- [133] Davies, M.J., « The oxidative environment and protein damage ». *Biochim Biophys Acta*, 1703, (2005) 93-109
- [134] Tarrago, L., « Les méthionines sulfoxyde réductases de type B plastidiales d'*Arabidopsis thaliana*: Mécanismes de régénération par les thiorédoxines, cibles potentielles et rôles physiologiques » Thèse de Doctorat de l'université d'Aix-Marseille. (2009), 242p
- [135] Brion, M., « Implication de CDSP32, une thioredoxine double module, dans la protection de l'appareil photosynthétique contre le stress oxydant ». Thèse de Doctorat de l'école Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier (2001), 177p
- [136] Moller, I.M., Jensen, P.E., Hansson, A., "Oxidative modifications to cellular components in plants". *Annu Rev Plant Biol*, 58, (2007) 459-481.
- [137] Kao, W.-Y., Forseth, I.N. "Responses of gas exchange and phototropic leaf orientation in soybean to soil water availability, leaf water potential, air temperature, et photosynthetic photon flux". *Environmental and Experimental Botany*, 32, (1992), 153-161
- [138] Triantaphylides, C., Havaux, M., "Singlet oxygen in plants production, detoxification and signaling". *Trends Plant Sci*, 14, (2009) , 219-228

- [139] Noctor, G., Foyer, C.H. "Ascorbate and glutathione Keeping Active Oxygen Under Control." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, (1998) 249-279.
- [140] Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dormann, P. "Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*". *Plant Cell*, 17, (2005) 3451-3469.
- [141] Ann Peer, M., Orcutt D. M. and Nilsen E. T., "Regulation of photosynthesis in interior spruce during water stress: changes in gas exchange and chlorophyll fluorescence". *Tree physiology*, 15: (2005), 229-253
- [142] Appel, N., Hirt, J.T., "Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions". *Plant Physiol.*, 141, (2004). 391-396.
- [143] Foyer, N., Gossett, D.R., Banks, S.W., Millhollon, E.P. and Lucas, M.C. "Antioxidant response to NaCl in a control and an NaCl tolerant cell line grown in the presence of paraquat, butathione sulfoximine, and exogenous glutathione". *Plant Physiol.*, 112, (1994), 803-809.
- [144] Johanson, J., Madhava, R. K.V. and Sresty, T.V.S., "Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses". *Plant Sci.*, 157, (1995), 113-128.
- [145] Diez, N., Raziuddin, M.L., Farhatullah, J., Hassan, G C.H., "Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control". *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 49: (2002), 249-279.
- [146] Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*. 4, (2004), 1581-1590.
- [147] Morales-Ruiz S., Ahmed, E., Nawata, M., Hosokawa, Y., Domae, T., Sakuratani, "Alterations in Photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging", *Plant Sci.* 163 (2002) 117-123.
- [148] Berlett et Stadman, 1997. Stadman, E.R., Moskovitz, J., Berlett, B.S., and Levine, R.L. Cyclic oxidation and reduction of protein methionine residues is an important antioxidant mechanism. *Mol. Cell Biochem.* 234-235, (2002), 3-9.
- [149] Friguet, B. « Le vieillissement moléculaire et cellulaire et ses futurs enjeux. L'actualité chimique », 269-270, (2003) 103-107
- [150] Stadman, E.R., Levine, R.L., "Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins". *Amino Acids*, 25, (2003) 207-218.
- [151] Biteau, B., Labarre, J., Toledano, M.B., "ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin". *Nature*, 425, (2003), 980-984.

- [152] Ejiri; Teare I.D. & Kanemasu E.T., "Stomatal diffusion resistance and potentially as affected by preconditioning water stress in the field". *Agronomie Journal* . 68 : (1979) 707-708 p
- [153] Grimaud ,K., Maiorino, M., Gregolin, C., et Ursini, F., « Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase ». *Methods Enzymol*, 186, (2001). 448-57.
- [154] Brot,P.S., Weissbach,M., "Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress". *Plant cell and environment*. 21: (2000) 535 - 553 p
- [155] Laurent, T.C., Moore, E.C., Reichard, P., "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli B*". *J Biol Chem*, 239, (1964) 3436-3444.
- [156] Katti ,M ., Thakur, P.S. & Rai, V.K., "Effect of water stress on protein content in two maize cultivars differing in drought resistance". *Biologia Plant (Praha)*.24 , (1990) 96 -100
- [157] Holmgren, A., "Thioredoxin structure and mechanism : conformational changes on oxidation of the active site sulfhydryls to a disulphide". *Structure* 3, (1995) 239-243
- [158] Laurent TC, Moore EC, Reichard P., "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *E. coli B*". *J. Biol. Chem.* 239, (1964) 3436-3444.
- [159] Schürmann,S., Jacquot,M., Siddique, M.R.B., Hamid, A., Islam, M.S.," Drought stress effects on water relation of wheat". *Bot. Bull. Acad. sin.* 41: 35-39, 2000.
- [160] Gelhaye, S., Munns, R.," Comparative physiology of salt and water stress". *Plant Cell Environ* 25,(2005),239–50.
- [161] Spector, A., Yan, G-Z, Huang, R-R, McDermott, MJ, Gascoyne PRC, Pigiet V "The effect of H₂O₂ upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells". *J. Biol. Chem.* 263, (1988) 4984-4990.
- [162] Chae, H.Z., Chung, S.J., Rhee, S.G., "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast". *J. Biol. Chem.* 269, (1994) 27670-27678.
- [163] Brot ,S., Kirkham M.B., Smith E.L., Danasobhon C. & Draket, T.I." Resistance to water loss of winter wheat flag leaves". *Cer. Res. Commun.* 8: (1981),393 p.
- [164] Rouhier, N., Unno, H., Bandyopadhyay, S., Masip, L., Kim, S.K., Hirasawa, M., Gualberto, J.M., Lattard, V., Kusunoki, M., Knaff, D.B., Georgiou, G., Hase, T., Johnson, M.K., Jacquot, J.P. "Functional, structural, and spectroscopic characterization of a glutathione-ligated [2Fe-2S] cluster in poplar glutaredoxin C1". *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, (2007), 7379-7384.
- [165] Vieira Dos Santos ,C., Rey P. "Plant thioredoxins are key actors in oxidative stress response". *Trends Plant Sci* 11: (2006) 329–334

- [166] Selles, B., « Les glutathions peroxydases et protéine disulfure isomérases de peuplier : potentialités du repliement thiorédoxine pour la catalyse des réactions rédox ». Thèse de Doctorat de l'Université henri poincare Nancy I. (2011). 301p
- [167] Meyer, Y., Verdoucq, L., Vignols, F., "Plant thioredoxins and glutaredoxins : identity and putative roles". Trends Plant Sci. 4(10), (1999), 388-394.
- [168] Ruelland, E., Miginiac-Maslow, M., "Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins : activation or relief from inhibition". Trends Plant Sci. 4, (1999) 136-141
- [169] Samaras, Y., Bresson, R.A., Csonka, L.N., Garcia-Rios, M.G., Paino D'Urzo, M. & Rhodes, D. , "Proline accumulation during drought and salinity. In : Sminoff N. Environment and plant metabolism, flexibility and acclimation". Oxford BIOS. 161:(1995) 79- 88 p
- [170] Meyer, D., Schulze E-D. Beck E. & Müller-Hohenstein K." Plant ecology". Springer. Berlin: (2005), 117-143p.
- [171] Miginiac-Maslow, M., Issakidis, E., Lemaire, M., Ruelland, E, Jacquot, J.P., Decottignies, P., "Light-dependent activation of NADP-malate dehydrogenase : a complex process". Aust. J. Plant Physiol. 24, (1997) 529-542
- [172] Balmer ,G., Lin, C. Weng, H. Lo, J. Chen, M., "Study of the root antioxidative system of tomato and eggplants under waterlogged conditions". Plant Sci. 167(2003) 355–365.
- [173] Yano Sairam, R.K., Veerabhadra, R., Srivastava, G.C.," Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration." Plant Sci. 163: (2001) 1037-1046.
- [174] Marchand, S., Ortiz-Dorda, J., Martinez-Mora, C., Correal, E., Simon, B., Cenis, J.L.," Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the mediterranean basin". Ann. Bot. 95: 827-834.
- [175] Rey, P., Pruvot, G., Becuwe, N., Eymery, F., Rumeau, D., Peltier, G." A novel thioredoxin- like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L plants". Plant J, 13, (1998) 97-107.
- [176] Broin, M., Cuiné, S., Peltier, G., Rey, P.," Involvement of CDSP32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants". FEBS Lett. 467, (2000), 245-248
- [177] Broin, M., Cuiné, S., Eymery, F., Rey, P. "The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage". Plant Cell, 14, (2002) 1417-1432.
- [178] Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis Bourguet, E., Rouhier, N., and Rey, P. "Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of *Arabidopsis* plastidial methionine sulfoxide reductases B". FEBS Lett. 581, (2007), 4371–4376.

[179] Pruvot,G.,Cuiné,S., Pelyier,G., Rey,P., « Characterization of a novel drought-induced 34KDa protein located in thylakoids of *solanum tuberosum* L plants".Planta 198, (1996),471-476.

[180] Eymery,F., Rey P., "Immunocytolocalization of two chloroplastic drought-induced stress proteins in well-watered or wilted *solanum tuberosum* L plants". Plant Physiology and Biochemistry 37, 305-312.

[181] Black ,M., "The effect of internal water status on plant growth development and yield In: plant responses to climatic factors" .Proc.of upsal symposium, Unesco.(1960), 430p

[182] Motohashi, K., Hisabori, T. (2006) HCF164 receives reducing equivalents from stromal thioredoxin across the thylakoid membrane and mediates reduction of target proteins in the thylakoid lumen. J Biol Chem, 281, 35039-35047.

[183]Tete-Favier, F, Cobessi D, Boschi-Muller S, Azza S, Branlant G, Aubry A. "Crystal structure of the Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase at 1.9 Å resolution". Structure Fold Des. 8: (2000)1167-1178.

[184] Lowther, WT., Brot, N., Weissbach H, "Matthews BW. Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme". Biochemistry 39: (2000) 13307-13312.

[185] Boschi-Muller S, Azza S, Branlant G. "E. coli methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide". Protein Sci. 10: (2001) 2272-2279.

[186]Tarrago, L., Laugier, E., Zaffagnini, M., Marchand, C., Le Maréchal, P.,Rouhier, N., Lemaire, S.D., & Rey, P. "Regeneration mechanisms of Arabidopsis thaliana methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins". J. Biol. Chem., 284, (2009).18963-18971

[187]Lowther, WT, Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., Matthews, BW., "The mirrored methionine sulfoxide reductases of Neisseria gonorrhoeae pilB". Nat. Struct. Biol. 9: (2002) 348-352.

[188] Olry, A., Boschi-Muller S., Marraud M., Sanglier-Cianferani S., Van Dorsselaar A., Branlant G. "Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from Neisseria meningitides". J. Biol. Chem.277: (2002) 12016-12022.

[189] Gabbita, SP., Aksenov, MY., Lovell, MA., Markesbery, WR., "Decrease in peptide methionine sulfoxide reductase in Alzheimer's disease brain". J. Neurochem. 73,(1999), 1660-1666

[190] Hassouni ME, Chambost JP, Expert D, Van Gijsegem F, Barras F. The minimal gene set member msrA, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen Erwinia chrysanthemi. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 ,(1999) ,887-892.

[191] Ruan, H., Tang, X.D., Chen, M.L., Joiner, M.L., Sun, G., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S.H., Iverson, L., Wu, C.F., Hoshi, T., Chen, M.L., Joiner, M.A., Heinemann, S.H., "High quality life extension by the enzyme peptide methionine sulfoxide reductase". *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 99, (2002), 2748-2753

[192] Sanchez, J., Nikolau, B.J., and Stumpf, P.K. Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide in plants. *Plant Physiol.* 73, (1983), 619–623.

[193] Sadanandom, A., Piffanelli, P., Knott, T., Robinson, C., Sharpe, A., Lydiate, D., Murphy, D., Fairbairn, D.J., "Identification of a peptide methionine sulphoxide reductase gene in an oleosin promoter from *Brassica napus*". *Plant J.* 10, (1996), 235-242.

[194] Vieira Dos Santos, C., Cui n , S., Rouhier, N., Rey, P., "The Arabidopsis plastidic methionine sulfoxide reductase B proteins. Sequence and activity characteristics, comparison of the expression with plastidic methionine sulfoxide reductase A, and induction by photooxidative stress. *Plant Physiol*, 138, (2005) 909-922

[194] Rey, P., Cuine, S., Eymery, F., Garin, J., Court, M., Jacquot, J.P., Rouhier, N., and Broin, M. Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *Plant J.* 41, (2005), 31–42.

[196] Diez, S.Z., Sairam, R.K., Veerabhadra, R., Srivastava, G.C.: "Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration". *Plant Sci.* 163: (2011) 1037-1046

[197] Diez, S.Z., Siddique, M.R.B., Hamid, A., Islam, M.S." Drought stress effects on water relation of wheat". *Bot. Bull. Acad. Sin.* 41: ,(2003). 35-39.

[198] Rouhier, N., and Jacquot, J.P. The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic Biol Med*, 38(11), (2005) 1413-1421.

[199] Pedrajas, D., Pérez-Alfocea F., Estando MT., Caro M. Guerrier G. ; "Osmotic adjustment in *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii* under NaCl and polyethylene glycol 6000 iso-osmotic stresses " *Physiol. Plant.*, 87, (1999), 493-498

[200] Lim, J.C., Choi, H.I., Park, Y.S., Nam, H.W., Woo, H.A., Kwon, K.S., Kim, Y.S., Rhee, S.G., Kim, K., Chae, H.Z." Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity". *J Biol Chem*, 283, (2008), 28873-28880.

[201] Rey, P., Becuwe, N., Barrault, M.B., Rumeau, D., Havaux, M., Biteau, B., Toledano, M.B. "The Arabidopsis thaliana sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfonic acid reductase involved in the photooxidative stress response". *Plant J*, 49, (2007) , 505-514

[202] Iglesia-Baena, I., Barrenco-Medina, S., Sevilla, F., Lazzaro, J.J., "Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves". *Physiol. Plant.* 59: (2011) 189-195.

- [203] Boileau,C.,Eme,L.,Brochier-amanet ,C., Protein-repairing methionine sulfoxide reductases in photosynthetic organisms gene organization, reduction mechanisms and physiological roles New Phytol,191,2011, 1108-1118
- [204] Bair,M., diez,K.J., “Protective function of chloroplast 2cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic Arabidopsis”. Plant physiology 119, (1999) 140714.
- [205] stenbeak,G.,Seo, J. H., Lim, J.C., Lee, D. Y., Kim, K. S., Piszczek, G., Nam, H. W., Kim, Y. S., Ahn, T., Yun, C. H., Kim, K., Chock, P. B., et Chae, H. Z.” Novel protective mechanism against irreversible hyperoxidation of Peroxiredoxin: N{alpha}-terminal acylation of human peroxiredoxin II”. J Biol Chem, 284, (2009) 13455-65.
- [206] Selles , B., “Les glutathion peroxydase et protéines disulfures isomérasés de peuplier : potentialité du repliement thiorédoxine par la catalyse des réactions redox. Thèse de Doctorat. Université poincare Nancy I (2011). 294p
- [207] Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J., et P. oole, L. B. “Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins”. Trends Biochem. Sci., 28, (2003) , 32-40.
- [208] Turner N., Wall A.M., Ripley R. & Gale M.D. “The position of a locus on chromosome 5B of *Triticum aestivum* affecting homoeologous meiotic pairing”. Genet Res. 18: (1981) 329 - 339 p
- [209] Kaira ,Y.P and Maynard, D.G.”Method manual for analysis forest soils and plants analysis”.Inf.Rep.NOR-X-319.Forestry.Canada.Edmonton AB-Canada. 1991
- [210]. Lichtenthaler, H.K., : “Chlorophylls and carotenoids : Pigments of photosynthetic biomembranes.” Methods in Enzymology 148 , (1987) 351-382.
- [211] Ames, B.N., Shigensaga T.M. & Hagen T.M., “Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, (1993),7915-7922.
- [212] Minotti, G., et Aust, S.D., “The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide”. J. Biol. Chem. 262 ,(1987) ,1098-1104.
- [213] Iturbe-Ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C., et Becana ,M., “Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat”. Plant Physiol.(116,(1998)173-181.
- [215] Cerning-Beroard, J., “A note on sugar determination by anthrone method.” Cereal Chem.52 ,(1975) , 857-860.
- [214] Sergeiv, I., Alexieva, V., Karanov, E., “Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants”. Compt. Rend. Acad Bulg Sci, 51. (1997)
- [216] Dubois,M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith. F., “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”. Analytical chemistry, volume 28, (1956). N°3.430-439.

[217] Troll, W., et Lindsey, G. ; A photometric method for the determination of proline ; J. Biol. Biochem. 215, (1955) 655-660 .

[218] Yemm, E.W., et Cooking, E.C., "The determination of amino acids with ninhydrin". Analyst 80 , (1955), 209-213.

[219] Grieve, CM., Grattan, SR., "Rapid assay for determination of water soluble quaternary amino compounds". Plant and Soil 1983;70:303-7.

[220] Laemmli, UK., "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature, 227: (1970). 680-685.

[221] Laugier, E., Tarrago, L, Vieira Dos Santos, C., Eymery, F., Havaux, M., Rey, P. "Arabidopsis thaliana plastidial methionine sulfoxide reductases B, MSRBs, account for most leaf peptide MSR activity and are essential for growth under environmental constraints through a role in the preservation of photosystem antennae". Plant J (2010);61:271–82.

[222] Vieira Dos Santos, C., Laugier, E., Tarrago, L., Massot, V., Issakidis Bourguet, E., Rouhier, N., & Rey, P. "Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases B". FEBS Lett 581, (2007).4371-4376

[223] Aebi H., "Catalase in vitro". Methods Enzymol .105: (1984)121–126.

[224] MacAdam J.W., Nelson C.J. et Sharpe R.E., "Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue". Plant Physiol. 99 ,(1992), 872-878.

[225] Singleton, V. L., Rossi, J. R. (1965). "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic –phosphothungstic acid". Am. J. Enol. Vitic, 16 : 144–158.

[226] Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". Food Chem, 64 (4) ,(1999), 555–559.

[227] Smirnoff ,G., "The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation". New phytol 125, (1999),. 27- 58.

[228] Allen, C.F., Good, P., Davis, H.F., Fowler, S.D. (1964) Plant and chloroplast lipids. I. Separation and composition of major spinach lipids. Biochem Biophys Res Commun, 15, 424-430.

[229] Wilson , J.P., Lee good RC, Lea PJ, Adcock MD, Hausler RE. "The regulation and control of photorespiration". J Exp Bot (2000), 46:1397-414.

[230] Qiu ,J .,Lu, A., Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review". Ann Bot (2003);91:179–94.

[231] Ramos, J., Sumithra K, Jutur PP, Carmel BD, Reddy AR. "Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism". *Plant Growth Regul*; 50,(2004),11-22.

[232] Ben Amor M., Munns R, Husain S, Rivelli AR, James RA, Condon AG, Lindsay MP, "increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits". *Plant Soil* (2005);247:93–105.

[233] Ksouri R, Megdiche W, Debez A, Falleh H, Grignon C, Abdelly C." Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*". *Plant Physiol Biochem* (2007);45:244-9.

[234] Tester M., Davenport R. (2003) Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91: 503–527.

[235] Jin Z.M., Wang C.H., Liu Z.P., Gong W.J. (2007) Physiological and ecological characters studies on *Aloe vera* under soil salinity and seawater irrigation. *Process Bioch.* 42: 710-714.

[236] Patel M., Schroder, E., Robin Harris, J., and Poole, L. B. "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins". *Trends Biochem. Sci.*, 28, (2009) , 32-40.

[237] Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A. D, Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E. M., Luque, T. et Figueroa, M. E. "Growth and Photosynthetic Responses to Salinity of the Salt-marsh Shrub *Atriplex portulacoides*". Université de Sevilla, Espagne. *Annals of botany*, (2007) pp. 12-15.

[238] Munns, R., Richard, A.J. et Lauchli, A. "Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, n°5, (2006), 1025-1043.

[239] Winicov I. (1998) New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants. *Ann. Bot.* 82 :703-710.

[240] Wang Z.Q., Yuan Y.Z., Ou J.Q., Lin Q.H., Zhang C.F. (2007) Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* 164: 695-701.

[241] Hassani, A., Dellal, A., Belkhdja, M. et Kaid- Harche, M., « Effet de la Salinite sur L'eau et Certains Osmolytes Chez L'orge (*Hordeum Vulgare L*) ». *European Journal of Scientific Research*. Vol.23, n°1, (2008),61-69

[242] Kamari, S., El Hafid, L., Haloui, B., « Effet des stress hydrique et salin sur la germination des graines d'*Atriplex halimus* et d'*Atriplex nummularia* ». Laboratoire d'Ecologie Végétale, Faculté des Sciences, Université Mohamed 1er.Oujda, Maroc. *Compte rendu du Congrès International de Biochimie*, Agadir, Maroc. (2006) 5 p.

[243] Heidari-Sharifabad, H., Mirzaie-Nodoushan, H., "Salinity-induced growth and some metabolic changes in three *Salsola* species". *J. Arid Environ.* 67, (2006), 715-720.

[244] Song J., Feng G., Tian C., Zhang F. "Osmotic adjustment traits of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* in field or controlled conditions". *Plant Sci.* 170,(2006), 113-119.

[245] Rontein, D., Basset, G., Hanson, A.D., "Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants". *Metab. Engin.* 4: (2002) 49-56.

[246] Rathinasabapathi B., "Metabolic engineering for stress tolerance: Installing osmoprotectant synthesis pathways". *Ann. Bot.* 86: (2000) 709-716.

[247] Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J., Bressan R.A. "Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction." *Plant J.* 31: (2002) 699-712.

[248] Yoshida K. (2002) Plant biotechnology - genetic engineering to enhance plant salt tolerance. *J. Biosci. Bioeng.* 94(6): 585-590.

[249] Hanson, M.S., "Classification of diverse bread wheat-growing environments based on differential yield responses". *Crop Sci.*, 31: (1985); 571-576.

[250] Maggio A., Miyazaki S., Veronese P., Fujita T., Ibeas J.I., Damsz B., Narasimhan M.L., Hasegawa P.M., Joly R.J., Bressan R.A. (2002). Does proline accumulation play an active role in stress induced growth reduction? *Plant J.* 31: 699-712.

[251] Naidoo, G., Kift, J., "Responses of the saltmarsh rush *Juncus kraussii* to salinity and water logging. *Aquatic Bot.* 84, (2006) , 217-225

[252] Song, J., Feng G., Tian, C., Zhang, F., "Osmotic adjustment traits of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* in field or controlled conditions". *Plant Sci.* 170:(2006) , 113-119.

[253] Ashraf, M., Harris, P.J.C., "Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants". *Plant Sci.* 166,(2004), 3-16

[254] Wang, Z.Q., Yuan, Y.Z., Ou, J.Q., Lin, Q.H., Zhang, C.F." Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity" *J. Plant Physiol.* 164, (2007), 695-701

[255] Jiménez-Bremont, J.F., Becerra-Flora, A., Hernández-Lucero, E., Rodríguez-Kessler, M., Acosta-Gallegos, J.A, Ramírez-Pimentel, J.G. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biol. Plant.* 50 (4), (2006), 763-766.

[256] Hien D.T., Jacobs M., Angenon G., Hermans C., Thu T.T., Son L.V., Roosens N.H. (2003) Proline accumulation and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Sci.* 165: 1059-1068.

- [257] Veeranagamallaiah, G., Chandraobulreddy, P., Jyothsnakumari, G., Sudhakar, C. Glutamine synthetase expression and pyrroline-5-carboxylate reductase activity influence proline accumulation in two cultivars of foxtail millet (*Setaria italica* L.) with differential salt sensitivity. *Environ. Exp. Bot.* 60, (2007), 239-244.
- [258] Claussen, W., "Proline as a measure of stress in tomato plants". *Plant Sci.* 168: (2005) 241-248.
- [259] Parida, A.K., Das, A.B., Sanada, Y., Mohanty, P." Effects of salinity on biochemical components of the mangrove, *Aegiceras corniculatum*". *Aquatic Bot.* 80: (2004) 77-87.
- [260] Niknam V., Bagherzadeh M., Ebrahimzadeh H., Sokhansanj A." Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown *in vitro*". *Biol. Plant.* 48(4): (2004) 613-615.
- [261] Koyro H.W. (2006) Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.) *Environ. Exp. Bot.* 56: 136-146.
- [262] Arbona V., Marco A.J., Iglesias D.J., Lopez-Climent M.F., Talon M., Gomez-Cadenas A. Carbohydrate depletion in roots and leaves of salt-stressed potted *Citrus clementina* L. *Plant Growth Regul.* 46: (2005) 153-160.
- [263] Hare P.D., Cress W.A., Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21: (1998) 535-553.
- [264] Dubey R.S., Singh A.K. "Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants". *Biol. Plant.* 42(2): (1999) 233-239.
- [265] Serraj R., Sinclair T.R., "Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?" *Plant Cell Environ.* 25: (2002) 333-341.
- [266] McCue, S., et Hanson, M., "Water transport in the midrib tissue of maize leaves :direct measurement of the propagation of changes in cell turgor across a plant tissue". *Plant Physiol* 78: (1990)183-191
- [267] McCue, S., et Hanson, M., "Water transport in the midrib tissue of maize leaves :direct measurement of the propagation of changes in cell turgor across a plant tissue". *Plant Physiol* 78: (1990)183-191
- [268] Nerd, J., Pasternak Very, A.A., Robinson, M.F., Mansfield, T.A., Sanders, D. ,Guard cell cation channels are involved in Na-induced stomatal closure in a halophyte. *Plant J*,(1992);14:509-21.
- [269] Koheil, M., Volkmar K.M., Hu Y., Steppuhn H. (1998) Physiological responses of plants to salinity: A review. *Can. J. Plant Sci.* 78: 19-27.

- [270] Makela, J., Hasegawa ,PM., Bressan, RA., Zhu, JK., Bohnert, HJ., "Plant cellular and molecular responses to high salinity" .Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol (1996), 51:463–99.
- [271] TardieuS., Yamaguchi T., Blumwald E. ,"Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities". Trends Plant Sci. 10(12): 2006 615-620.
- [272] Kaminska-Rozek, E., Pukacki PM Effect of water deficit on oxidative stress and degradation of cell membranes in needles of Norway spruce (*Picea abies*). Acta Physiologia Plantarum 26: (2004) 431-442
- [273] Sgherri,CB.,Sevanovic,F., Navarri-Izzo., Role of phenolic in th antioxidative status Of the resurrection plant *Ramonda serbica* during dehydration and rehydration.Physiol Plant,122 ,(2004),478-485.
- [274] Rao,G. G., and Rao,G. R., "Figemt composition and chlorophyllase activity in pigeon pea (*cajamas indicus spreng*) and yingelly (*sesamum indicum L.*) under NaCl salinity". J.Exp.biol. 19, (1981), 768-770.
- [275] Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Davy, A. D, Fernández-Muñoz, F., Castellanos, E. M., Luque, T. et Figueroa, M. E. Growth and Photosynthetic Responses to Salinity of the Salt-marsh Shrub *Atriplex portulacoides*. Université de Sevilla, Espagne. (2007)
- [276] Mustard J., Renault S. (2004) Effects of NaCl on water relations and cell wall elasticity and composition of red-osier dogwood (*Cornus stolonifera*) seedlings. *Physiol. Plant.* 121: 265-271
- [277] Ashraf, M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. Critical Reviews in Plant Sciences 13 (1): 17-42
- [278]Misra N., Dwivedi U.N. (2004) Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Sci.* 166: 1135–1142.
- [279]Mattia C., Bischetti G.B., Gentile F. (2005) Biotechnical characteristics of root systems of typical Mediterranean species. *Plant Soil* 278: 23-32
- [280] Ashraf M., Harris P.J.C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166: 3-16
- [281] Khayyat, M., Rajaei, S., Sajjadinia, A., Eshghi, S. et Tafazoli, E. Calcium effects on changes in chlorophyll contents, dry weight and micronutrients of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) plants under salt-stress conditions. *Birjand Univ., Birjand, Iran. Fruits.* Vol. 64, (2007) ,53-59.
- [282] Majumdar ,B.,Downton, W. J. S. and Millhouse, J.(1991). Chlorophyll fluorescence and water relations ofsult stressed plant. *Plant scie.lett* 37: 205-210

- [283] Lu, C., G., Juin, B., and Kuang, T., Photosystem II phytochemistry and photosynthetic pigment composition in salt-adapt halophyte *Artemisia amethifolia* grown under outdoor conditions. *J. Plant Physiol.* 160, (2003), 403-408
- [284] Khan M.A., Zaheer M., Hameed A.A. "Effect of sea salt and L-ascorbic acid on the seed germination of halophytes." *J. Arid Environ.* 67: (2006) ,535-540
- [285] Maricle B.R., Cobos D.R., Campbell C.S. Biophysical and morphological leaf adaptations to drought and salinity in salt marsh grasses. *Environ. Exp. Bot.* 60: (2007) 458-467
- [286] Sancho, S., Radic S., Radic-Stojkovic M., Pevalek-Kozlina B. Influence of NaCl and mannitol on peroxidase activity and lipid peroxidation in *Centaurea ragusina* L. roots and shoots. *J. Plant Physiol.* 163: (2006), 1284-1292
- [287] Harinasut, P., Poonsopa, D., Roengmongkol, K. And charoensata porn, R. (2003). Salinity effects on antioxidant enzymes in mulberry cultivar. *Scienceasia.* 29: 109-113.
- [288] Koca H., Bor M., Özdemir F., Türkan I. (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environ. Exp. Bot.* 60: 344-351
- [289] Asada, K., "The Water-Water Cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, (1999), 601-639.
- [290] Smirnoff, N., "The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation". *New Phytologist* 125, (1993), 27-58.
- [291] Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savouré, A., Verbuggen, N., Montagu, M.V., Inzé, D., "Expression of antioxidant enzymes in responses to Abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures". *Plant Science* 138, (1998) , 27- 34.
- [292] Luna, C.M., Pastori, G.M., Driscoll, S., Groten, K., Bernard, S., Foyer, C.H., "Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat". *Journal of Experimental Botany* 56, (2004), 417-423.
- [293] Quartacci, M.F., Navari-Izzo, F., "Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedlings". *Journal of Plant Physiology* 139, (1992), 621-625.
- [294] Zhang, J., Kirkham, M.B., "Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species". *Plant and Cell Physiology* 35, (1994) , 785-791
- [295] Jiang, Y., Huang, B., "Effects of calcium on antioxidant activities and water relations associated with heat tolerance in two cool-season grasses". *Journal of Experimental Botany* 355, (2001), 341-349.

- [296] Feierabend, J., Engel, S., "Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251,(1986), 567-576.
- [297] Polle, A., "Defense against photooxidative damage in plants. In: Scandalios J, editor. *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses.*" Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press,(1997), 785-813.
- [298] Badiani ,M., De Biasi ,MG., Colognola,M., Artemi ,F., "Catalase, peroxidase and superoxide dismutase activities in seedlings submitted to increasing water deficit". *Agrochimica* 30, (1990), 90-102.
- [299] Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444: 139-158
- [300] Asada, K., "Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants". *Physiologia Plantarum* 85, (1992), 235-241.
- [301] Nakano, Y., Asada, K., "Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination". *Plant and Cell Physiology* 21, (1980), 1295-1307.
- [302] Anderson, WJ., Foyer, CH., walker, DA., "Light-dependant reduction of dehydro-ascorbate and uptake of exogenous ascorbate by spinach chloroplasts". *Planta* 158,(1983) , 442-450.
- [303] Pujari DS, Chanda SV Effect of salinity stress on growth, peroxidase and IAA oxidase activities in vigna seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 24(4) (2002).: 435-439.
- [304] Dechassa D, Khairy S, Ernst C,. Protein and polyphenol profile changes in soybean roots under aluminum stress. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* 3: (2010)38-45.
- [305] Kidd PS, Llugan M, Poschhenrieder C, Gunse B. and Barceló J, 2001. The role of root exudates in aluminum resistance and silicon induced amelioration of aluminum toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 52:1339-1352.
- [306] Takahama U, Oniki T, 2000. Flavonoid and some other phenolics as substrates of peroxidase: physiological significance of the redox reactions. *J. Plant Res.* 113:301-309
- [307] Ben Hassine, A., Ghanem, MH., Bouzid, S., Lutts, S.," An inland and a coastal population of theMediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycine betaine in response to salinity and water stress". *J Exp Bot.*59, (2008),1315- 1320
- [307] Ait Said, S.. *Ecophysiologie de Pistacia lentiscus* L. en milieux aride et salin. Thèse de doctorat. Ecole doctorale : Sciences de l'Environnement. Université de Provence. France. (2008),190 p.

- [309]** Dubois, J. (1991) Les chocs thermiques et leurs applications. L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris, France, pp.159-463.
- [310]** Lamaze, T., Tousch, D., Sarda, X., Grignon, C., Depigny-This, D., Monneveux, P. et Belhassen, E. (1994) Résistance des plantes à la sécheresse : mécanismes physiologiques. Le sélectionneur Français. Vol. 45, pp. 75-85.
- [311]** Lamkemeyer, P., Laxa, M., Collin, V., Li, W., Finkemeier, I., Schöttler, M.A., "Peroxisome protein Q of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis". *Plant J*, (2006), 45:968-81
- [312]** Navrot, N., Collin, V., Gualberto, J., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Rey, P., Knaff, D.B., Issakidis, E., Jacquot, J.P. et Rouhier, N. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments et regulated during biotic et abiotic stresses. *Plant Physiol*, 142, (2006) ,1364-1379
- [313]** Rouhier N, Gelhaye E, Gualberto JM, Jordy MN, de Fay E, Hirasawa M et al. Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Physiol* 2004;134:1027-38
- [314]** Broin M, Cuié S, Eymery F, Rey P. The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* 2002;14:1417-32.
- [315]** Rey P, Cuié S, Eymery F, Garin J, Court M, Jacquot JP. "Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses". *Plant J* ,(2005);41:31-42
- [316]** Vieira Dos Santos C, Laugier E, Tarrago L, Massot V, Issakidis-Bourguet E, Rouhier N .,"Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of *Arabidopsis* plastidial methionine sulfoxide reductases B". *FEBS Lett* 2007;581:4371-76.
- [317]** Gama, F., Bréhelin C, Gelhaye E, Meyer, Y., Jacquot, JP., Rey P .,"Functional analysis and expression characteristics of chloroplastic Prx IIE". *Physiol Plant* 2008;133:599-610.
- [318]** Rey, P., Becuwe, N., Barrault, M.B., Rumeau, D., Havaux, M., Biteau, B., Toledano, M.B. (2007) The *Arabidopsis thaliana* sulfiredoxin is a plastidic cysteine-sulfenic acid reductase involved in the photooxidative stress response. *Plant J*, 49, 505-514.
- [319]** Vieira Dos Santos, C., Rey P, Cuié S, Eymery, F, Garin, J., Court, M., Jacquot ,JP., « Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses". *Plant J* 2005;41:31-42

APPENDICE

APPENDICE A

LISTES DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

SOD	superoxyde dismutase
CAT	catalase
APX	Ascorbate peroxydase
ROS	Espèces réactives d'oxygènes
NADPH/NADPH (NTR)/Trx	thiorédoxine réductase
MDAR	monodéhydroascorbate réductase
DHAR	déhydroascorbate réductase
(GR).	glutathion réductase
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
CDSP32	Chloroplastic Drought-induced Stress Protein of 32 KDa
CDSP34	Chloroplastic Drought-induced Stress Protein of 34 KDa
MDAR	monodéhydroascorbate réductase
DHAR	déhydroascorbate réductase
GR	glutathion réductase
ASH	acide ascorbique
GSH	glutathione
Trx	thiorédoxine,
Grx	glutarédoxine,
Gpx	glutathion peroxydase
Msr	méthionine sulfoxyde réductase,
Srx	sulfirédoxine
Cys	cystéine
Met	méthionine
PEG	polyéthylène glycol
DHA / MDHA	Déhydroascorbate / Monodéhydroascorbate
DHR	Glutathion-dépendante déhydroascorbate réductase
dNTP	Désoxyribonucléotide triphosphate
DTT	Dithiothréitol
EAO	Espèces activées de l'oxygène
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
Fd	Ferrédoxine
FNR	Ferrédoxine-NADP ⁺ oxydoréductase
GADPH	Glycéraldéhyde-3-phosphate
déshydrogénase GR	NADPH-dépendante glutathion réductase
Grx	Glutarédoxine
GSH / GSSG	Glutathion réduit et oxydé
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MSR	Méthionine Sulfoxyde Réductase
NADP(H)	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (réduite)
NTR	NADPH-dépendante Thiorédoxine Réductase

SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	Plastocyanine
Prx	Peroxyrédoxine
PS	Photosystème
PSI / PSII	Photosystème I / Photosystème II
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygénase
SBPase	Sédoheptulose-1,7-bisphosphatase
Srx	Sulfirédoxine
NBT	Nitro-bleue-tétrazolium
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoylphosphate
TBS	Tris Buffer Saline
TBS-T	Tris Buffer Saline + Tween
TCA	Acide trichloracétique
Tris	Tris [Hydroxyméthyl] aminométhane ou Trizma base
Trx	Thiorédoxine

APPENDICE B

**DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE BCA
ET PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR HPLC**

Activité MSR sur feuilles d'Atriplex

Le 2 avril 2009

	Laghouat Témoin Jeune T-LJ	Laghouat Témoin Agé T-LA	Laghouat Stressé Jeune S-LJ	Laghouat Stressé Agé S-LM	Djelfa Témoin Jeune T-DJ	Djelfa Témoin Agé T-DA	Djelfa Stressé Jeune S-DJ
Dosage sur 5 µL							
Valeur 1	29	17	39,5	33,2	40,9	31,2	44,9
Valeur 2	31,3	17,9	43,1	32,6	39,1	32,4	46
Moyenne	30,2	17,5	41,3	32,9	40,0	31,8	45,5
Concentration µg/µL	6,0	3,5	8,3	6,6	8,0	6,4	9,1

Pour dosage activité MSR (300µg)

	Contrôle	T-LJ	T-LA	S-LJ	S-LM	T-DJ	T-DA	S-DJ
Vol. prot	0	49,8	86,0	36,3	45,6	37,5	47,2	33,0
DTE	4	4	4	4	4	4	4	4
Hepes X10	10	5,0	1,4	6,4	5,4	6,3	5,3	6,7
H2O	76	31,2	0,0	43,3	35,0	42,3	33,5	46,3
dabsyl-MetSO	10	10	10	10	10	10	10	10
Volume réactionnel	100	100	100	100	100	100	100	100

valeurs brutes de HPLC

SampleName (ul)	Peak Name (min)	Injection Volume	Total Area	Area	% Area	Height	Retention Time	
	Contrôle 1	Met	160	8454580	262614	3,11	15701	5,399
	Lg T6-1	Met	160	7091913	917993	12,94	78976	5,35
	Lg T6-2	Met	160	7386462	936257	12,68	75391	5,319
	Lg T6-3	Met	160	7234017	901226	12,46	75078	5,291
	Lg T7-1	Met	160	7151574	987112	13,8	80875	5,294
	Lg T7-1	Met	160	7151574	987112	13,8	80875	5,294
	Lg T7-2	Met	160	7121394	1036658	14,56	86938	5,246
	Lg T7-3	Met	160	7198550	1031346	14,33	93613	5,254
	Lg S1-2	Met	160	7044587	607176	8,62	44979	5,235
	Lg S1-1	Met	160	6561494	589724	8,99	42322	5,229
	Lg S1-3	Met	160	7450901	626729	8,41	45349	5,21
	Lg S2-1	Met	160	7911090	564165	7,13	41314	5,186
	Lg S2-2	Met	160	8156844	597304	7,32	43529	5,178
	Lg S2-3	Met	160	8036175	595961	7,42	43056	5,182
	Lg S3-1	Met	160	7889959	854025	10,82	64192	5,162
	Lg S3-2	Met	160	7751271	846802	10,92	64828	5,155
	Lg S3-3	Met	160	8000262	848569	10,61	69057	5,144
	Lg S4-1	Met	160	7435622	606481	8,16	42954	5,161
	Lg S4-2	Met	160	8260847	658049	7,97	41637	5,137
	Lg S4-3	Met	160	8029163	648641	8,08	41185	5,14
	Dj T6-1	Met	160	7270742	934616	12,85	73765	5,143
	Dj T6-1	Met	160	7270742	901560	12,4	73765	5,143
	Dj T6-2	Met	160	7643729	992243	12,98	72988	5,122
	Dj T6-2	Met	160	7643729	962484	12,59	72988	5,122
	Dj T6-3	Met	160	7780223	994935	12,79	72768	5,113

Dj T6-3	Met	160	7780223	973542	12,51	72768	5,113
Dj T7-1	Met	160	7283681	865691	11,89	63533	5,111
Dj T7-1	Met	160	7283681	820775	11,27	63533	5,111
Dj T7-2	Met	160	6960796	814213	11,7	60476	5,119
Dj T7-2	Met	160	6960796	773894	11,12	60476	5,119
Dj T7-3	Met	160	7208929	852903	11,83	62475	5,124
Dj T7-3	Met	160	7208929	788655	10,94	62475	5,124
Dj S1-1	Met	160	7362626	850153	11,55	59547	5,122
Dj S1-1	Met	160	7362626	813142	11,04	59547	5,122
Dj S1-2	Met	160	7178387	853196	11,89	57462	5,115
Dj S1-2	Met	160	7178387	802574	11,18	57462	5,115
Dj S1-3	Met	160	8216660	980214	11,93	64745	5,103
Dj S1-3	Met	160	8216660	856497	10,42	64745	5,103
Dj S2-1	Met	160	8030792	982288	12,23	66283	5,106
Dj S2-1	Met	160	8030792	895416	11,15	66283	5,106
Dj S2-2	Met	160	7685403	946735	12,32	65000	5,115
Dj S2-2	Met	160	7685403	862067	11,22	65000	5,115
Dj S2-3	Met	160	7702552	937947	12,18	65664	5,113
Dj S3-1	Met	160	7684887	1082865	14,09	74933	5,111
45 Dj S3-1	Met	160	7684887	985946	12,83	74933	5,111
46 Dj S3-2	Met	160	6990779	983628	14,07	65382	5,112
47 Dj S3-2	Met	160	6990779	910247	13,02	65382	5,112
48 Dj S3-3	Met	160	7801982	1088113	13,95	71846	5,117
49 Dj S3-3	Met	160	7801982	1033165	13,24	71846	5,117
50 Dj S4-1	Met	160	7116253	937430	13,17	58850	5,129
51 Dj S4-1	Met	160	7116253	869120	12,21	58850	5,129
52 Dj S4-2	Met	160	7222274	845886	11,71	62698	5,123
53 Contrôle 1	Met-SO	160	8454580	7131085	84,35	178750	3,786
54 Lg T6-1	Met-SO	160	7091913	4954186	69,86	125939	3,747
55 Lg T6-2	Met-SO	160	7386462	5354440	72,49	133422	3,733
56 Lg T6-3	Met-SO	160	7234017	5140061	71,05	131637	3,737
57 Lg T7-1	Met-SO	160	7151574	5360620	74,96	138853	3,741
58 Lg T7-1	Met-SO	160	7151574	5360620	74,96	138853	3,741
59 Lg T7-2	Met-SO	160	7121394	5269156	73,99	133534	3,704
60 Lg T7-3	Met-SO	160	7198550	5384050	74,79	140572	3,722
61 Lg S1-2	Met-SO	160	7044587	6093010	86,49	169876	3,718
62 Lg S1-1	Met-SO	160	6561494	5622563	85,69	154422	3,698
63 Lg S1-3	Met-SO	160	7450901	6099888	81,87	165715	3,701
64 Lg S2-1	Met-SO	160	7911090	6645157	81,84	183634	3,697
65 Lg S2-2	Met-SO	160	8156844	6810395	83,49	189196	3,672
66 Lg S2-3	Met-SO	160	8036175	6632042	82,53	183248	3,681
67 Lg S3-1	Met-SO	160	7889959	6175066	78,26	163426	3,673
68 Lg S3-2	Met-SO	160	7751271	6059360	78,17	165130	3,688
69 Lg S3-3	Met-SO	160	8000262	6401910	80,02	177528	3,673
70 Lg S4-1	Met-SO	160	7435622	6027488	81,06	178870	3,687
71 Lg S4-2	Met-SO	160	8260847	6678356	80,84	186665	3,673
72 Lg S4-3	Met-SO	160	8029163	6431143	80,1	180104	3,662
73 Dj T6-1	Met-SO	160	7270742	5410554	74,42	153054	3,643
74 Dj T6-1	Met-SO	160	7270742	5443610	74,87	153054	3,643
75 Dj T6-2	Met-SO	160	7643729	5613114	73,43	156031	3,659
76 Dj T6-2	Met-SO	160	7643729	5642873	73,82	156031	3,659
77 Dj T6-3	Met-SO	160	7780223	5836667	75,02	164934	3,661
78 Dj T6-3	Met-SO	160	7780223	5858060	75,29	164934	3,661
79 Dj T7-1	Met-SO	160	7283681	5596127	76,83	161598	3,66
80 Dj T7-1	Met-SO	160	7283681	5641043	77,45	161598	3,66

81	Dj T7-2	Met-SO	160	6960796	5268891	75,69	149768	3,668
82	Dj T7-2	Met-SO	160	6960796	5309210	76,27	149768	3,668
83	Dj T7-3	Met-SO	160	7208929	5529699	76,71	157866	3,676
84	Dj T7-3	Met-SO	160	7208929	5593948	77,6	157866	3,676
85	Dj S1-1	Met-SO	160	7362626	5719664	77,69	163588	3,662
86	Dj S1-1	Met-SO	160	7362626	5756675	78,19	163588	3,662
87	Dj S1-2	Met-SO	160	7178387	5535322	77,11	161932	3,664
88	Dj S1-2	Met-SO	160	7178387	5585945	77,82	161932	3,664
89	Dj S1-3	Met-SO	160	8216660	6232324	75,85	180178	3,654

Current Time 09:48:48
Current Date 25/03/2010

SampleName (ul)	Peak Name (min)	Injection Volume	Total Area	Area	% Area	Height	Retention Time	
90	Dj S1-3	Met-SO	160	8216660	6315444	76,86	180178	3,654
91	Dj S2-1	Met-SO	160	8030792	6025534	75,03	181525	3,659
92	Dj S2-1	Met-SO	160	8030792	6082909	75,74	181525	3,659
93	Dj S2-2	Met-SO	160	7685403	5730995	74,57	167930	3,681
94	Dj S2-2	Met-SO	160	7685403	5790422	75,34	167930	3,681
95	Dj S2-3	Met-SO	160	7702552	5833985	75,74	170207	3,683
96	Dj S3-1	Met-SO	160	7684887	5580247	72,61	170681	3,674
97	Dj S3-1	Met-SO	160	7684887	5639144	73,38	170681	3,674
98	Dj S3-2	Met-SO	160	6990779	5102158	72,98	154488	3,679
99	Dj S3-2	Met-SO	160	6990779	5161401	73,83	154488	3,679
100	Dj S3-3	Met-SO	160	7801982	5690636	72,94	174563	3,691
101	Dj S3-3	Met-SO	160	7801982	5745584	73,64	174563	3,691
102	Dj S4-1	Met-SO	160	7116253	5236028	73,58	157093	3,711
103	Dj S4-1	Met-SO	160	7116253	5304338	74,54	157093	3,711
104	Dj S4-2	Met-SO	160	7222274	5384853	74,56	153616	3,691

Component Summary For Amount
Valeurs traitées

SampleName	Peak Name	Injection Volume (ul)	Total Area	Area	% Area	Moy aire Met	Moy corr	Act. Gamme Met 1 nmol = 1304478 (fichier gamme 2009)
Echantillons Atriplex. Déficit hydrique 2010 (300 µg prot par dosage)								300 µg
Contrôle 1	Met	160	8454580	262614	3,11			picomoles. mg-1.prot.mn-1
Contrôle 2	Met	160	7276370	343612	4,72	303113		
Lg T6-1	Met	160	7091913	917993	12,94			
Lg T6-2	Met	160	7386462	936257	12,68	918492	615379	5,46E-11
Lg T6-3	Met	160	7234017	901226	12,46			54,6 picomoles/
Lg T7-1	Met	160	7151574	987112	13,8			
Lg T7-2	Met	160	7121394	1036658	14,56	1018372	715259	6,35E-11
Lg T7-3	Met	160	7198550	1031346	14,33			63,5 picomoles/
Lg S1-2	Met	160	7044587	607176	8,62			
Lg S1-1	Met	160	6561494	589724	8,99	607876	304763	2,70E-11
Lg S1-3	Met	160	7450901	626729	8,41			27,0 picomoles/
Lg S2-1	Met	160	7911090	564165	7,13			
Lg S2-2	Met	160	8156844	597304	7,32	585810	282697	2,51E-11
Lg S2-3	Met	160	8036175	595961	7,42			25,1 picomoles/
Lg S3-1	Met	160	7889959	854025	10,82			
Lg S3-2	Met	160	7751271	846802	10,92	849799	546686	4,85E-11

Lg S3-3	Met	160	8000262	848569	10,61			48,5 picomoles/
Lg S4-1	Met	160	7435622	606481	8,16			
Lg S4-2	Met	160	8260847	658049	7,97	637724	334611	2,97E-11
Lg S4-3	Met	160	8029163	648641	8,08			29,7 picomoles/
Dj T6-1	Met	160	7270742	901560	12,4			
Dj T6-2	Met	160	7643729	962484	12,59	945862	642749	5,70E-11
Dj T6-3	Met	160	7780223	973542	12,51			57 picomoles/
Dj T7-1	Met	160	7283681	820775	11,27			
Dj T7-2	Met	160	6960796	773894	11,12	794441	491328	4,36E-11
Dj T7-3	Met	160	7208929	788655	10,94			43,6 picomoles/
Dj S1-1	Met	160	7362626	813142	11,04			
Dj S1-2	Met	160	7178387	802574	11,18	824071	520958	4,62E-11
Dj S1-3	Met	160	8216660	856497	10,42			46,2 picomoles/
Dj S2-1	Met	160	8030792	895416	11,15			
Dj S2-2	Met	160	7685403	862067	11,22	875678	572565	5,08E-11
Dj S2-3	Met	160	7702552	869551	11,29			50,8 picomoles/
Dj S3-1	Met	160	7684887	985946	12,83			
Dj S3-2	Met	160	6990779	910247	13,02	976453	673340	5,97E-11
Dj S3-3	Met	160	7801982	1033165	13,24			59,7 picomoles/
Dj S4-1	Met	160	7116253	869120	12,21			
Dj S4-2	Met	160	7222274	845886	11,71	864328	561215	4,98E-11
Dj S4-3	Met	160	7366943	877979	11,92			49,8 picomoles/

BILAN Manips activité MSR Atriplex

Stress salin

	Manip 5 et 6	
Dj T	52,9	57,6
Dj 3	47,4	58,8
Dj 6	52,8	64,5
Lg T	42,3	
Lg 3	55,2	68,3
Lg 6	46,4	50,8

Avec moyennes FJ des manips 2 et 4 :

	Manips 2-4 Fj + Manip 5 et 6		
Dj T	57,85	52,9	57,6
Dj 3	49,85	47,4	58,8
Dj 6	52,4	52,8	64,5
Lg T	42,45	42,3	
Lg 3	58,6	55,2	68,3
Lg 6	38,85	46,4	50,8

Avec moyennes FJ des manips 2 et 4 :

	Manips 2-4 Fj + Manip 5 et 6		
Dj T	57,85	52,9	57,6
Dj 3	49,85	47,4	58,8
Dj 6	52,4	52,8	64,5
Lg T	42,45	42,3	
Lg 3	58,6	55,2	68,3

Lg 6	38,85	46,4	50,8
Sans les valeurs extrêmes			
	Manips 2-4 Fj + Manip 5 et 6		
Dj T		52,9	57,6
Dj 3	49,85	47,4	58,8
Dj 6	52,4	52,8	
Lg T	42,45	42,3	
Lg 3	58,6	55,2	
Lg 6		46,4	50,8

Déficit hydrique (Manip 8)**Activité catalase sur 100 µg protéines foliaires solubles Atriplex**Tampon phosphate - 20 mM H₂O₂

Mesure absorption à 240 nm pendant 2

min

pendant 1 mn

Echantillon	DO à 240 nm t = 0	DO à 240 nm t = 1 min		
			Moyenne	Ecart-type
Laghouat T1	1,62	1,5	0,12	
Laghouat T2	1,76	1,64	0,12	
Laghouat T3	1,8	1,69	0,11	0,120
Laghouat T4	1,73	1,6	0,13	0,008
Laghouat 300 mM 1	1,74	1,64	0,1	
Laghouat 300 mM 2	1,64	1,55	0,09	
Laghouat 300 mM 3	1,82	1,72	0,1	0,105
Laghouat 300 mM 4	1,69	1,59	0,13	0,017
Laghouat 600 mM 1	1,77	1,68	0,09	
Laghouat 600 mM 2	1,74	1,66	0,08	
Laghouat 600 mM 3	1,74	1,67	0,07	0,078
Laghouat 600 mM 4	1,73	1,66	0,07	0,010
Djelfa T1	1,69	1,56	0,13	
Djelfa T2	1,74	1,61	0,13	
Djelfa T3	1,68	1,57	0,11	0,115
Djelfa T4	1,66	1,57	0,09	0,019
Djelfa 300 mM 1	1,81	1,72	0,09	
Djelfa 300 mM 2	1,71	1,62	0,09	
Djelfa 300 mM 3	1,86	1,78	0,08	0,083
Djelfa 300 mM 4	1,75	1,68	0,07	0,010
Djelfa 600 mM 1	1,76	1,67	0,09	
Djelfa 600 mM 2	1,7	1,64	0,06	
Djelfa 600 mM 3	1,86	1,79	0,07	0,073
Djelfa 600 mM 4	1,8	1,73	0,07	0,013
Dj T				57
Dj SH				46,2
Lg T				43,6
Lg SH				50,8
				59,7
Lg T				54,6
Lg SH				27
				63,5
				48,5

Témoins : Calculs avec moyennes de chaque manip pour les témoins

	Manips 2-4 Fj	Manip 5	Manip 6
Dj T	<i>57,85</i>	55,2	53,05
Lg T	<i>42,45</i>	48,8	46,6

Stress salin : Calculs avec moyennes de chaque manip pour les témoins

	Manips 2-4 Fj	Manip 5	Manip 6
Dj 3	<i>49,85</i>	53,1	54,3
Dj 6	<i>52,4</i>	58,65	46,1
Lg 3	<i>58,6</i>	61,75	51,85
Lg 6	<i>38,85</i>	48,6	44,05

**Manip stress salin
Atriplex**

Activité catalase sur 100 µg protéines foliaires solubles Atriplex

Tampon phosphate - 20 mM H₂O₂

Mesure absorption à 240 nm pendant 2
min

pendant 1 mn

Echantillon	DO à 240 nm t = 0	DO à 240 nm t = 1 min		Moyenne	Ecart-type
Laghouat T1	1,18	1,1	0,08		
Laghouat T2	1,42	1,32	0,1		
Laghouat T3	1,41	1,31	0,1	0,092	0,010
Laghouat T4	1,4	1,31	0,09		
Laghouat 300 mM 1	1,39	1,28	0,11		
Laghouat 300 mM 2	1,48	1,36	0,12		
Laghouat 300 mM 3	1,39	1,3	0,09	0,103	0,015
Laghouat 300 mM 4	1,74	1,65	0,09		
Laghouat-2 T1	1,34	1,22	0,12		
Laghouat-2 T2	1,4	1,28	0,12		
Laghouat-2 T3	1,34	1,22	0,12	0,113	0,015
Laghouat-2 T4	1,35	1,26	0,09		
Laghouat-2 300 mM 1	1,54	1,42	0,12		
Laghouat-2 300 mM 2	1,41	1,31	0,1		
Laghouat-2 300 mM 3	1,35	1,22	0,13	0,115	0,013
Laghouat-2 300 mM 4	1,35	1,24	0,11		

BILAN DE TOUTES LES MANIPS Stress salin

Date	03-mars	09-mars	11-mars	23-mars	24-mars	25-mars	25-mars
D	0,103	0,08	0,11	0,118	0,115		
D-300	0,093	0,075	0,085	0,083	0,083		
D-600	0,107	0,07	0,11	0,083	0,073		
L	0,12	0,085	0,11	0,095	0,12	0,092	0,113
L-300	0,1	0,125	0,15	0,115	0,105	0,103	0,115
L-600	0,11	0,1	0,095	0,075	0,078		

Conversion d'après Aebi (1984)

Diff DO 240 = 0,00394.L.mmol-1.mm-1

Pour 1 mmol/L-1 et sur un mm : Diff DO 240 = 0,00394

Pour 1 mmol/L-1 et sur un cm : Diff DO 240 = 0,0394

Si Diff DO 240 = 0,1, alors diff de concentration = 2,538 mmol.L-1 H2O2

Pour 1 mL : 2,538 µmoles H2O2

Pour 100 µg prot sur 1 min, environ 25,38 µmoles H2O2 par mg prot par min

**Manip déficit
hydrique Atriplex**

Activité catalase sur 100 µg protéines foliaires solubles Atriplex**Tampon phosphate - 20 mM H2O2****Mesure absorption à 240 nm pendant 2 min**

Echantillon	DO à 240 nm t = 0	pendant 1 min			Moyenne	Ecart-type
		DO à 240 nm t = 1 min				
Laghouat T1	1,19	1,01	0,18			
Laghouat T2	1,16	1,05	0,11			
Laghouat T3	1,23	1,07	0,16	0,133	0,046	
Laghouat T4	1,31	1,23	0,08			
Laghouat S1	1,21	1,06	0,15			
Laghouat S2	1,14	1,06	0,08			
Laghouat S3	1,05	0,92	0,13	0,108	0,039	
Laghouat S4	1,21	1,14	0,07			
Djelfa T1	1,52	1,4	0,12			
Djelfa T2	1,2	1,09	0,11			
Djelfa T3	1,08	0,98	0,1	0,110	0,008	
Djelfa T4	1,17	1,05	0,11			
Djelfa S1	1,26	1,13	0,13			
Djelfa S2	1,2	1,07	0,13			
Djelfa S3	1,26	1,21	0,05	0,093	0,043	
Djelfa S4	1,06	1	0,06			

BILAN DE TOUTES LES MANIPS Déficit hydrique

Date	01-mars	08-mars	10-mars	21-mars	22-mars		
D	0,13	0,093	0,153	0,123	0,11	0,122	0,022
D-WD	0,16	0,133	0,12	0,123	0,093	0,126	0,024
L	0,23	0,107	0,115	0,133	0,133	0,144	0,050
L-WD	0,12	0,137	0,153	0,115	0,108	0,127	0,018

Date	01-mars	08-mars	10-mars	21-mars	22-mars		
D	0,13			0,123	0,11	0,121	0,010
D-WD		0,133	0,12	0,123		0,125	0,007
L			0,115	0,133	0,133	0,127	0,010
L-WD	0,12	0,137		0,115		0,124	0,012

Valeurs extrêmes enlevées

Conversion d'après Aebi (1984)

Diff DO 240 = 0,00394.L.mmol-1.mm-1

Pour 1 mmol/L-1 et sur un mm : Diff DO 240 = 0,00394

Pour 1 mmol/L-1 et sur un cm : Diff DO 240 = 0,0394

Si Diff DO 240 = 0,1, alors diff de concentration = 2,538 mmol.L-1 H2O2

Pour 1 mL : 2,538 µmoles H2O2

Pour 100 µg prot sur 1 min, environ 25,38 µmoles H2O2 par mg prot par min

D	30,7	2,6
D-WD	31,8	1,7
L	32,2	2,6
L-WD	31,5	2,9

APPENDICE C

Statistiques descriptives

Tableau1 : Croissance relative :feuilles

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	2,5	0,23	B
150mM	4,1	0,18	A
300mM	1,2	0,12	C
450mM	0,5	0,03	D
600mM	0,3	0,08	D

Tableau2 :Croissance relative :racines

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	2,3	0,18	A
150mM	1,8	0,10	B
300mM	1,2	0,12	B
450mM	0,3	0,03	C
600mM	0,28	0,02	C

Tableau3 :Contenu relatif en eau :feuilles (%)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	88,12	0,69	A
150mM	90,7	0,57	A
300mM	89,8	0,87	A
450mM	65,6	0,90	B
600mM	60,4	0,56	C

Tableau4 :Contenu relatif en eau :racines(%)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	88,1	0,2	A
150mM	90,5	0,3	A
300mM	89,8	0,3	A
450mM	88,6	0,3	A
600mM	89,4	0,5	A

Tableau5:Potentiel osmotique an niveau des feuilles(-MPa)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	1,4	0,02	D
150mM	2,5	0,06	C
300mM	3,1	0,04	C
450mM	5,4	0,05	B
600mM	6,8	0,04	A

Tableau6 :Potentiel osmotique an niveau des racines (-MPa)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	0,5	0,01	D
150mM	1	0,01	C
300mM	1,1	0,02	B
450mM	3,2	0,02	A
600mM	1,8	0,01	B

Tableau7 :Concentration en Na⁺ au niveau des feuilles (μmoles/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	156	12	D
150mM	200	10	C
300mM	210	15	C
450mM	300	20	B
600mM	320	22	A

Tableau8:Concentration en Na⁺ au niveau des racines(μmoles/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	45	4	D
150mM	40	5	C
300mM	100	6	B
450mM	105	9	B
600mM	150	9	A

Tableau9 :Concentration en K⁺ au niveau des feuilles(μmoles/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	100	20	A
150mM	58	10	B
300mM	42	5	C
450mM	25	12	D
600mM	18	7	D

Tableau10 :Concentration en K⁺ au niveau des racines(μmoles/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	54	10	A
150mM	40	6	B
300mM	30	7	C
450mM	25	7	D
600mM	15	3	D

Tableau11 :Concentration en proline au niveau des feuilles(μmoles/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	10	0,6	D
150mM	45	10	C
300mM	48	12	C
450mM	60	12	B
600mM	80	15	A

Tableau12 :Concentration en proline au niveau des racines(μ moles/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	5	0,4	D
150mM	27	7	C
300mM	34	8	B
450mM	55	8	A
600mM	51	12	A

Tableau13 :Concentration en sucres au niveau des feuilles(μ moles/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	7,5	0,6	D
150mM	21	3	C
300mM	45	5	B
450mM	48	8	B
600mM	54	10	A

Tableau14 :Concentration en sucres au niveau des racines(μ moles/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	5	0,4	D
150mM	15	2	C
300mM	27	6	B
450mM	35	5	A
600mM	34	6	A

Tableau15 :Concentration en acides aminés au niveau des feuilles(μ moles de Leucine/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	7,5	0,6	D
150mM	21	3	C
300mM	28	3	B
450mM	34	4	B
600mM	47	5	A

Tableau16 :Concentration en acides aminés au niveau des racines(μ moles de Leucine/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	10	0,4	D
150mM	12	2	C
300mM	14	2	B
450mM	14	2	A
600mM	12	3	A

Tableau17 :Concentration en Glycine bétaine au niveau des feuilles(μ moles/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	110	10	D
150mM	320	15	C
300mM	450	20	A
450mM	430	25	A
600mM	457	15	B

Tableau18:Concentration en glycine bétaine au niveau des racines(μ moles/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	0	0	C
150mM	167	15	B
300mM	200	20	A
450mM	0	0	C
600mM	0	0	C

Tableau19 :Concentration en chlorophylle A au niveau des feuilles(mg/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	181,8	23	A
150mM	178,2	30	A
300mM	176,4	16	A
450mM	172,9	19	A
600mM	134,7	15	B

Tableau20:Concentration en chlorophylle B au niveau des feuilles(mg/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	104,4	15	A
150mM	107,8	12	A
300mM	102,8	18	A
450mM	99,6	10	B
600mM	72,3	13	B

Tableau21 :Concentration en chlorophylle A+B au niveau des feuilles(mg/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	286,2	20	A
150mM	285,5	25	A
300mM	277,4	22	A
450mM	271,0	15	B
600mM	207,1	18	B

Tableau22:Concentration en Caroténoïdes au niveau des feuilles(mg/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	19,6	0,2	A
150mM	20,6	0,3	A
300mM	20,4	0,3	A
450mM	20,2	0,4	C
600mM	17,3	0,2	C

Tableau23:Concentration en protéines au niveau des feuilles(mg/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	3,25	0, 1	A
150mM	2,3	0, 2	A
300mM	1,75	0, 2	A
450mM	1,3	0, 3	B
600mM	1,4	0, 1	B

Tableau24:Concentration en protéines au niveau des racines(mg/g de PF)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	1,5	0,2	A
150mM	1,5	0,8	A
300mM	1,8	0,8	A
450mM	0,87	0,4	C
600mM	0,75	0,2	C

Tableau25 :Concentration en composés phénoliques au niveau des feuilles(mg EAG/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	15,2	1,2	A
150mM	20,7	1,5	A
300mM	20,9	1,8	A
450mM	15,9	1,2	C
600mM	15,7	1,4	C

Tableau26 :Concentration en flavonoïdes au niveau des feuilles(mg EC/g de MS)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	7,2	0,2	A
150mM	9,5	0,3	A
300mM	8,5	0,3	A
450mM	7,3	0,4	C
600mM	7,2	0,2	C

Tableau27 :Activité des peroxydases au niveau des feuilles(μ moles de Gaiacol/mn/mg de Proteines)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	10,5	2,2	D
150mM	12,6	2,3	D
300mM	48,4	1,3	A
450mM	53,2	1,8	B
600mM	45,3	1,7	C

Tableau28 :Activité des Catalases au niveau des feuilles μ moles de H₂O₂/mn/mg de Proteines)

Variable	Moyenne	ET	GH
Témoin	30,2	1,2	C
150mM	30,2	1,3	C
300mM	55,4	1,3	A
450mM	40,3	1,4	B
600mM	28,5	1,2	C

ANALYSE STATISTIQUES :Calculs de la variance

Tableau 29 :Analyse de la variance de la croissance relative

Feuilles

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	1.72	19	0.07			
Var facteur	1.08	3	0.36	15.82	0.0001	***
Var résiduel	0.36	16	0.02			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 30 : Analyse de la variance de la CR au niveau des racines:

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	14.80	17	0.87			
Var facteur	7.95	2	3.97	13.47	0.0009	***
Var résiduel	3.45	12	0.29			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 31 : Analyse de la variance du contenu relatif en eau

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	4633,24	19	243,45			
Var facteur	4627,62	3	1542,6	4934,3	0.00056	***
Var résiduel	5,62	16	0.39			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 32 Analyse de la variance du contenu relatif en eau des racines:

Source de	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	11631.98	19	684.23			
Var facteur	9768.73	3	4884.36	33.87	0.08075	NS
Var résiduel	1730.50	16	144.21			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 33 Analyse de la variance du potentiel osmotique au niveau des feuilles

Source de	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	8540.27	19	371.32			
Var facteur	6646.24	3	2215.41	89.43	0.0000	***
Var résiduel	396.37	16	24.77			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 34 Analyse de la variance du potentiel osmotique au niveau des racines

Source de	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	649,3	19	34,2			
Var facteur	456.4	3	152,1	19.83	0.0000	***
Var résiduel	239,1	16	15,1			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 35 Analyse de la variance de la teneur en Na⁺des feuilles:

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	23.88	19	1.04			
Var facteur	17.21	3	5.74	24.68	0.0000	***
Var résiduel	396.37	16	24.77			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 36 : Analyse de la variance de la teneur de Na⁺ au niveau des racines

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	57,4	19	29,3			
Var facteur	83,3	3	27,1	25.95	0.0000	***
Var résiduel	223.25	16	15,5			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 37 Analyse de la variance de la teneur en proline au niveau des feuilles

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	1.44	19	0.06			
Var facteur 1	0.80	3	0.27	8.73	0.0012	***
Var résiduel	0.49	16	0.03			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 38 Analyse de la variance de la teneur en proline au niveau des racines:

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	1.08	17	0.06			
Var facteur	0.93	2	0.46	54.45	0.0000	***
Var résiduel	0.10	12	0.01			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 39 : Analyse de la variance de la teneur en acides aminés au niveau des feuilles :

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	22.58	19	1,18			
Var facteur 1	19.41	3	6.47	60.09	0.0000	***
Var résiduel	1.72	16	0.11			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 40 : Analyse de la variance de la teneur en acides aminés au niveau des racines:

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	513.86	19	30.23			
Var facteur 1	471.32	3	235.66	140.03	0.0000	***
Var résiduel	20.20	16	1.68			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 38 Analyse de la variance de la teneur en sucres au niveau des feuilles

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	4,64	19	0,24			
Var facteur 1	4,60	3	1,53	97.92	0.0000	***
Var résiduel	0,05	16	0,00			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 39 Analyse de la variance de la teneur en sucres au niveau des racines

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	4.56	19	0.82			
Var facteur 2	9.23	3	1,89	9.97	0.0081	**
Var résiduel	7.9	16	0,16			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 42 : Analyse de la variance de la teneur en glycine bétaine au niveau des feuilles :

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	2.02	19	0.09			
Var facteur 1	1.38	3	0.46	22.80	0.0000	***
Var résiduel	0.32	16	0.02			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 43 Analyse de la variance de la teneur glycine bétaine au niveau des racines :

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	0.55	17	0.03			
Var facteur 1	0.44	2	0.22	36.08	0.0000	***
Var résiduel	0.07	12	0.01			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 44 : Analyse de la variance de la teneur en protéines au niveau des feuilles:

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	0.03	19	0.00			
Var facteur	0.02	3	0.01	33.45	0.0000	***
Var résiduel	0.00	16	0.00			

NS : résultat non significatif. *résultat significatif. **résultat très significatif. ***résultat très hautement significatif

Tableau 45 : Analyse de la variance de la teneur en protéines au niveau des racines:

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	0.083	19	0.00			
Var facteur	0.12	3	0.01	30,6	0.0000	***
Var résiduel	0.00	16	0.00			

Tableau 46 : Analyse de la variance de l'activité des Peroxydases au niveau des feuilles

Source de variation	SCE	ddl	Carrés moyens	Test F	Proba	
Var totale	1,8	19	0.00			
Var facteur	1,9	3	0.01	28,5	0.0000	***
Var résiduel	0.00	16	0.00			

