

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biologie et Ecologie

قسم بيولوجيا وايكولوجيا النبات

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie et physiologie végétale

Spécialité : Biodiversité et physiologie végétale

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Effets potentiels et mécanismes d'action antioxydants chez (*Triticosecale Wittmack*) et (*Hordeum vulgare L*) induit par un stress hydrique.

Présenté par : MIOUAT Imene
SEGHIR Adel

Le 20/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : BOUCHAREB RADIA (MCA - UFM, Constantine).

Examineur 1 : CHIBANI SALIH (MCA - UFM,Constantine).

Examineur 2 : AOUAIDJIA NAWAL (MCB - UFM,Constantine).

Année universitaire 2021 – 2022



Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH tout puissant, De nous avoir accordé la force, le courage, la volonté et la patience pour terminer ce travail.

Nous tenons à remercier notre encadreur BOUCHAREB RADIA, ses précieux conseil et son aide durant toute la période de travail.

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury : CHIBANI SALIH et AOUAIDJIA NAWAL
Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre mémoire en acceptant de l'examiner.*

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les Personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.





Dédicace

Je dédie ce travail...

À Ma mère

Pour son amour inestimable, sa confiance, son soutien, ses sacrifices et toutes les valeurs qu'elle m'a données.

À mon père

Qui m'a encouragé et conseillé, tous les mots ne puissent exprimer mon amour et mon respect Que Dieu le tout puissant te procure, santé et longue vie.

À mes frère Anis ; Amir et à ma belle-sœur Elise et mon Petit neveu Iyade

Pour L'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour eux mais surtout pour l'amour de ce même sang qui coule dans nos veines.

À ma famille Seghir et Guebbas surtout à ma chère tante Abla pour son soutien

À mes partenaires Imène et Bouchra et à tous mes amis de la promotion

Adel



Dédicace

Je dédie ce travail...

*A mes chers parents
Pour tous leurs sacrifices, que dieu me les
gardent et les protègent.*

*A mes chères frères et sœurs
Pour leurs encouragements, Merci d'être
toujours là pour moi.*

A tous mes amis proches et tous ce que j'aime.

*A mon binôme
Pour ton travail acharné et ta coopération
pour faire de ce travail un succès.*

*A tous ceux qui m'ont aidé pour réaliser ce
modeste travail.*

IMENE

Résumé:

Dans ce travail, on a étudié les caractéristiques biochimiques et l'effet des mécanismes d'action antioxydant chez le triticale et l'orge induits par le stress hydrique. Les paramètres mesurés ont été réalisés au sein de faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri Constantine 1.

Les dosages sont : La glycine bétaine, le malonedialdéhyde (MDA), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les protéines, les polyphénols et les flavonoïdes. Les résultats de cette étude révèlent un niveau élevé de variabilité pour les principales concentrations mesurées. La variabilité a été évaluée grâce à des analyses statistiques. Les résultats obtenus montrent que le stress hydrique a entraîné une production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que le rôle important des métabolites secondaires dans la défense contre le stress oxydatif causé par le stress hydrique. La concentration de la glycine bétaine, MDA, et H_2O_2 a été plus élevée dans le Triticale par les valeurs suivants (0.0143 mg/ml, 0,521 nmol/ml et 6,92 mg/ml, respectivement) par contre les polyphénols, les flavonoïdes et les protéines, on a enregistré des concentrations plus élevé chez l'orge (9.86 mgEAG/g, 0.80 mgEQC/g et 0.159 mg/ml, respectivement).

En conclusion, l'étude a montré que les deux espèces sont tolérantes et efficaces contre les contraintes hydriques.

Mots-clés : stress hydrique, stress oxydatif, antioxydants, Triticale, Orge.

Abstract :

In this work, we studied the biochemical properties and the effect of the antioxidant mechanisms of action caused by water stress in two types of cereal: Triticale and barley. Caused by water stress. This study was conducted at the level of the Faculty of Nature and Life Sciences of the University of Montori Constantine 1.

The elements identified and estimated are quantity: glycine betaine, malonedialdehyde (MDA), hydrogen peroxide (H_2O_2), proteins, polyphenols and flavonoids.

The results of this study reveal a high level of variation of measured main concentrations. The variance was assessed through statistical analysis. Results obtained show that water stress led to the production of reactive oxygen species (ERO), as well as the important role of secondary metabolites in defending against oxidative stress caused by water stress. Where the concentration of glycine betaine, MDA, and H_2O_2 was higher in Triticale through the following values (0.0143 mg/ml, 0.521 nmol/ml and 6.92 mg/ml, respectively) unlike polyphenols, flavonoids and proteins, higher concentrations were recorded in barley (9.86 mgEAG/g, 0.80 mgEQC/g et 0.159 mg/ml, respectively).

In conclusion, the study showed that both species have an effective resistance capability against water stress.

Keywords: water stress, oxidative stress, antioxidants, Triticale, Barley.

الملخص:

في هذا العمل، قمنا بدراسة الخصائص البيوكيماوية وتأثير آليات عمل مضادات الأكسدة الناجمة عن الاجهاد المائي في نوعين من الحبوب هما: الشيقم والشعير. أجريت هذه الدراسة على مستوى كلية علوم الطبيعة والحياة بجامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1.

العناصر التي تم تحديدها وتقديرها هي كمية: جليسين بيتين، مالونيدالديهايد (MDA)، بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، البروتينات، البوليفينول والفلافونويد.

تكشف نتائج هذه الدراسة عن مستوى عالٍ من التباين للتراكيز الرئيسية المقاسة. وجرى تقييم التباين من خلال التحليل الإحصائي. تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن الإجهاد المائي أدى إلى إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ERO)، بالإضافة إلى الدور المهم لمركبات الأيض الثانوي في الدفاع ضد الإجهاد التأكسدي الناجم عن الإجهاد المائي. حيث كان تركيز الجلايسين بيتاين ، MDA، و H_2O_2 أعلى في الشيقم من خلال القيم التالية (0.0143 ملغم/مل، 0.521 نانومول/مل و 6.92 ملغم/مل، على التوالي) على عكس البوليفينول والفلافونويد والبروتينات، تم تسجيل تراكيز أعلى في الشعير (9.86 ملغم مكافئ حمض الغاليك/غ، 0.80 ملغم مكافئ كاتسين/غ، 0.159 ملغم/مل، على التوالي). في الختام، أظهرت الدراسة أن كلا النوعين لديهما قدرة مقاومة فعالة ضد الاجهاد المائي.

الكلمات الرئيسية: الإجهاد المائي، الإجهاد التأكسدي، مضادات الأكسدة، الشيقم، الشعير.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Chapitre I : Etude Bibliographique

I. Revues bibliographiques

1. L'orge (<i>Hordeum vulgare L</i>)	1
1.1. L'histoire de l'orge	1
1.2. Origine	2
1.3. Description botanique	2
1.4. Classification	3
2. Triticale (<i>Triticosecale Wittmack</i>)	3
2.1. Historique	4
2.2. Origine du triticale	4
2.3. Génétique de triticale	6
2.4. Classifications du triticale	6

II. le stress hydrique et oxydatif

1. Notion de stress	7
2. Catégories de stress et conséquences	7
2.1. Stress biotique	7
2.2. Stress abiotique	7
3. Les contraintes abiotiques et leurs effets sur la plante	8
4. le stress hydrique	8
4.1. Définition des stress hydrique	8
4.2. Les conséquences du stress hydrique	9
4.3. Effet du stress hydrique sur les plantes	10
4.4. Mécanisme de résistance à la sécheresse	10
4.5. Mécanisme d'adaptation biochimique en condition de stress hydrique	12
4.5.1. Rôle du potentiel (osmoprotection)	12
4.5.1.1. La glycine bêtaïne	13
5. stress oxydatif	14
5.1. Définition de stress oxydatif	14
5.2. Classification des marqueurs du stress oxydatif	14
5.3. Définition des espèces réactives de l'oxygène	15
5.3.1. Radicaux libres	16
5.3.2. La formation des espèces réactives de l'oxygène	17
5.3.2.1. Anion super oxyde (O ₂ ⁻)	18
5.3.2.2. Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	18
5.3.2.3. Radical hydroxyle (°OH)	19
5.3.3. Sources des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale	19

5.4. Conséquence du stress oxydatif dans la plante	20
5.4.1. La peroxydation lipidique (LPO)	21
5.4.2. Marqueurs de la lipoperoxydation	21
5.4.3. Oxydation des protéines	22
6. La relation entre stress hydrique (environnemental) et stress oxydatif	22
7. Les antioxydants.....	23
7.1. Définition	23
7.2. Les systèmes antioxydants	25
7.2.1. Système antioxydants endogènes (enzymatique)	26
7.2.2. Système antioxydants exogènes (non enzymatique)	26
8. Les polyphénols	27
8.1. Structures chimiques et classification	27
8.2. Les polyphénols comme antioxydants	28
8.3. Flavonoïdes	29
8.4. Propriétés antioxydants des flavonoïdes	30
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
1. Matériel végétal.	33
2. Mise en expérimentation	34
2.1. Dosage de glycine bétaine	34
2.2. Dosage de malondialdéhyde MDA	35
2.3. Dosage de peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	36
2.4. Dosage des protéines	37
2.5. Dosage des polyphénols	38
2.6. Dosage des flavonoïdes	39
3. L'analyse statistique.....	40
CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	
1. La glycine bétaine	42
2. Le malonedialdéhyde (MDA)	43
3. Peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	44
4. Les protéines	45
5. Les polyphénols	46
6. Les flavonoïdes	47
Discussions générales	48
Conclusion et perspectives	51
Références bibliographiques.....	54
Annexe	63

La liste des abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

ANOVA Analyse de variance

CAT Catalase

CTE Chaines de transport et port d'électrons

D.O Densité optique

EOA Espèces actives de l'oxygène

ERO Espèces réactives de l'oxygène

GB Glycine bétaine

GPX Glutathion peroxydase

H₂O₂ Eau Oxygénée ou peroxyde d'hydrogène

LPO Peroxydation lipidique

MDA Malondialdehyde

ROS Réactive Oxygène Species

SOD Super oxyde dismutase

TBA Acide Thio barbiturique

TCA Acide Trichloracétique

Les listes des tableaux

Tableau 01: Classification de l'orge (<i>Hurdeum Vulgare L.</i>)	03
Tableau 02: Classification de triticales (<i>Triticosecale Wittmack</i>)	06
Tableau 03: Classification des principaux marqueurs de stress oxydant	15
Tableau 04: Espèces réactives de l'oxygène radicalaire et non radicalaire ...	16
Tableau 05: Origine et localisation des espèces réactives d'oxygène.....	20
Tableau 06 : L'origine des deux espèces étudiées : l'orge, et triticales.....	33

La liste des figures

Figure 01: Création de Triticale	05
Figure 02: Effets morphologiques, physiologiques, moléculaires et les différentes réponses de la plantes soumise à un stress hydrique	12
Figure 03: Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie	18
Figure 04: Les différents types des antioxydants	24
Figure 05: Système de défense antioxydant : les composants enzymatiques et non enzymatiques	25
Figure 06: Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe	28
Figure 07: Structure de base de flavonoïdes	29
Figure 08: Caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libre	30
Figure 09: Triticale témoin	33
Figure 10 : Orge témoin	33
Figure 11 : Triticale et Orge stressées	33
Figure 12 : Dosage de glycine bétaine	34
Figure 13 : Dosage de MDA.....	35
Figure 14 : Dosage de H ₂ O ₂	36
Figure 15 : Dosage des protéines	37
Figure 16 : Dosage de flavonoïdes	39
Figure 17: La concentration de GB chez orge et triticale sous stress hydriques.....	42
Figure 18: La concentration de MDA chez orge et triticale sous stress hydriques .	43
Figure 19: La concentration de H ₂ O ₂ chez orge et triticale sous stress hydriques..	44
Figure 20: La concentration des protéines	45
Figure 21: La concentration des polyphénols	46
Figure 22: La concentration des flavonoïdes	47

A decorative border consisting of a thin black line forming a rectangle, with ornate floral corner pieces at each of the four corners. Each corner piece features a cluster of roses and leaves.

Introduction

Introduction

Les végétaux sont très dépendants des facteurs climatiques. Les contraintes environnementales abiotiques comme la sécheresse et la chaleur sont les principaux déterminants limitant la croissance et le rendement des plantes à travers le monde (**Ceccarelli, 2010**). En Algérie le climat est caractérisé par l'irrégularité de la pluviosité et donc un impact accru des sécheresses. Ces dernières sont considérées comme les facteurs d'une perte partielle ou totale de production, en particulier dans le cas des céréales. Cette diversité est une source précieuse pour l'amélioration des cultures. Elle constitue une base fondamentale pour étudier les processus d'adaptation et identifier les gènes et les régions génomiques impliquées dans les mécanismes de tolérance au stress.

Les céréales constituent une part importante des ressources alimentaires de l'homme et de l'animal. Parmi ces céréales, l'orge (*Hordeum vulgare*) est l'une des espèces les plus largement cultivées dans le monde, et le triticale (*Triticosecale Wittmack*). car elles contiennent plus de composés photochimiques que précédemment considérés (**Perez-Jimenez et al., 2005**).

Stress hydrique, particulièrement grave, affecte les indicateurs de croissance végétative de la plante en stimulant la production des radicaux libres avec effet oxydant des cellules de la plante. (**Lushchack et Semchyshy, 2012**).

Différents travaux démontrent que le déficit hydrique perturbe grandement la synthèse des protéines au niveau des graines desséchées. Cependant, des antioxydants ou des composés antioxydants phénoliques structurés sont également détectés dans l'orge et le triticale (**Cavallero et al., 2004**).

Face à un stress hydrique, différentes réponses sont mises en jeu par la plante pour maintenir un état hydrique favorable et tolérer la déshydratation. Ces réponses se situent à tous les niveaux (morphologique, physiologique, métabolique et moléculaire). De ce fait, pour faire face à la contrainte hydrique, la plante procèdera par exemple au développement d'un système racinaire

Introduction

adapté, à la fermeture des stomates (**Djebbar, 2012**) ainsi qu'à un osmo-ajustement par la synthèse de solutés compatibles. (**Delauney et Verma, 1993**). D'autre part, afin d'atténuer le stress oxydatif engendré par le stress hydrique, il y a une activation des systèmes antioxydants enzymatiques (**Flexas et al., 2006**), ou encore l'intervention de systèmes non enzymatiques tels que les composés phénoliques.

L'objectif de notre travail est de comparer le comportement des deux espèces végétales : le triticale, et l'orge sous stress oxydatif généré sous l'effet de stress hydrique par l'étude de quelques paramètres biochimiques tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), malonedialdéhyde (MDA), la glycine bétaine, les protéines, les polyphénols et les flavonoïdes. Cependant, la tolérance des plantes à la contrainte hydrique est fortement corrélée à leur capacité de synthèse des antioxydants (**Reddy et al., 2004**).



Chapitre I :

Etudes

Bibliographiques



I : Revues bibliographiques

1. L'orge (*Hordeum vulgare* L.)

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) appartient à la famille des Poaceae et il est la quatrième culture céréalière mondiale et égyptienne production après les cultures de maïs, de blé et de riz. (Hafez et al., 2016).

L'orge est une plante annuelle de la classe des monocotylédones, qui appartient à la famille des Poaceae et au genre *Hordeum* qui comprend 31 espèces, mais seule vulgare est couramment cultivée, *Hordeum vulgare* est une espèce diploïde (2n=14). Elle a été l'une des premières cultures domestiquées, il y a 10 000 ans dans le croissant fertile du moyen-orient (Baik et Ulrich, 2008).

D'après (Soltner, 2005) on y distingue deux types selon la forme de leur épi:

- ❖ L'orge à 2 rangs ou l'orge distique: a un épi aplati Composé de 2 rangées d'épillets fertiles, un sur chaque axe du rachis, entouré de 4 épillets stériles. Dans ce type existent surtout des variétés de printemps.
- ❖ L'orge à 6 rangs ou orge hexastique : encore appelé exourgeon, à une section rectangulaire, sur chaque axe du rachis les 3 épillets sont fertiles. Dans ce type n'existent pratiquement que des variétés d'hivers.

1.1. L'histoire de l'orge

L'orge (*Hordeum vulgare* L.) fait partie de l'alimentation humaine depuis plusieurs milliers d'années, bien qu'elle soit relativement peu consommée dans notre quotidien. Recueillie un peu partout à l'état sauvage, l'orge semble avoir été cultivée d'abord dans le Turkestan, l'Éthiopie, le Tibet, le Népal et la Chine. Des fouilles effectuées en Égypte, à 100 km du Caire, ont établi qu'on cultivait cette céréale il y a plus de 5 000 ans. Les Hébreux attribuaient à cette céréale un symbole de puissance et une valeur guerrière. On retrouve cette même connotation chez les Égyptiens, les gladiateurs romains et les Vikings. En Amérique, les premières cultures remontent à Christophe Colomb qui, en 1493, avait embarqué des grains au départ d'Europe (Jessica et al., 2017).

L'orge cultivée est originaire de la région du Croissant fertile au Proche-Orient. Elle est issue de l'orge sauvage (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*). On collecta l'orge sauvage déjà vers 48 000 av. J.-C. Au Proche-Orient on trouve des vestiges d'orge sauvage et d'amidonner sauvage (*Triticum turgidum* subsp. *dicoccoides*) de la période vers 21 000 av. J.-C (**Peer, 2013**).

1.2. Origine

L'orge cultivée (*Hordeum vulgare* L) serait originaire de l'Asie mineure, la Transcaucasie, l'Iran et les montagnes du Turkménistan ainsi que deux centres dans lesquels elle s'est secondairement diversifiée (régions montagneuses de la Chine du centre et de l'ouest). Elle fut domestiquée entre 7000 et 6000 ans avant Jésus-Christ, dans la région du « Croissant fertile », (**Vavilov, 1951**).

1.3. Description botanique

L'orge est une plante annuelle au cycle végétatif court, plantée au printemps, et qui sera récoltée avant l'été, le grain est de forme elliptique et de couleur noir ou pourpre. D'un point de vue morphologique le grain d'orge est un caryopse à glumelles adhérentes chez les variétés cultivées. Les glumelles ou enveloppes ne se séparent pas du grain lors du battage (**Andrew .C et al., 2017**).

La plante a une tige cylindrique et creuse, entrecoupée de nœuds là où se forment les feuilles sa hauteur varie de 30 à 120 cm selon la variété et les conditions de culture. L'épi, ou tête, est formé d'épillets attachés aux nœuds par une structure dentelée nommée rachis. Chaque épillet est composé de deux enveloppes contenant l'une une fleur mâle et l'autre une fleur femelle. Les nœuds du rachis pouvant être formés d'un seul épillet ou de trois, l'inflorescence paraîtra avoir deux ou six rangs de grains d'où les noms d'orge à deux ou six rangs (**Holloway et Jeffree, 2017**).

1.4. Classification

Tableau 1 : classification de l'orge *Hordeum Vulgare L.* APG III(2009)

Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Monocotylédones
Clade	Commelinidées
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
S/Famille	Pooideae
Tribu	Triticeae
S/Tribu	Hordeinae
Genre	<i>Hordeum</i>
Espèce	<i>Hordeum Vulgare L.</i>

2. Triticale (*Triticosecale Wittmack*)

Plante d'obtention relativement récente, le triticale est une céréale secondaire, mais dont les surfaces cultivées augmentent régulièrement. Il est cultivé surtout dans l'Union européenne (1er producteur mondial), Cette plante offre l'avantage de combiner les caractéristiques de productivité du blé et la rusticité du seigle. Néanmoins, il a tendance à la germination sur pied en cas de précipitations durant sa maturation et à l'échaudage si cette période est très chaude en raison de son cycle de végétation plus long. C'est la seule céréale créée par l'homme qui est issue d'un croisement entre le blé (*triticum*) et le seigle (*secale*). Il possède une vigueur qui combine la haute teneur en protéines du blé et la richesse en lysine du seigle, (**Benbelkacem, 1987**).

2.1. Historique

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale, selon le CIC, 2017 leur production arrive jusqu'à 2111 millions de tonnes. Parmi ces céréales, Le blé qui occupe la première place pour la production mondiale. En Algérie, cette culture est le plus souvent confrontée à différentes difficultés qui limitent la production. Les conditions climatiques constituent un facteur limitant pour le développement de la production (**Mokabli, 2002**). L'hybridation interspécifique se révèle comme un instrument très utile pour l'amélioration des espèces cultivées de la tribu des Triticeae. Cette technique est très utilisée pour la résistance aux stress abiotiques (**Oetler, 2005**). Le triticales est une espèce artificielle développée et créée par l'homme c'est le croisement du blé (*Triticum spp.*) et de seigle (*Secale cereale L.*). Elle incorpore des allèles favorables provenant des deux espèces progénitrices (blé et seigle), ce qui permet de s'adapter à des environnements moins favorables pour le blé, tout en fournissant une meilleure biomasse. Le premier triticales, infertile, a été développé en 1875 en Écosse (**Stace, 1987**). Plus tard, en 1888, Rimpau a croisé le blé et le seigle hexaploïdes pour développer le premier hybride viable par le biais d'un croisement chromosomique spontané. hybride viable par doublement spontané des chromosomes en Allemagne (**Mergoum et al., 2009**).

2.2. Origine du triticales

Le triticales, qui résulte d'hybridations associant le blé et le seigle, est de création récente. Dans les régions où ces deux céréales étaient cultivées côte à côte ou en mélange (meteil), on a remarqué depuis longtemps l'apparition de rares plantes visiblement issues de la pollinisation accidentelle d'une espèce par l'autre. Ces hybrides de première génération (F1) sont stériles. C'est dans la deuxième moitié du XIXe siècle que biologistes et sélectionneurs commencent à

croiser blé tendre et seigle. La première publication décrivant la réussite expérimentale de cette hybridation date de 1876. Elle est due au botaniste écossais Wilson qui ne fait état d'aucun objectif agronomique et explicite simplement son souci de comprendre les mécanismes de la stérilité des Fl (**Wilson, 1876**). Yvonne et Andre Cauderon : Directeurs de recherches (honoraires) à l'INRA - Membres de l'Académie d'agriculture, 18, rue de Bellechasse, 75007 Paris. Il faudra 12 ans pour qu'un allemand, Wilhelm Rimpau, réussisse à créer la première variété fertile de triticales. Ce n'est qu'après la seconde guerre mondiale, que la culture de triticales se développe. Le nom de triticales provient de la combinaison des noms scientifiques des deux parents : Triticum (blé) et Secale (seigle) (semencemag.fr. D0667 - 2008 - PLDB 5019.) Cependant le nom sur lequel la majorité des auteurs se sont mis d'accord (**BERNARD, 1992 ; CAUDERON, 1981 ; BONJEAN, 1992**) est celui qui souligne la double origine de cet hybride qui combine les noms latins de genre du blé (Triticum) et du seigle (Secale).

Ainsi de (Blé×seigle) on a obtenu Triticosecale Wittmark comme nom scientifique et comme nom commun ils ont gardé triticales avec triti de Triticum et Cale de secale.

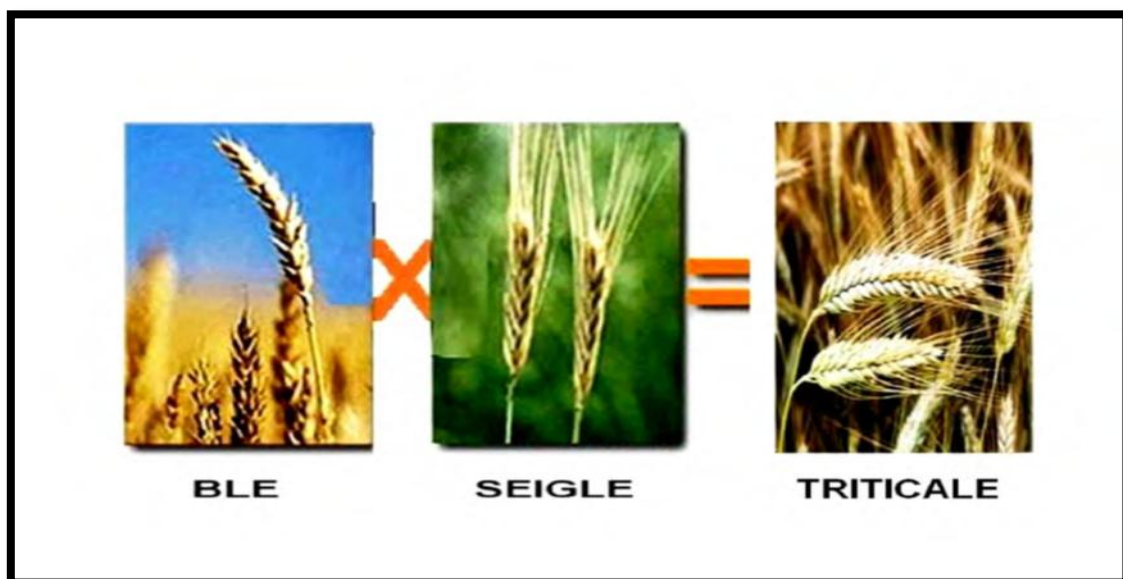


Figure 1 : Création de Triticales (Hammouda, 2013).

2.3. Génétique de triticales

Le triticales est une céréale amphiploïde avec plusieurs compositions génomiques selon le type de blé parent impliqué dans l'hybridation. Le triticales peut avoir des niveaux de ploïdie allant de tétraploïde ($2n = 14 = AARR$); (McGoverin et al., 2011) à l'octoploïde ($2n = 56 = AABBDDRR$); Bien que le triticales octoploïde ait été développé en premier et étudié en profondeur, il n'était pas aussi adapté et productif que le triticales hexaploïde (Oettler, 2005). Le type de triticales le plus couramment cultivé est l'hexaploïde ($2n = 42 = AABBRR$), qui présente une meilleure adaptation et stabilité génomique que le triticales octoploïde.

2.4. Classifications du triticales

Classification APG III (2009)

Tableau 2 : classification de triticales (*Triticosecale Wittmack*)

Règne	Plantae
Clade	Angiospermes
Clade	Monocotylédones
Clade	Commelinidées
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
S/Famille	Pooideae
Tribu	Triticeae
Genre	<i>Triticosecale</i>
Espèce	<i>Triticosecale Wittmack</i>

II. Le stress hydrique et stress oxydatif

1. Notion de stress

Selon **Levitt (1980)**, le terme stress désigne un facteur de l'environnement induisant une contrainte potentiellement néfaste sur un organisme vivant.

D'après **Dutuit et al., (1994)**, le stress est le dysfonctionnement (rupture d'un équilibre fonctionnel) produit dans un organisme ou dans un système vivant, par exemple par une carence. Le stress est donc, un ensemble de conditions qui provoquent des changements de processus physiologiques résultant éventuellement de dégâts, dommages, blessures, inhibition de croissance ou de développement.

On appelle stress toute pression dominante exercée par un paramètre, perturbant le fonctionnement habituel de la plante. En revanche, la réponse du végétal dépend, entre autres, de ces paramètres environnementaux, tels que : le type de contrainte, son intensité, sa durée et caractéristiques génétiques : espèce et génotype (**Hopkins, 2003**).

2. Catégories de stress et conséquences

La plante et la plupart de ses cellules sont directement exposées aux changements des conditions environnementales qui peuvent être de deux natures distinctes:

2.1. Le Stress biotique : Ce terme représente la totalité des paramètres physico-chimiques ou biologiques qui découlent de l'existence de l'action des êtres vivants. Les facteurs biotiques caractérisent donc l'ensemble des influences qu'exercent les êtres vivants entre eux et sur leur milieu (**Ramade, 2003**).

2.2. Le stress abiotique : Il est dû principalement à des facteurs environnementaux comme la sécheresse, les températures extrêmes, excès d'eau et la salinité (**Hopkins, 2003**).

3. Les contraintes abiotiques et leurs effets sur la plante

En milieu variable la plante est le plus soumise à une série de contraintes de nature abiotique qui réduisent sa capacité de reproduction (**Djakoun et Ykhlef, 1996**). Les plus importantes de ces contraintes, suite aux rôles majeurs qu'elles jouent dans les fonctions essentielles de la plante, sont la variation de précipitation, de la température de l'humidité du sol, de l'air ambiant, et de la salinité. Certains stades végétatifs sont particulièrement sensibles à ces contraintes abiotiques, donc les stress se traduisent chez les plantes par des changements morphologiques, physiologiques, et moléculaires qui affectent leur productivité (**Wangxia et al., 2003**).

4. Le stress hydrique

Parmi les nombreux paramètres environnementaux, la sécheresse est le facteur abiotique qui limite le plus les rendements des cultures (**Germ et al., 2016**). Les plantes réagissent principalement de trois manières différentes au stress hydrique :

- ❖ en évitant les périodes où l'eau vient à manquer.
- ❖ en maintenant élevé le potentiel hydrique par différents mécanismes de protection.
- ❖ en maintenant l'activité métabolique lors des périodes de stress hydrique (**Germ et al., 2016**).

4.1. Définition du stress hydrique

Le stress hydrique a été défini comme une baisse de la disponibilité de l'eau, traduisant par une réduction de la croissance de la plante et/ou de sa reproduction par rapport au potentiel du génotype. La contrainte hydrique est le facteur ou l'ensemble de facteurs ayant pour conséquence le stress. D'autres auteurs limitent la définition du stress aux seules conditions correspondant à une hydratation suboptimale des tissus (**Lamaze et al., 1994**).

La sécheresse est un stress environnemental majeur pour les plantes et affecte négativement la croissance et la reproduction. La sécheresse cause des pertes de rendement dans les systèmes de culture (**van Asten et al., 2011**) et ont un impact négatif sur la productivité des communautés végétales naturelles. Le déficit hydrique est une contrainte permanente de la production agricole dans de nombreux pays au climat de type méditerranéen. Elle est à l'origine des pertes de production agricole dans de nombreuses régions. Les risques du manque d'eau sont et deviendront de plus en plus fréquents et persistants, à l'avenir, par suite des changements climatiques causés par l'effet de serre (**Witcombe et al., 2009**). Selon **Passioura,(2004)** définit le déficit hydrique comme étant les circonstances dans lesquelles les plantes accusent une réduction de croissance et de production suite à une alimentation hydrique insuffisante. Le stress hydrique peut se définir comme le rapport entre la quantité d'eau nécessaire à la croissance de la plante et la quantité d'eau disponible dans son environnement, sachant que la réserve d'eau utile pour la plante est la quantité d'eau du sol accessible par son système racinaire.

4.2. Les conséquences du stress hydrique

Le stress hydrique a été défini comme une baisse ou un excès de la disponibilité de l'eau, traduisant par une réduction de la croissance de la plante et/ou de sa reproduction par rapport au potentiel du génotype. La contrainte hydrique est le facteur ou l'ensemble de facteurs ayant pour conséquence le stress. D'autres auteurs limitent la définition du stress aux seules conditions correspondant à une hydratation suboptimale des tissus (**Lamaze et al., 1994**). Le manque d'eau ou déficit hydrique représente le stress abiotique le plus sévère qui engendre des effets physiques, chimiques et physiologiques du stress hydrique dépendent du degré et du temps des conditions de sécheresse en relation avec le stade de développement de la plante (**Hamon, 2007**).

En absence d'humidité suffisante, la graine même si elle est correctement placée dans le sol, elle n'évolue pas, retardant ainsi, la levée de la culture et en

cas de persistance de sécheresse la situation peut se traduire par une absence de levée (**Feliachi et al., 2001**).

4.3. Effet du stress hydrique sur les plantes

La sécheresse affecte le potentiel hydrique des plantes, la diminution de ce dernier perturbe les fonctions de la plante, modifiant les caractères anatomiques, morpho-physiologiques et biochimiques des plantes. Le degré de sensibilité vis-à-vis de ce déficit hydrique, dépend du stade phénologique de la plante, de l'intensité et de la durée de ce stress. Le stress de déficit hydrique ainsi engendré est multidimensionnel et affecte les plantes à différents niveaux de leur organisation, allant des différents compartiments des cellules jusqu'à la plante entière. La diminution de la croissance sous stress de sécheresse a été très étudiée chez certaines plantes à grand intérêt économique, à savoir le riz, le maïs et le blé (**Vurukonda et al., 2016**). De plus, le stress dû à la sécheresse affecte la biodisponibilité et le transport, par l'eau, des nutriments du sol jusqu'aux racines. Le déficit hydrique réduit la taille des feuilles et des tiges, (**Benaceur et al., 2001**). Il provoque aussi leur enroulement qui réduit la transpiration mais aussi l'activité photosynthétique d'où chute du rendement (**Bensalem et al., 1991**). Comme il réduit le nombre des racines principales, leur volume et leur poids sec, Le stress hydrique affecte le métabolisme des composés organiques et provoque une accumulation des sucres et autres composés organiques, (**Zhang et al., 1999**). Toute période de sécheresse se traduit par une forte déshydratation des cellules (**Deraissac, 1992**) et parfois un arrêt de l'activité métabolique (**Nemmar, 1983**).

4.4. Mécanisme de résistance à la sécheresse

La survie de la plante dans des conditions de stress dépend de sa capacité à percevoir le stress, générer et transmettre le signal aux différentes parties de la plante et à initier un ensemble de modifications physiologiques et chimiques (**Ahmadizadeh et al., 2011**). La résistance à la sécheresse est liée à la capacité

d'une variété à développer un nombre élevé de mécanismes d'adaptation et non pas à la présence d'un mécanisme donné. Mentionne qu'elle est la résultante de nombreuses modifications phénologiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques, reflétant différents types d'adaptation (esquive, évitement, et tolérance). D'après **Passioura (2004)**, La tolérance est la stratégie qui permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique. Le maintien de la turgescence lors d'un déficit hydrique permet de retarder la fermeture des stomates, de maintenir le volume chloroplastique et de réduire le flétrissement foliaire. Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance au déficit hydrique interne. Cette tolérance au déficit hydrique interne permet un fonctionnement prolongé de la photosynthèse. Les produits carbonés peuvent alors être utilisés autant pour l'ajustement osmotique que la croissance racinaire. La tolérance à la sécheresse est le résultat de mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires complexes. L'expression de différents gènes et l'accumulation de divers osmolytes tels que la proline, les sucres solubles (l'ajustement osmotique) couplés à un système antioxydant efficace sont souvent les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique. Plusieurs de ces mécanismes ont été caractérisés chez différentes plantes (**Kiani, 2007**). La tolérance exige que l'organisme soit en équilibre thermodynamique avec le stress, ce qui signifie que les conditions qui règnent dans la plante sont en équilibre avec les conditions de l'environnement externe. La tolérance à la sécheresse implique que l'organisme survive à une dessiccation qui n'endommage pas son protoplasme et qu'il conserve la capacité de reprendre une croissance normale lorsque le protoplasme sera réhydraté. (**Temagoult., 2009**).

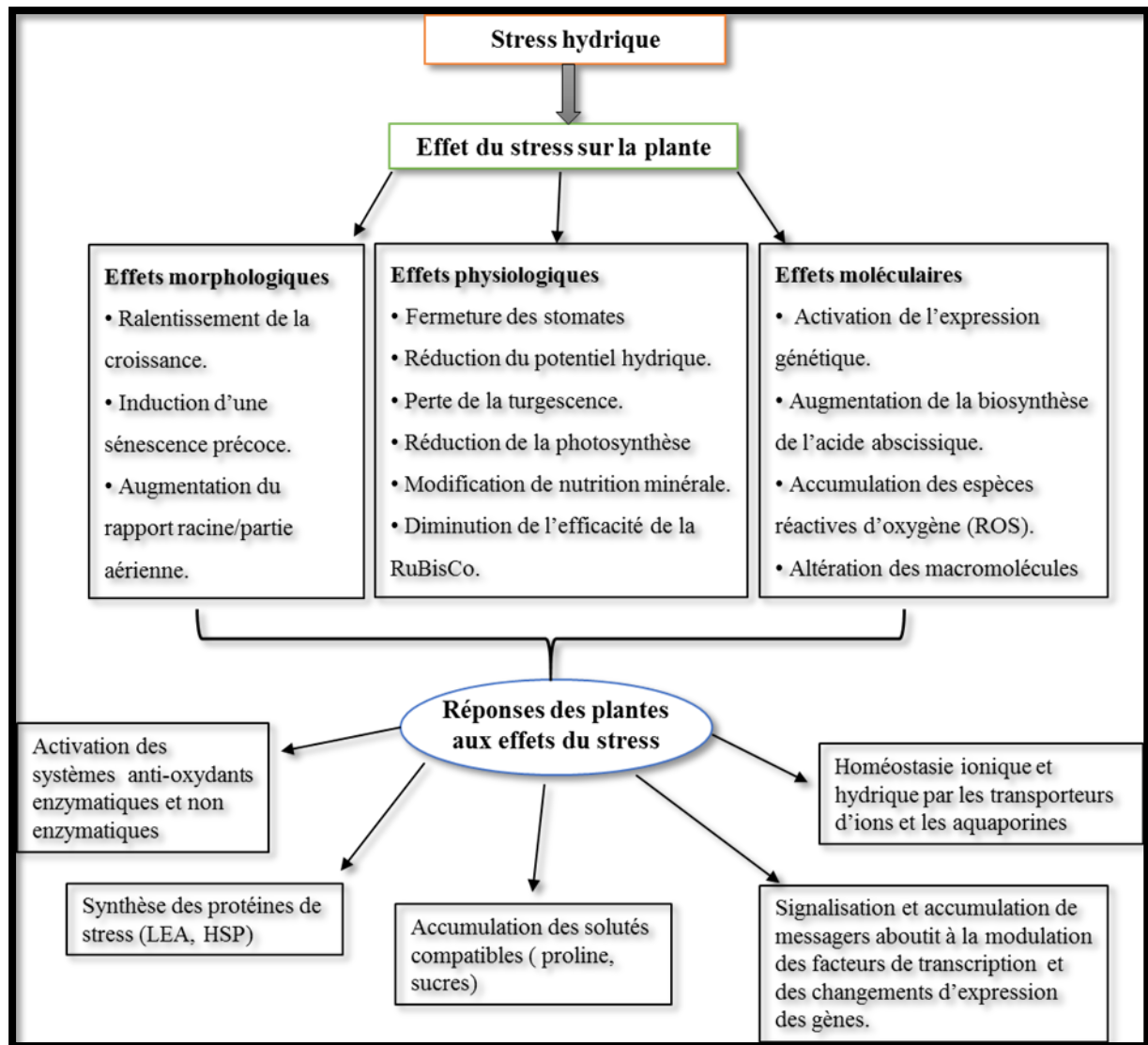


Figure2: Effets morphologiques, physiologiques, moléculaires et les différentes réponses de la plantes soumise à un stress hydrique.

4.5. Mécanisme d'adaptation biochimique en condition du stress hydrique

4.5.1. Rôle du potentiel osmotique (Osmoprotection)

L'ajustement osmotique chez les plantes supérieures se réfère au maintien de la turgescence par abaissement du potentiel osmotique via l'accumulation de solutés en réponse au déficit hydrique (**Guei et Wassom, 1993**). Lorsque le potentiel hydrique foliaire décroît, le potentiel de turgescence, la conductance stomatique et l'activité photosynthétique sont maintenus grâce à l'accumulation

intracellulaire des solutés. L'ajustement osmotique intervient aussi dans le retardement de la sénescence foliaire et dans l'amélioration de l'extraction de l'eau par les racines (**Turner et al., 2001**). L'ajustement osmotique se produit via l'absorption et la synthèse de différents Osmoprotecteurs par la plante.

Le potentiel osmotique peut être maintenu pour un stress hydrique faible ou moyenne Intensité, par ajustement osmotique. Les sucres peuvent servir de composés solubles compatibles pour cet ajustement osmotique, comme de nombreuses autres molécules (glycine bétaine). D'après **Bensari et al., (1990)**. Lorsque contrainte hydrique cesse, la feuille reconstitue les réserves d'amidon et si une nouvelle contrainte hydrique intervient .le temps d'adaptation est plus courte.

4.5.1.1. La glycine-bétaine

La glycine-bétaine (N, N, N-triméthylglycine) est un composé amphotère, électriquement neutre à différents pH physiologiques, extrêmement hydrosoluble mais contient toutefois une moitié non polaire représentée par les trois groupements méthyl. Ses propriétés moléculaires lui permettent d'interagir avec les domaines hydrophiles et hydrophobes des macromolécules comme les enzymes et les complexes protéiques (Sakamoto et Murata, 2002). En condition de stress, la glycine-bétaine est considérée comme l'osmoprotecteur le plus efficace, capable d'améliorer la disponibilité en eau (**Gabbay-Azaria et al., 1998**) et de protéger les enzymes de croissance et de photosynthèse (**Sakamoto et Murata, 2002**). La glycine-bétaine protège aussi les membranes du froid, des hautes températures et du sel et prévient la dissociation des polypeptides extrinsèques du photosystème II (PSII) en présence de hautes concentrations de sel (**Murata et al., 1992**).

5. Le stress oxydatif

5.1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées et aux espèces réactive azotées oxydantes qui vont s'attaquer aux membranes cellulaires , aux protéines et à l'ADN (**Peltier et al., 2004**) .Un stress oxydatif peut être induit par le stress abiotique (cas d'un stress salin ou d'un stress hydrique) , (**Deng et al., 2012**) ou par des stress biotiques (**Gratao et al., 2005**).

Il résulte d'un déséquilibre entre la production d'espèces actives de l'oxygène EOA et les défenses antioxydantes.

A faible concentration, les EAO interviennent comme des promoteurs de la croissance et de développement de la plante. A forte dose, ils causent la sénescence et la mort cellulaire (**Deng et al., 2012**). L'intensité du stress est déterminée par le taux des EOA se trouvant au niveau cellulaire (efficacité du système antioxydant). Il a été démontré que les balances entre la production et la détoxification des radicaux libres oxygénés dépendent du degré de tolérance des génotypes aux stress abiotique (**Liu et Zhang, 2004**). Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système pro-oxydant, et est alors à l'origine d'un stress oxydant (**Favier, 2003**).

Il semble que la vraie origine d'un stress oxydant ne soit pas la génération d'ERO elle-même, mais le déséquilibre spatiotemporel entre la production d'ERO et leur élimination (**Morel, 2007**).

5.2. Classification des marqueurs du stress oxydatif

La mise en évidence du phénomène de stress oxydant cellulaire constitue un défi pour le scientifique dans la mesure où les ERO sont des espèces à très courte durée de vie. Le marqueur "idéal" la fois sensible (montrer une variation à chaque période de stress reproductible) (**Powers et Jackson, 2008**).

Aucun des marqueurs ne possède toutes ces caractéristiques, C'est pourquoi les scientifiques utilisent fréquemment une combinaison de marqueurs.

A l'instar d'une recherche d'agent pathogène, on peut faire une première dichotomie entre les marqueurs directs, autrement dit les ERO, et les marqueurs indirects, révélant une trace de leur passage. Les marqueurs indirects sont représentés soit par les produits d'oxydation des ERO, soit par la réserve d'antioxydants de la cellule (**Powers et Jackson, 2008**) (Tableau 3).

Tableau 3: Classification des principaux marqueurs de stress oxydant (Powers and Jackson, 2008)

Marqueurs directs	Marqueurs indirects : produits d'oxydation	Marqueurs indirects : antioxydants
<ul style="list-style-type: none"> •O₂ •HO° •H₂O₂ •NO₃⁻ 	<ul style="list-style-type: none"> •Lipoperoxydation: Fluidité membranaire (par RPE + sonde), MDA, soprostanes, Alcanes expirés. •Oxydation de l'ADN : 8OH-dG •Oxydation des protéines : carbonyles protéiques •Modification du status rédox: rapport GSH/GSSG 	<ul style="list-style-type: none"> •Ascorbate (vit C) •α- Tocophérol (vit E) •SOD, GPX, CAT •PON1 •Capacité antioxydant totale

5.3. Définition des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS) sont des dérivés de l'oxygène où certains électrons se trouvent dans un état énergétique excité et très réactionnel. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants et la cause majeure du stress oxydatif dans ces derniers (**Valko et al., 2007**).

Ce sont soit des espèces actives radicalaires de l'oxygène tels que le radical superoxyde (O₂•⁻), le radical hydroxyle (OH•), les peroxydes (ROO•) ou les alkoxydes (RO•), soit des espèces actives non radicalaires de l'oxygène, comme l'oxygène singulet (1O₂), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou l'ozone (O₃). Les

premières dérivent de l'oxygène par des réductions monoélectroniques, alors que les dernières dérivent de l'oxygène et peuvent être des précurseurs de radicaux (Krieger-Liszkay, 2005).

5.3.1. Radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairier son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux.

La présence d'un électron célibataire confère aux radicaux libres une grande réactivité et ils peuvent être aussi bien des espèces oxydantes que réductrices. Cette instabilité rend difficile leur mise en évidence au niveau des différents milieux biologiques (Bonfont-Rousselot et al., 2003) (Tableau 4).

Tableau 4 : Espèces réactives de l'oxygène radicalaire et non radicalaire (Halliwell, 2006).

ERO (radicalaire)	Formule chimique
Oxygène moléculaire	$^3\text{O}_2$
Dioxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion superoxyde	$\overset{\ominus}{\text{O}}_2^-$
Radical hydroxyle	$\overset{\bullet}{\text{O}}\text{H}$
Radical hydroperoxyde	HOO^\bullet
Radical peroxyde	ROO^\bullet
Radical alkoxyde	RO^\bullet
Radical oxyde nitrique	NO^\bullet
Peroxinitrite	ONOO^\bullet
ERO (non radicalaires)	Formule chimique
Hydroperoxyde	ROOH
Hypochlorite	ClOH
Ozone	O_3
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2

➤ **Les sources des radicaux libres**

Les principales espèces réactives oxydantes sont dérivées de l'oxygène et de l'azote, et peuvent être produites par le métabolisme cellulaire normal tout comme pathologique ou par exposition environnementale (ex: tabagisme, ozone, température, corporelle...) (**Bloomer, 2008**).

- **Source de production endogène** : NADPH oxydase et xanthine oxydase sont les principales sources endogènes (**Ouahrani et al., 2016**).
- **Chaîne mitochondrial de transport d'électron** : Nécessite l'utilisation de 4 complexes, l'oxygène est converti par le superoxyde dismutase dans la matrice mitochondriale en H_2O_2 , ce dernier est réduit en H_2O et O_2 le H_2O_2 réagit avec les métaux pour former le radical hydroxyle $^{\circ}OH$ (**Kevin et al., 2005**).
- **Xanthine oxydase** : C'est une enzyme impliqué dans le métabolisme des purines est la principal source de stress oxydant (**Wulf, 2002**), cette forme est générée par la modification post traductionnelle de la XDH. Elle est incapable d'utiliser le NAD^+ comme accepteur d'électrons, elle nécessite l'utilisation de l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, produisant ainsi l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (**khiter, 2019**). La XO catalyse aussi la réduction du nitrate en nitrite et NO^{\bullet} (**Terpolilli et al., 2012**).
- **Les sources exogènes** : tel que le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactifs chimiques, les solvants industriels et la pollution (**Paster, 2005**).

5.3.2. La formation des espèces réactives de l'oxygène

Le métabolisme chez les végétaux produits à l'état physiologique plusieurs variétés d'ERO. Dans le cas d'un stress oxydatif, tous les ERO ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Parmi les radicaux formés chez les végétaux on distingue (**Smirnof, 2005**) (Figure3).

- ✓ Anion superoxyde (O_2^-).
- ✓ Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)
- ✓ Radical hydroxyle (HO)

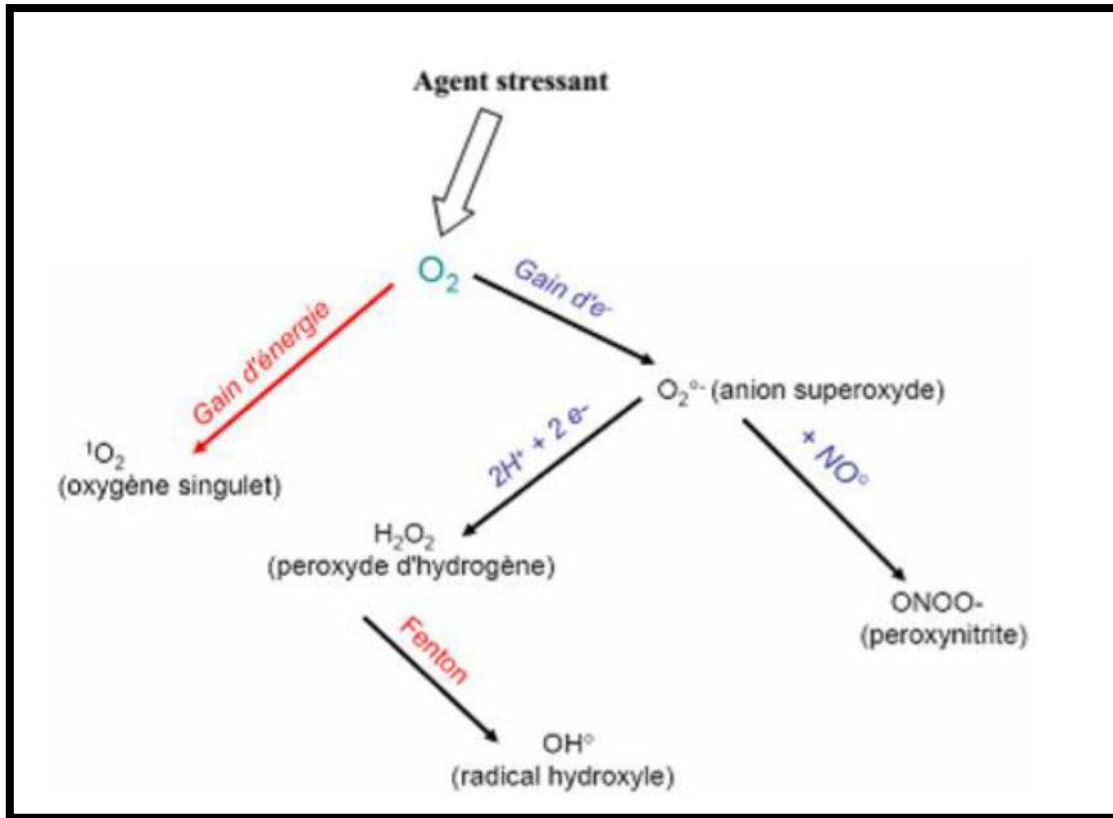


Figure 3: Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et ERO (Amara, 2007).

5.3.2.1. Anion superoxyde (O_2^-) :

La source principale de la production de l'anion superoxyde est la chaîne respiratoire mitochondriale. Il résulte de l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire qui est catalysée par le cytochrome oxydase réaction (1).

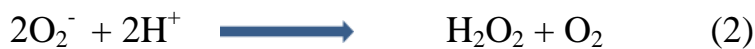


5.3.2.2. Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :

Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , également appelée dioxyde de dihydrogène ou eau oxygénée est très soluble dans l'eau, pénètre facilement les membranes biologiques, et peut provoquer la dégradation des protéines, la libération de Fe^{3+}

l'oxydation de l'ADN, de lipides, ou encore de thiols, mais également l'inactivation d'enzymes. Sa capacité à traverser les membranes biologiques et à diffuser loin de son lieu de synthèse, fait du peroxyde d'hydrogène une des composantes utilisée par les cellules dans la signalisation intra et /ou intercellulaire. En effet, en faible concentration, il ne présente pas de toxicité pour la cellule. Cependant, en forte concentration, il induit une cytotoxicité par le biais des ROS qu'il génère. En se décomposant en anions hydroxyles et en radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton en présence de sels métalliques (Fe^{2+} et Cu^+), il devient toxique. La combinaison de l'anion superoxyde avec deux protons (H^+) conduit à la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Le H_2O_2 n'est pas un radical libre mais une molécule avec tous ses électrons appariés qui présente une toxicité par l'intermédiaire des réactions de type Fenton (réaction 3) (présence de cations métalliques comme Fe^{2+} ou Cu^{2+}) (Wardman et Candeias, 1996).



5.3.2.3. Radical hydroxyle ($\text{}^\circ\text{OH}$)

Le radical hydroxyle ($\text{}^\circ\text{OH}$) est très réactif, il se forme soit par la dégradation du peroxyde d'hydrogène en présence de métaux de transition sous leur forme réduite (réaction 3), ou par son action avec le radical superoxyde selon la réaction de Haber Weiss (réaction 4).



5.3.3. Sources des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale

Chez les plantes, il existe plusieurs sources cellulaires d'espèces réactives de l'oxygène localisées à divers endroits de la cellule, et qui sont produites de façon

permanente durant le métabolisme normale et durant les périodes de stress. Ces sources incluent:

- Les chaînes de transport d'électrons (CTE) des chloroplastes.
- Les chaînes de transport d'électrons (CTE) des mitochondries.
- La photorespiration dans les peroxysomes.
- Les molécules photosensibilatrices comme la chlorophylle.

Tableau 5 : Origine et localisation des ERO (Smirnoff ; 2005)

Origine	Localisation	ERO
Photosynthèse, PSI ou PSII	Chloroplaste	O ₂ [°]
Respiration (transport d'électrons)	Mitochondrie	O ₂ [°]
Glycolate oxydase	Peroxysome	H ₂ O ₂
Chlorophylles excitées	chloroplaste	O ₂ [°]
NADPH oxydase	Membrane cellulaire	O ₂ [°]
β-oxydation des acides gras	Peroxysome	H ₂ O ₂
Oxalate oxydase	Apoplaste	H ₂ O ₂
Xanthine oxydase	Peroxysome	O ₂ [°]
Peroxydases, Mn ²⁺ et NADH	Membrane cellulaire	H ₂ O ₂
Amine oxydase	Apoplaste	H ₂ O ₂ , O ₂ [°]

5.4. Conséquence du stress oxydatif dans la plante

Aux cours du stress oxydant, les ERO sont des molécules très réactives et certaines d'entre elles, telles que le H₂O₂, Qui peuvent même diffuser à travers les membranes (**Bérubé et al., 2000**). Alors, les ERO peuvent causer de graves dommages à des composantes importantes de la cellule. Les cibles des ERO sont principalement les protéines, les lipides membranaires ainsi que L'ADN (**Perez et al., 2000**). La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère

cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (**Favier, 2003**).

5.4.1. La peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides est considérée comme le processus le plus dommageable qui se produit chez tous les organismes vivants. L'altération de la membrane est l'inducteur du niveau de destruction des lipides sous différentes contraintes. Les produits de la peroxydation lipidique (LPO) sont formés à partir des acides gras polyinsaturés. Parmi ces produits il y a le MDA, le 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) et d'autres qui leurs dérivent (**Moller et al., 2007**). La LPO a lieu au niveau des membranes cellulaires et des organites lorsque le niveau des ROS dépasse un certain seuil, ce qui affecte non seulement le fonctionnement cellulaire normal, mais aggrave aussi le stress oxydatif par la production de radicaux dérivés de lipides (**Yadav et al., 2010**). La LPO a des conséquences multiples sur les cellules des plantes .Elle provoque:

- ✓ Des dommages aux protéines membranaires.
- ✓ Une diminution de la fluidité de membrane.
- ✓ Une augmentation de la charge négative de la surface permettant aux phospholipides les échanges entre les deux moitiés de la bicouche lipidique.

L'ensemble du processus de LPO comporte trois étapes distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison (**Fam et Morrow, 2003**).

5.4.2. Marqueurs de la lipoperoxydation

Le dosage du malondialdéhyde (MDA), ou des substances réagissant à l'acide thiobarbituriques (TBARS) est utilisé depuis les années cinquante pour estimer la peroxydation des lipides dans les membranes et les systèmes biologiques (**Rousselot et al.,2003**). Le MDA est formé à partir d'une auto-oxydation et d'une dégradation enzymatique des acides gras polyinsaturés dans les cellules, lors d'un stress oxydatif. Le dosage permet donc de mettre en évidence les stress

environnementaux pouvant induire une variation de ce niveau d'oxydation des lipides.

5.4.3. Oxydation des protéines

Les ERO sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les protéines les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphydryle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport (**Stadtman et Levine, 2000**). Ces réactions fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} , peuvent provoquer:

- ✓ des cassures au niveau des liaisons peptidiques en modifiant la chaîne protéique.
- ✓ des modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique (tels que le MDA et le HNE)
- ✓ des insertions des radicaux libres directement sur les groupements d'acide aminés des protéines (**Shringarpure et Davies, 2002**).

L'oxydation des protéines dans la plupart du temps est irréversible sauf lorsqu'il s'agit des acides aminés contenant du soufre (**Ghezzi et bonetto, 2003**).

6. La relation entre stress hydrique (environnemental) et stress oxydatif

Selon **Abdellaoui et al., (2016)** Une conséquence du stress hydrique est l'apparition d'un stress oxydatif qui se définit comme le résultat d'un déséquilibre entre la balance des espèces réactives d'oxygènes (ERO) et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule. Un des mécanismes de défense est le développement d'un système de défense antioxydant, qui inclut les enzymes antioxydants dont le superoxyde-dismutase (SOD), la catalase (CAT), le gaïacol peroxydase (GPX), l'ascorbate peroxydase, etc. L'autre système antioxydant non enzymatique inclue le glutathion, l' α -tocophérol, la vitamine C, les

caroténoïdes et les composés phénoliques. L'effet dépressif sur la photosynthèse résulte d'une baisse de la conductance stomatique, d'une altération de l'appareil photosynthétique et/ou d'une diminution de la surface foliaire et une diminution de la concentration interne en CO₂ de la feuille et une réduction de la photosynthèse (**Bennaceur et al., 1999**). Lors d'un stress salin ou hydrique, l'inhibition de la photosynthèse, et plus précisément la fuite d'électrons due la diminution de la fixation du CO₂, entraîne une forte accumulation d'espèces réactives de l'oxygène(ERO), et les peroxydases (POD) qui sont des enzymes jouant un rôle important dans le métabolisme et la physiologie de la plante. Elles sont présentes dans tous les tissus des végétaux et sont impliquées dans les réponses des plantes aux infections et aux stress abiotiques (**Benkaddour, 2014**). Le stress hydrique conduit à un stress oxydatif par production des espèces oxygènes réactives particulièrement le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène (**Zarrad et al.,2009**).

7. Les antioxydants

7.1. Définition

Les molécules ou microconstituants capables d'interférer avec les radicaux libres sont appelés antioxydants. Un bon antioxydant se devra de respecter quelques critères (**Valko et al., 2006**).

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme "antioxydant" englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (**Shimizu, 2004**). Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques des ERO (**Vansant, 2004**).

Selon (Valko *et al.*, 2006), un antioxydant devrait à la fois:

- ✓ Être capable de piéger directement et spécifiquement les radicaux libres.
- ✓ Chélaterdes ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^{+} d'importance biologique capables de promouvoir la production de radicaux libres par la réaction de Fenton.
- ✓ Interagir avec d'autres antioxydants, et, dans la mesure du possible, les régénérer.
- ✓ Avoir un effet positif sur l'expression génique.
- ✓ Être rapidement absorbé.
- ✓ Avoir une concentration qualifiée de « physiologique » dans les tissus et les fluides biologiques.
- ✓ Être efficace en milieu aqueux et/ou dans le milieu membranaire.

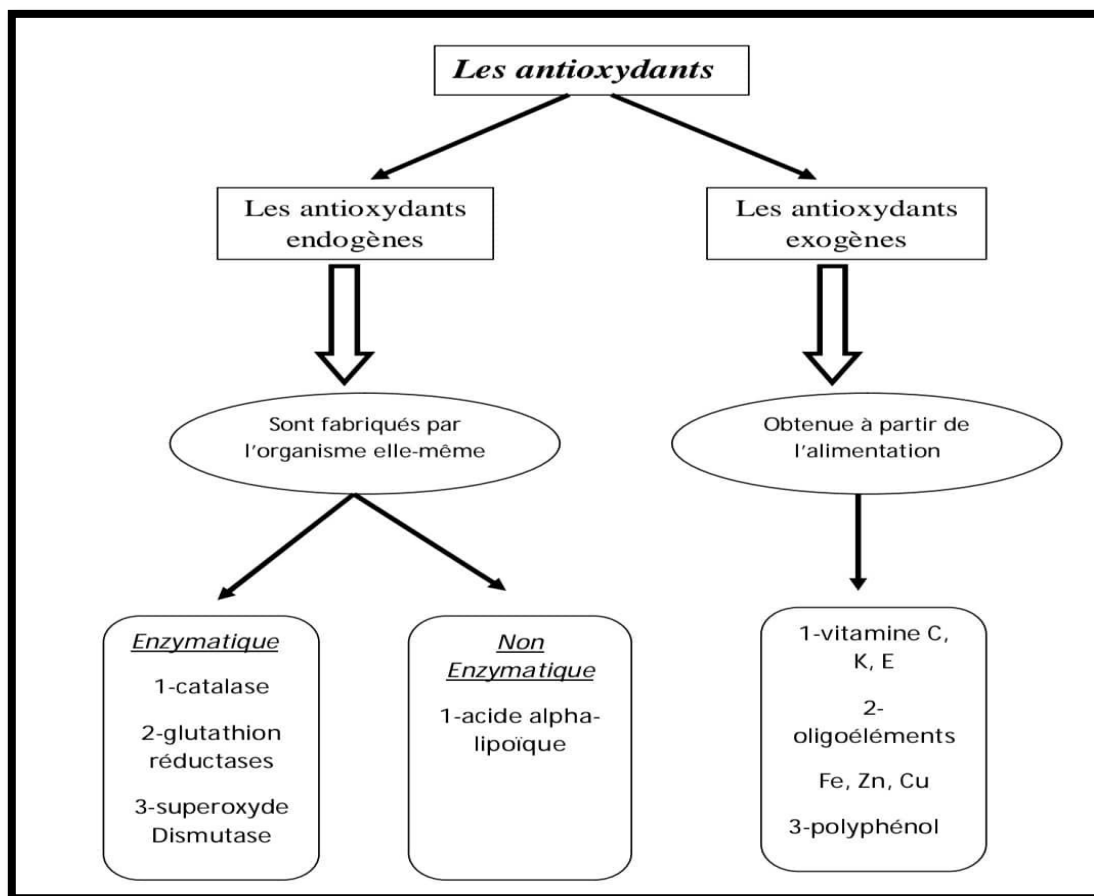


Figure 4 : Les différents types des antioxydants (Bartosz G, 2003).

7.2. Les systèmes antioxydants

La plante a développé un système de défenses antioxydantes (de type enzymatiques et non enzymatiques) (Figure 5) afin d'assurer la détoxification et la fixation des EOA (Joseph et Jini, 2011).

Ce système est activé par les fortes concentrations de ces radicaux oxygénés au niveau cellulaire (Ahmadizadeh et al., 2011).

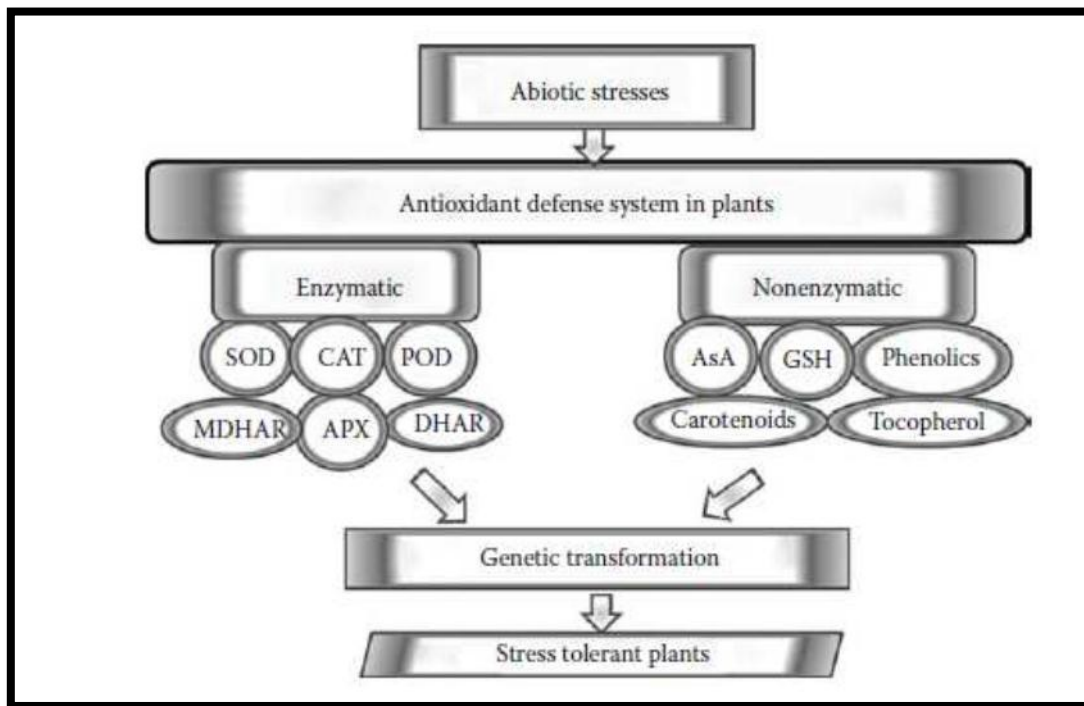


Figure 5 : Système de défense antioxydant : les composants enzymatiques et non enzymatiques (Joseph et Jini, 2011).

Il existe un très grand nombre de molécules anti oxydantes. Elles peuvent être biologiques (endogènes) ou bien apportées par l'alimentation (exogène).

7.2.1. Systèmes antioxydants endogène (enzymatiques)

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et le glutathion peroxydase (GSH-Px) (**Sharma et al., 2012**).

-Le rôle majeur du superoxyde dismutase est de catalyser la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire.

-La catalase essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

-L'activité du glutathion peroxydase, ou GPx, est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique en couplant la réduction de l'hydroperoxyde avec l'oxydation d'un substrat réducteur (**Delattre, 2005**).

7.2.2. Systèmes antioxydants exogènes (non enzymatique)

Les antioxydants chimiques exogènes eux, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (**McCall et Frei, 1999**). Le système antioxydant non enzymatique joue un rôle important dans les défenses antioxydantes. Il est à noter que les enzymes antioxydantes deviennent inactives dès le démarrage de la sénescence. Donc, un système antioxydant non enzymatique performant améliorera la tolérance de la plante vis-à-vis du stress. D'un autre côté, l'accumulation des molécules antioxydantes permettra de protéger les enzymes antioxydantes des dégâts causés par les radicaux hydroxyles (**Deng et al., 2012**). L'accumulation des osmolytes dans les cellules soumises à un stress est associée à la mise en marche de mécanismes de tolérance aux effets néfastes du déficit hydrique (**Pirzad et al., 2011**).

8. Polyphénols

Le terme polyphénol a été introduit en 1980 (**Dave-Oomah B., 2003**). Les composés phénoliques ou polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présente dans le règne végétal, ce sont des métabolites secondaires (**Boizot et Charpentier., 2006**), qui jouent soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, elles varient depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (**Macheix et al., 2005**).

8.1. Structures chimiques et classification

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient. On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes (**Boros, 2010**). En plus de cette diversité, les phénols sont présents naturellement sous forme conjuguée : avec des sucres, des acides organiques, entre eux. Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes (figure 6)

- Les phénols simples (C₆): un seul noyau phénol comme pour les acides phénoliques (C₆-C₁).
- Les flavonoïdes (C₆-C₃-C₆): 2 noyaux aromatiques reliés par un hétérocycle oxygéné.
- Les tanins hydrolysable et non-hydrolysable.
- Les stilbènes (C₆-C₂-C₆).
- Les lignanes, les lignines et les coumestanes : 2 unités de phénylpropane.

- Autres phytoestrogènes
- Les saponines (triterpénoïdes)
- Les phytostérols et les phytostanols (Paraskevi, Moutsatsou, 2007). Bien qu'ils ne soient pas des polyphénols, on ajoute ordinairement à cette liste les isothiocyanates, qui dérivent de l'hydrolyse des glucosinolates (Dacosta, 2003).

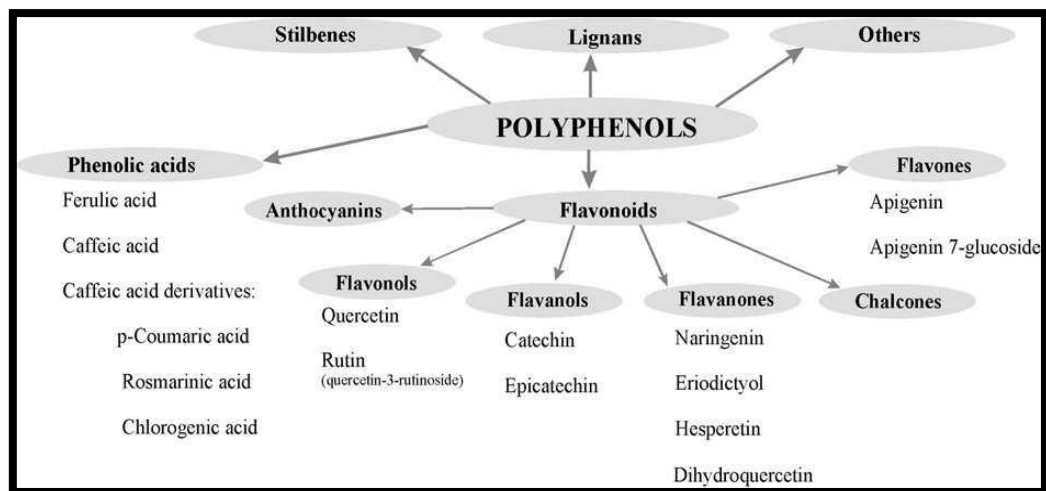


Figure 6 : Classification des polyphénols avec exemples pour chaque classe (Boros et al., 2010)

8.2. Les polyphénols comme antioxydants

Les principaux mécanismes d'activité anti oxydante sont:

- ❖ Le piégeage direct des EOR.
- ❖ L'inhibition des enzymes impliquées dans le stress oxydant et la chélation des traces métalliques responsables de la production des EOR.
- ❖ La protection des systèmes de défense antioxydants (Halliwell, 1994).

8.3. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6.000 composés naturels très répandus dans le règne végétal (**Ghedira, 2005**). Ils sont parmi les métabolites secondaires les plus réactifs dans les plantes. Ils se trouvent généralement dans les feuilles, les parties florales et les pollens.

Les flavonoïdes assurent plusieurs fonctions telles que la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines, la protection contre les UV et la défense contre les phytopathogènes. Ils jouent également un rôle dans la fertilité des plantes et la germination des pollens et agissent en tant que molécules de signalisation dans les interactions plante-microbe (**Olsen et al., 2010**). La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($\text{OH}\bullet$), anions superoxydes ($\text{O}_2\bullet$) et radicaux peroxylipidiques. Ils inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle ($\text{C}_3\text{-OH}$) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (**Ghedira, 2005**). Des travaux ont montré que les niveaux des flavonoïdes augmentaient dans les cas de stress biotique et abiotique, tels que le stress hydrique, la toxicité aux métaux et la privation de nutriments (**Winkel-Shirley, 2002**).

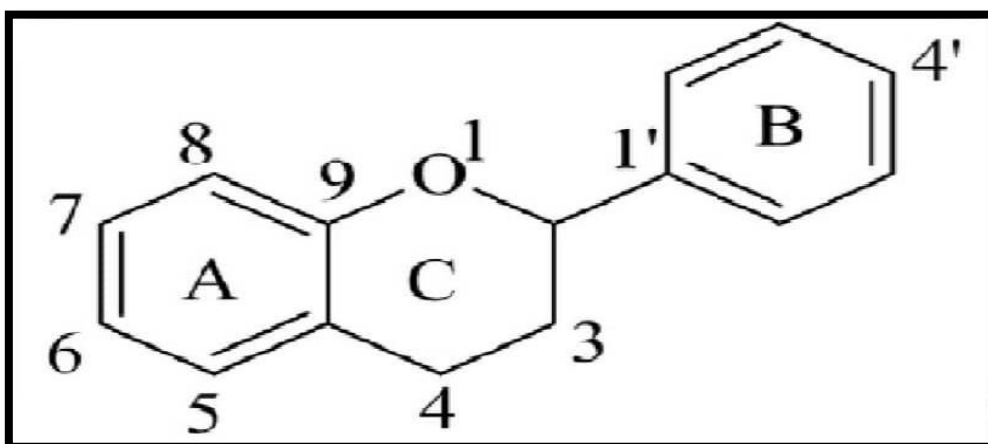


Figure 7 : Structure de base de flavonoïdes (**Karabin, 2015**).

8.4. Propriétés antioxydants des flavonoïdes

Parmi les antioxydants secondaires obtenus à partir de l'alimentation on a les Polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes.

Les activités antioxydantes des flavonoïdes sont déterminées par leur structure chimique, en particulier l'état d'hydroxylation aromatique de leurs anneaux. Il a été démontré que l'activité antioxydant est en relation avec les flavonoïdes contenant un cycle phénol B. Les groupes hydroxyle en C3' et C4' positions sur le squelette flavane sont les principaux déterminants structuraux des activités antioxydantes des flavonoïdes. Puis les groupes hydroxyle en positions C3 et C5, ainsi que le groupe carbonyle en C4 (Karabin *et al.*, 2015).

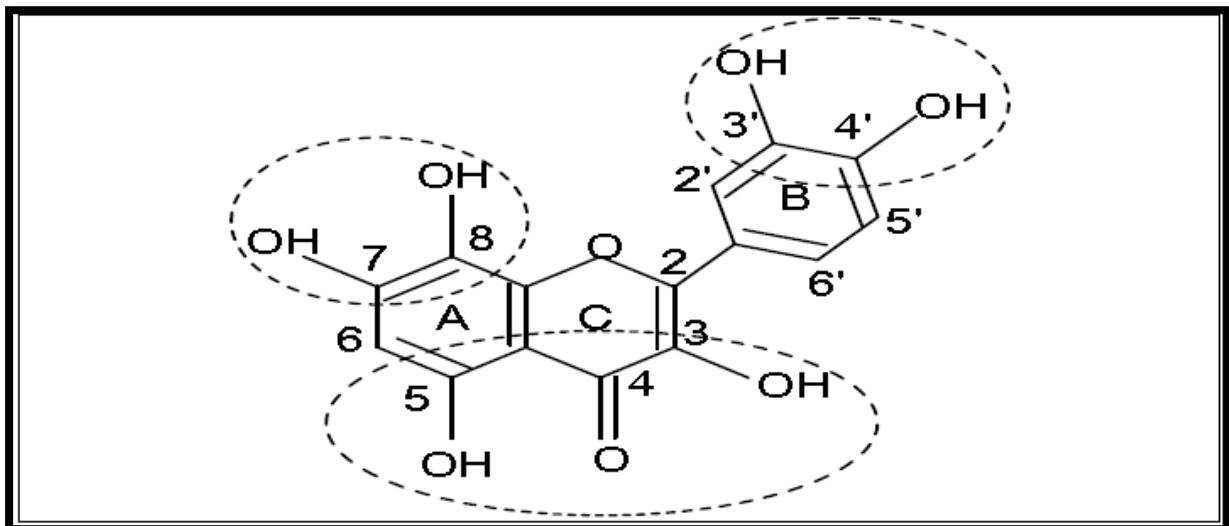


Figure 8 : Caractéristiques structurales des flavonoïdes avec une activité de piégeage des radicaux libre (Zeghad et Merghem , 2013).

Les flavonoïdes sont capables de piéger les radicaux libres en formant des radicaux flavoxy les moins réactifs, cette capacité peut être expliquée par leur Propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle selon la réaction représentée ci-dessous:



Cette réaction de piégeage donne une molécule stable (RH) et un radical flavoxyle (FLO•) ce dernier va subir un changement de structure par résonance; redistribution des électrons impaires sur le noyau aromatique pour donner des molécules de faible réactivité par rapport aux R•; en outre les radicaux flavoxyles peuvent interagir entre eux pour former des composés non réactifs (**Amić et al., 2003**).

$\text{FLO}\cdot + \text{R}\cdot \longrightarrow \text{FLO-R}$ (réaction de couplage radical-radical)

$\text{FLO}\cdot + \text{FLO}\cdot \longrightarrow \text{FLO-OFL}$ (réaction de couplage radical-radical)

Les composés phénoliques (Ph), et en particulier les flavonoïdes, sont des métabolites secondaires des plantes caractérisés par une structure commune de type 2-phénylbenzopyrane. Leur capacité antioxydante réside dans leur faculté à « terminer » les chaînes radicalaires par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons, et à chélater les ions des métaux de transition capables de catalyser la peroxydation lipidique (**Leopoldini et al., 2011**).

De façon générale, l'activité biologique des flavonoïdes est fortement dépendante de la nature et de la position des substituants, en particulier du nombre de groupements hydroxyles (**Schroeter et al., 2002**).



Chapitre II :

Matériel

Et

Méthode



1. Matériel végétal

Le matériel végétal choisi sont deux espèces céréalières de différentes origines, le triticale et l'orge. Les semis ont été faites le 20/02/2022, on a mis les graines de chaque espèces dans le coton pour accélérer la germination. Lorsque les plantes ont atteint une longueur de 20 à 30 cm on a séparé chaque espèce en deux blocs, premier bloc témoin et le deuxième on lui a fait subir un stress hydrique pendant une période de 10 jours.

Tableau 6 : L'origine des deux espèces étudiées : l'orge et triticale.

Espèce	Origine	Variété
Orge	Algérie (Saida)	Saida 183 G1
Triticale	Chelia	Juaonllo 159 G2



Figure 9 : Triticale témoin



Figure 10 : Orge témoin



Figure 11: Orge et Triticale stressées.

2. Mise en Expérimentations

2.1. Dosage de la glycine bétaine:

0,5 g du matériel végétal sec finement broyé, on a ajouté 20 ml d'eau distillé, la solution obtenue a été incubée pendant 48h à 25°C. Les échantillons sont ensuite filtrés et le filtrat est stocké au congélateur jusqu'à l'analyse. Les extraits décongelés ont été dilués 1: 1 avec de l'acide sulfurique 2 N. 0,5 ml de la solution obtenue a été refroidie dans l'eau glacée pendant 1 h. Le réactif KI-I2 (0,2 ml) a été ajouté et le mélange a été doucement agité avec le vortex. Les échantillons ont été stockés à une température de l'ordre de 0-40°C pendant 16 heures. Ensuite, les échantillons ont été transférés dans des tubes pour les centrifuger à 10000 g pendant 15 minutes à 0 ° C. Le surnageant est aspiré avec précaution avec micropipette. Comme la solubilité du complexe augmente nettement avec la température, il est important que les tubes soient maintenus jusqu'à ce que le complexe froid soit séparé du milieu acide. Le culot est dissous dans 9 ml de 1,2-dichloro éthane (réactif). Premier lavage avec 0,5 ml et laisser 5 minutes. Mélanger les tubes avec le vortex pour effectuer une solubilité complète dans solvant. Après 2h, l'absorbance a été mesurée à 365 nm avec spectrophotomètre UV-visible (Gieve et Grattan ,1983). Les standards de la glycine bétaine (50-200 pg/ml) ont été préparés dans de l'acide sulfurique 2 N et la procédure pour l'estimation l'échantillon a été suivie.

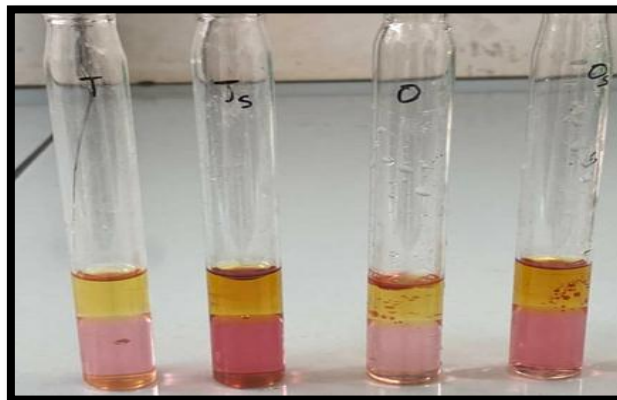


Figure 12: Dosage de glycine bétaine

2.2. Dosage de malondialdéhyde MDA (Hernández et Almansa, 2002)

- 50mg de poids secs de feuilles sont broyées dans un mortier-pilon broyés puis homogénéisés dans 2 ml d'acide Trichloracétique (TCA) à 1%.
- L'homogénat est centrifugé à 15000 g pendant 10 min à 4°C.
- 0.6ml du surnageant.
- 1.60-ml d'acide Thio barbiturique (TBA) préparé dans du TCA à 20%.
- Les échantillons ont été incubés à 90°C pendant 20 min .

Après l'arrêt de la réaction dans la glace:

- Les échantillons sont centrifugés à 10000 g pendant 5 min.
- La D.O est lue à 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- La concentration du MDA est déterminée en utilisant le coefficient d'extinction 155 /Mm/cm

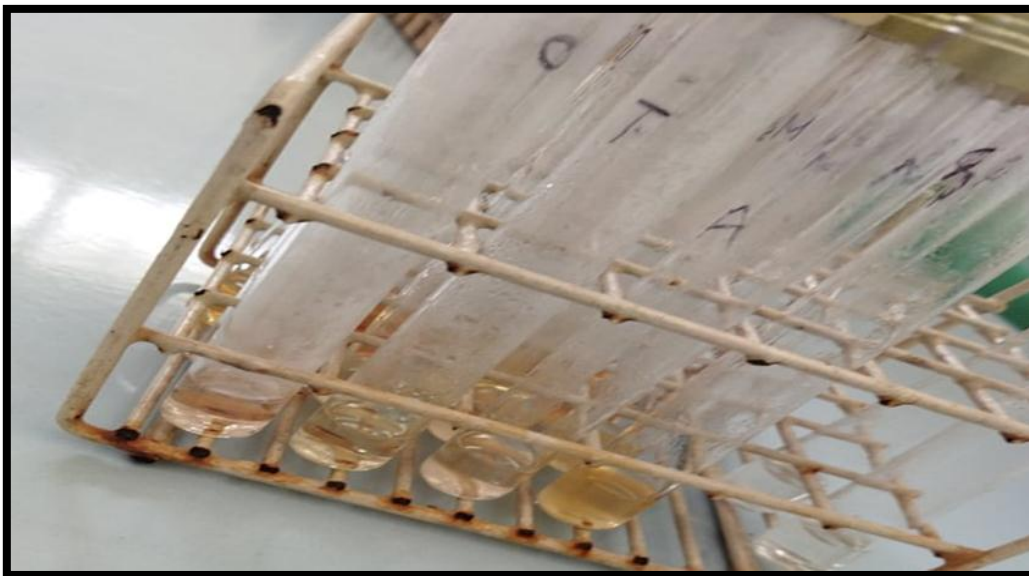


Figure 13: dosage de MDA

2.3. Dosage de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Loreto et Velikova, 2001)

- La solution végétale (0.1 g de feuilles et 5 ml d'acide Trichloracétique TCA à 10%).
- La solution végétale est broyée dans un bain à glace. L'homogénat est centrifugé à 12000 g pendant 15 min.
- 0.5ml du surnageant sont mélangés à 0.5 ml de régulateur (phosphate de potassium (KOH) et 1 ml d'iode de potassium (KI).
- La D.O est lue à 390 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- La concentration du H₂O₂ est déterminée en utilisant l'équation suivante :
DO / 0.04.



Figure 14: dosage de H₂O₂

2.4. Dosage des protéines :

- **Extraction** : 0,25 g de feuilles fraîches a été homogénéisé dans 5 ml. (50 mM) de tampon phosphate de potassium (pH 7,8) dans un bain de glace et centrifugé le mélange à 12 000 g pendant 20 minutes à 4 °C. Le surnageant a été séparé en vue de la détermination des protéines solubles totaux et des acides aminés libres (**Anika et al., 2018**).
- **Dosage des protéines** : Les protéines ont été estimées selon la méthode de Bradford (1976). Une aliquote 2 ml. Du réactif de Bradford (on homogénéise 100mg de BBC (Bleu Brillant de Commassie) dans 50ml d'éthanol 95°C. On y ajoute ensuite 100ml d'acide ortho phosphorique à 85% et on complète à 1000ml avec de l'eau distillée) et 100 µl. d'échantillon ont été ajoutés dans un tube à essai. Pendant 20 min à température ambiante et l'absorbance lue à 595 nm.

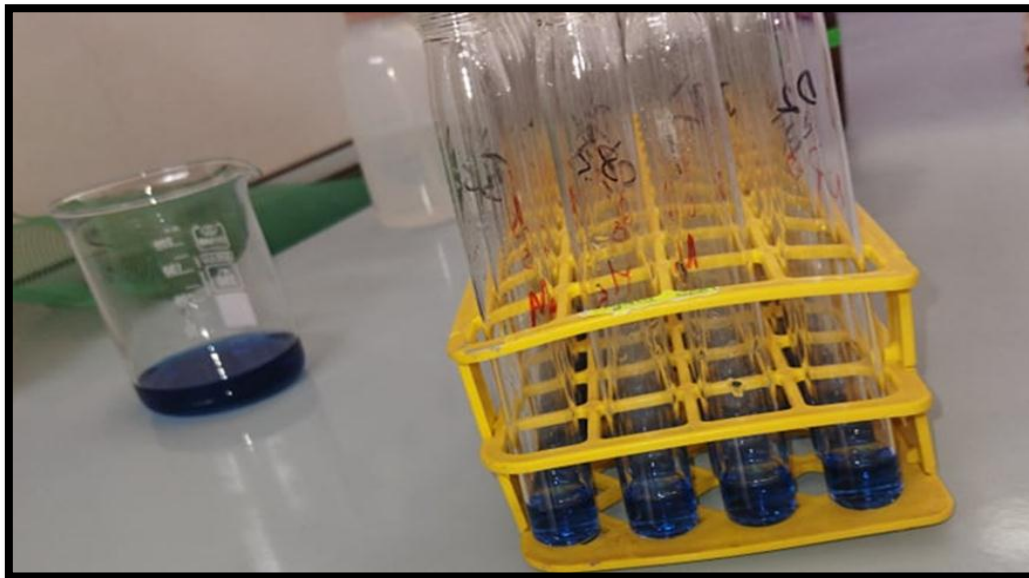


Figure15 : dosage des protéines.

2.5. Dosage polyphénols :

- Le dosage des polyphénols réalisé selon la méthode décrite par **Chandler et Dodds** modifié par **Shety et al., (2004)** a été réalisé sur les feuilles. 100 mg des parties prélevées sont pesés, broyés dans 5 ml d'éthanol à 95°, puis centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse de type MLW à 3000 tours/mn. Le surnageant récupéré a été utilisé pour le dosage des polyphénols.
- La méthode de Folin-Ciocalteu a été choisie pour doser les polyphénols pour les raisons suivantes ; (i) c'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité, (ii) la disponibilité du réactif de Folin et la méthode est bien standardisée, (iii) la grande longueur d'onde (725nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré, (iv) c'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche d'antioxydants des plantes médicinales .
- En milieu alcalin, les polyphénols réduisent l'acide phosphomolybdique du réactif Folin-Ciocalteu. Cette réduction se traduit par l'apparition d'une coloration bleu foncée. (**Ribéreau-Gayon , 1968**).
- A 1mL du surnageant sont ajoutés : 1 ml d'éthanol 95°, 1 ml d'eau distillée, et 500 µL de réactif de Folin ciocalteau à 50 % Après 5 mn de réaction, 1 ml de solution de carbonate de sodium (NaCO₃) à une concentration de 5 % est ajoutée. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-visible 8500) après 60 mn d'incubation à température ambiante. La détermination de la teneur en polyphénols a été faite en se référant à un courbe étalon dressé à partir d'une série de solutions standard d'acide gallique à 1 mg/ml.

2.6. Dosage des flavonoïdes :

L'analyse quantitative des flavonoïdes est réalisée par le dosage spectrophotométrique selon la méthode décrite par (Kim et al., 2003).

- Le dosage des flavonoïdes a été réalisé sur les feuilles. 100 mg des parties prélevées sont pesés, broyés dans 5 mL d'éthanol à 95°, puis centrifugés à l'aide d'une centrifugeuse de type MLW à 3000 tours/mn. Le surnageant récupéré a été utilisé pour le dosage des flavonoïdes.
- Dans des tubes à essai, sont déposés 500 µL de surnageant (dissout dans l'éthanol à raison de 50 mg/2,5 mL d'éthanol), 1500 µL d'eau distillée, et 150 µL de nitrate de sodium NaNO₂ à 5 % (m/v) dans l'eau. Après 5 minutes sont ajoutées : 150 µL de trichlorure d'aluminium AlCl₃ à 10 % (m/v). Après 11 min de réaction, l'addition de 500 µL de soude NaOH (1M) donne une coloration rose qui absorbe à 510 nm. La teneur en flavonoïdes de l'extrait éthanoïque est déterminée par interpolation à l'aide d'un courbe étalon réalisé par des solutions ascendantes de catéchine.

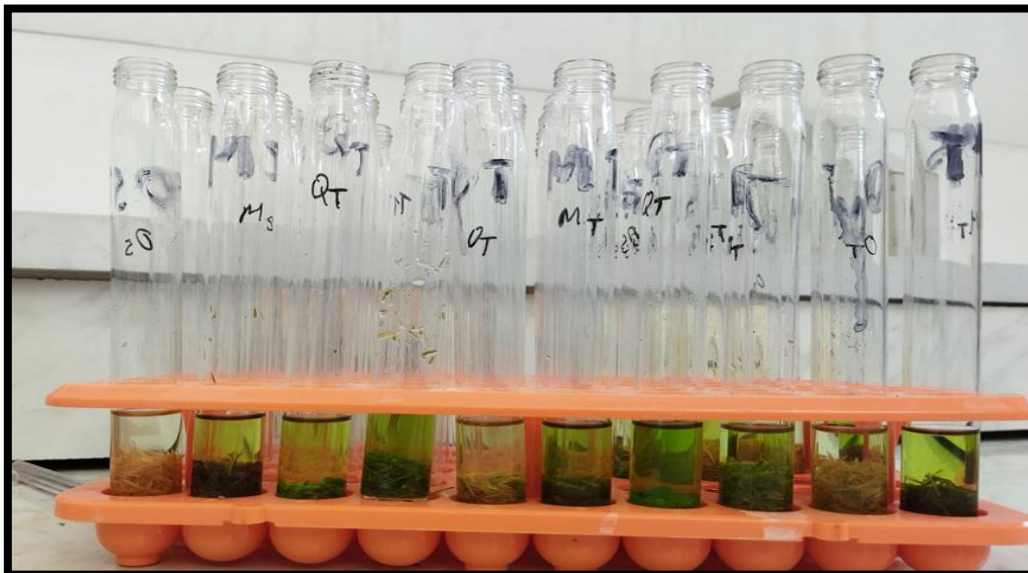
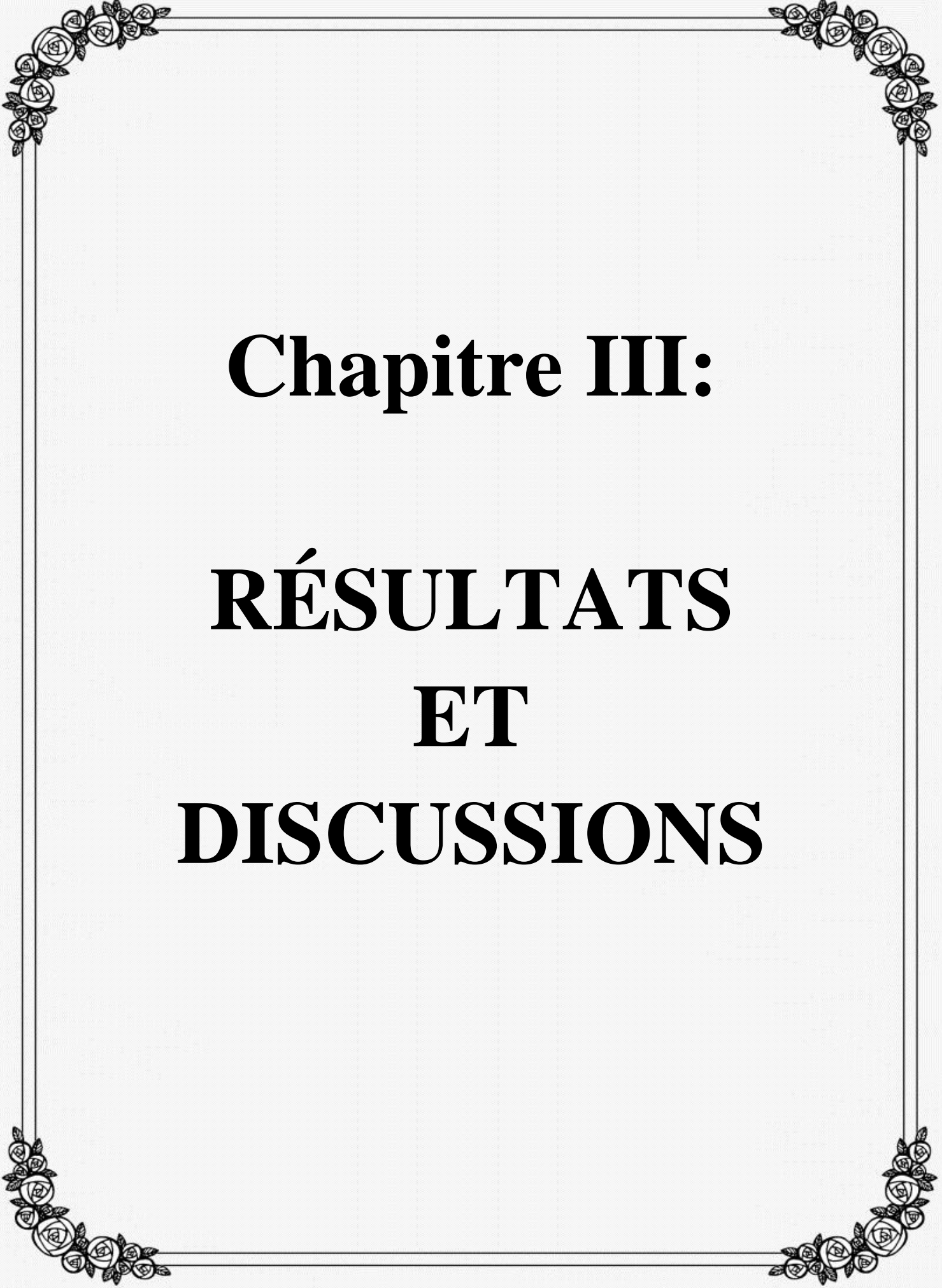


Figure 16: dosage des flavonoïdes.

3. L'analyse statistique

Le test de Bartlett teste l'homogénéité des variances, une hypothèse d'ANOVA. Le test de Bartlett est connu pour être trop sensible aux données non normales . Une probabilité résultante de $P \leq 0,001$ indique que les variances peuvent ne pas être homogène et vous souhaiterez peut-être transformer les données avant de faire une ANOVA.

Pour les plans ANOVA sans répliques (notamment la plupart des blocs randomisés et plans en carré latin).

A decorative border consisting of a thin black line with ornate floral corner pieces in each of the four corners. The floral pieces feature roses and leaves.

Chapitre III:

RÉSULTATS

ET

DISCUSSIONS

1. La glycine bétaine

La concentration de la glycine bétaine varie d'une espèce à une autre ; En effet elle a augmenté chez les deux espèces étudiées après le stress appliqué. Cette augmentation est bien marquée chez le triticale avec une valeur maximale de $0,0143 \pm 0,00032$ (mg/ml) par rapport aux témoins $0,0083 \pm 0,00043$ (mg/ml), et la valeur minimale a été enregistrée chez l'orge avec une valeur de $0,0121 \pm 0,0003$ (mg/ml) par rapport aux témoins $0,0048 \pm 0,0004$ (mg/ml).

Nos résultats correspondent à ceux de **Amirouche et Djaaleb, (2017)** et **Singh et Bharadwaj, (2016)** dans le blé dur, où la valeur a été estimée entre (0.22 mg/ml et 0.82 mg/ml).

L'analyse de la variance (Anova) a montré une très grande signification chez les espèces ($P < 0,001$)

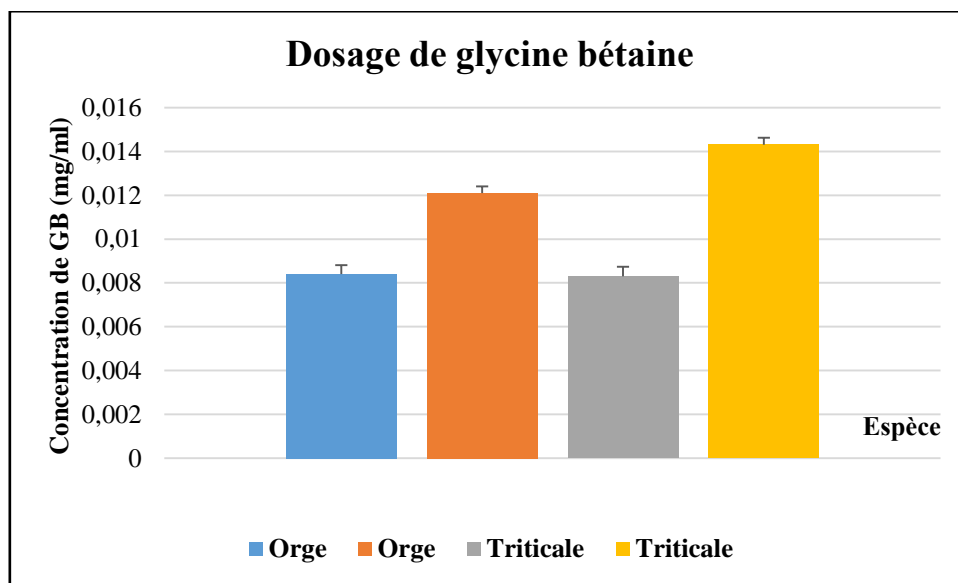


Figure 17: la concentration de glycine bétaine chez Orge et Triticale sous stress hydriques.

La synthèse de GB est généralement régulée à la hausse chez les plantes tolérantes à la sécheresse et contribue de manière significative aux ajustements osmotiques (**Hussain et al., 2009**). Il a été constaté que le contenu en GB était augmenté significativement dans les deux espèces.

2. Le malondialdéhyde (MDA)

L'analyse de la variance (Anova) a été significative chez les deux espèces ($P < 0,001$).

Le stress a augmenté la concentration de malondialdéhyde (MDA) chez les deux espèces étudiées, chez le triticale on a observé la valeur maximale de $0,521 \pm 0,004$ (nmol/ml) par rapport aux témoins $0,233 \pm 0,01$ (nmol/ml) ; et la minimale a été enregistrée chez l'orge avec une valeur de $0,123 \pm 0,002$ (nmol/ml) par rapport au témoin $0,08 \pm 0,003$ (nmol/ml)

Nos résultats révèlent un taux élevés par rapport à **Bagher et al., (2013)** chez l'espèce orge où la valeur a été estimée à 0.332 (nmol/ml).

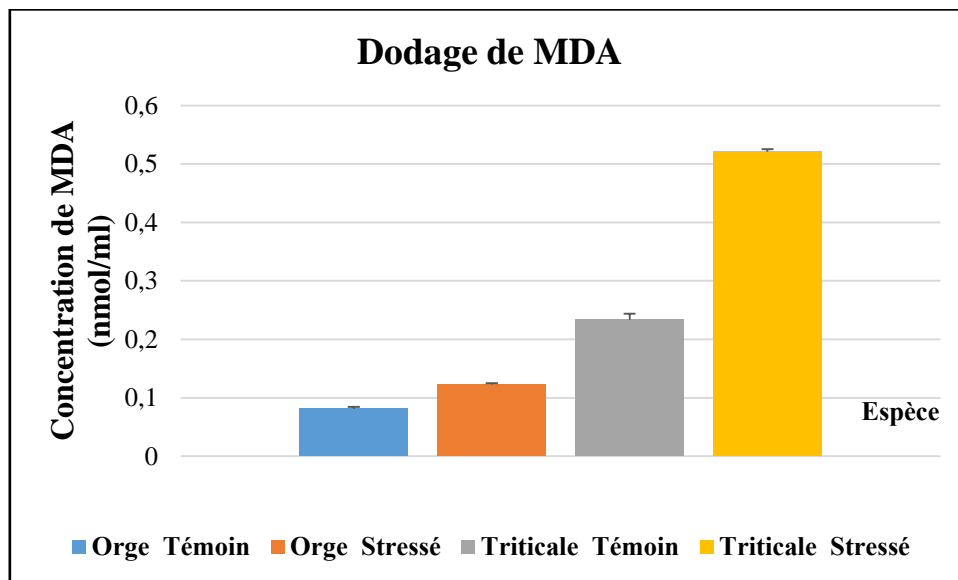


Figure 18 : La concentration de MDA chez orge et triticale sous stress hydriques.

La Malondialdéhyde (MDA) agit comme une molécule de signalisation pour refléter les lésions membranaires dues au stress oxydatif causé par les stress abiotiques (**Shafiq et al., 2015**). Pendant le déficit hydrique, la teneur en MDA a augmenté dans les plants de triticale et l'orge.

3. Peroxyde hydrogène (H₂O₂)

La concentration de peroxyde hydrogène (H₂O₂) a augmenté, elle varie dans les deux espèces, chez triticales on a observé la valeur maximale de 6.925±0.004(mg/ml), et la valeur minimale a été enregistré chez l'orge avec une valeur de 4.575±0.013 (mg/ml), en comparaison avec les témoins 6.3357±0.004 et 3.665±0.003 (mg/ml) respectivement.

Nos résultats en conditions de déficit hydrique sont en accord avec les résultats de **Bouchareb et al ., (2015)** dans le blé, où la valeur a été estimée entre 13,991 et 4,841 (mg/ml).L'analyse de la variance (Anova) a montré une grande signification chez les espèces (P <0,001).

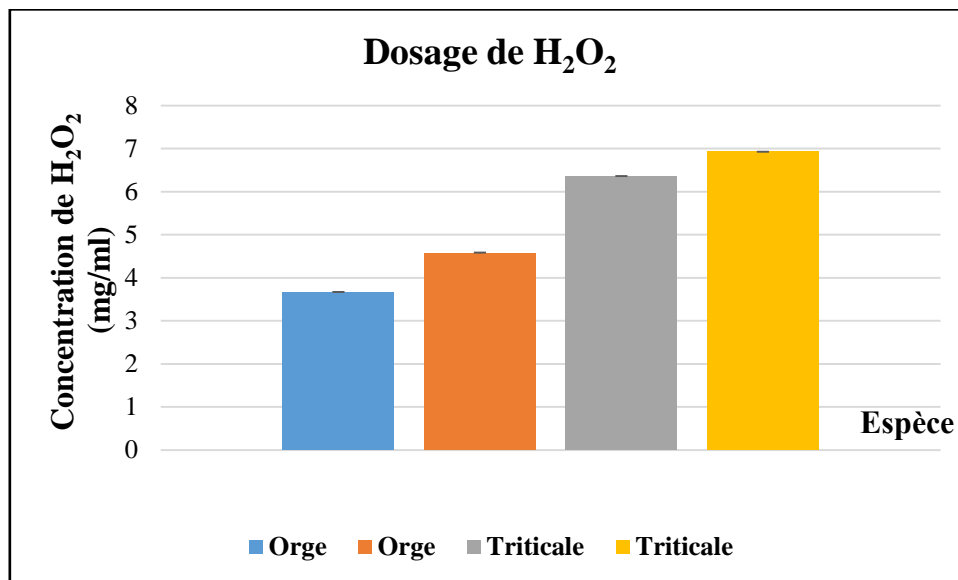


Figure 19 : La concentration de H₂O₂ chez l'orge et triticales sous stress hydriques.

Le stress dû à la sécheresse améliore généralement la génération de ROS tels que le radical superoxyde et H₂O₂ (**Saed-Moucheshi et al., 2014**). Cela suggère que le H₂O₂ joue un double rôle dans les cellules végétales : à de faibles concentrations, il fonctionne comme un messager secondaire impliqué dans la transduction du signal déclenchant la tolérance au stress abiotique, et à des concentrations élevées, il médie le stress oxydatif et la mort cellulaire programmée (**Lin et Kao, 2000**).

3. Les protéines

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 (**campalans et al., 1999**). Le stress hydrique a augmenté la teneur en protéines totales dans les deux plantes l'orge et triticale. Elle varie dans les deux espèces, chez l'orge on a observé la valeur maximale de 0.159 ± 0.0035 (mg/ml) par rapport au témoin 0.108 ± 0.003 (mg/ml) ; et la valeur minimale a été enregistrer chez triticale de 0.066 ± 0.0033 (mg/ml) par rapport au témoin 0.013 ± 0.002 (mg/ml).

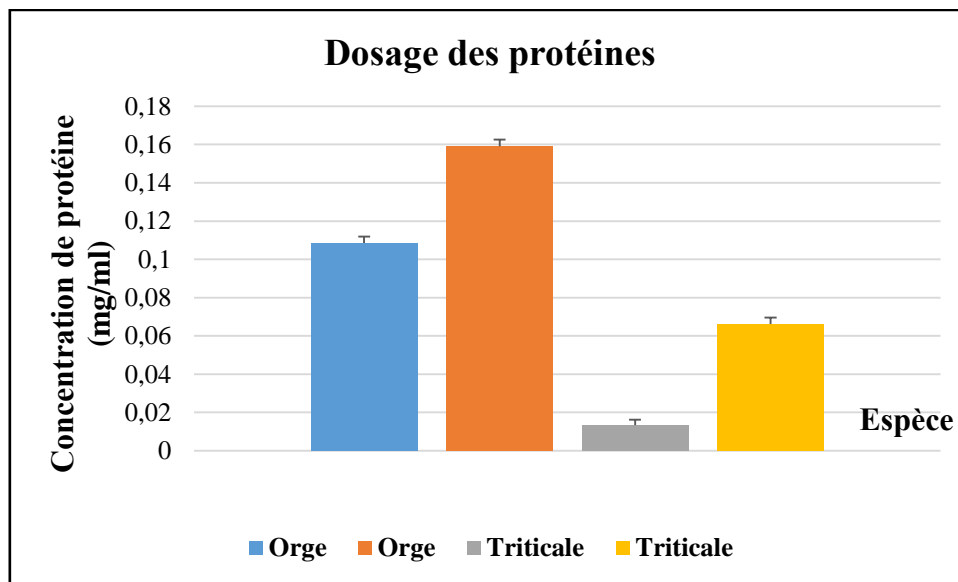


Figure 20 : La concentration des protéines chez orge et triticale sous stress hydriques.

Nos résultats sont en accord avec ce qui a été enregistrée précédemment par **Bagher et al., (2013)** ainsi que **Amirouche et Djaaleb, (2017)** dans le blé et l'orge où la valeur a été estimée entre 0.36 et 0.074(mg/ml).

L'analyse de la variance (Anova) a montré une signification chez les deux espèces ($P < 0,001$).

5. Les polyphénols

La concentration des polyphénols a diminué chez les deux espèces étudiées pendant l'application de stress. Le teneur en polyphénols variait chez l'orge stressée d'une valeur 9.86 ± 0.032 (mg EAG/g) par apport au témoin 14.06 ± 0.016 (mg EAG/g) ; et chez triticale stressée d'une valeur de 5.02 ± 0.097 (mg EAG/g) par apport au témoin 10.76 ± 0.015 (mg EAG/g).

L'analyse de la variance (Anova) a montré une très grande signification chez les espèces ($P < 0,001$)

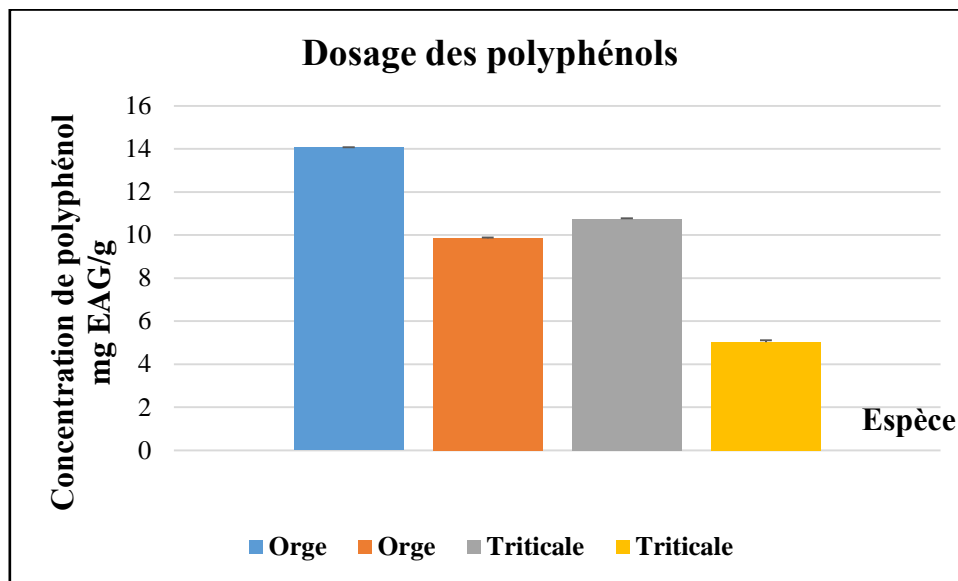


Figure 21 : La concentration des polyphénols chez orge et triticale sous stress hydriques.

La synthèse des polyphénols est élevée dans la plupart des plantes en déficit hydrique conditions. Cependant, contrairement à notre étude, les polyphénols ont diminué dans les deux espèces : triticale et l'orge sous stress hydrique. Ceci est n'est pas en accord avec ce qui a été rapporté précédemment obtenues par **Boussora et al., (2018)** chez l'orge, dans les plantes stressées vous obtenez la valeur (8.8 ± 0.226 mg EAG/g), tandis que les témoins d'une valeur (7.99 ± 0.5 mg EAG/g).

6. Les flavonoïdes

La concentration des flavonoïdes a diminué chez les deux espèces étudiées pendant l'application de stress. Le teneur en flavonoïdes variait chez l'orge stressée d'une valeur 0.80 ± 0.031 (mg EQC/g) par rapport au témoin 2.74 ± 0.045 (mg EQC/g); et chez triticale stressée d'une valeur de 0.39 ± 0.026 (mg EQC/g) par rapport au témoin 1.54 ± 0.021 (mg EQC/g) .

L'analyse de la variance (Anova) a montré une très grande signification chez les espèces ($P < 0,001$).

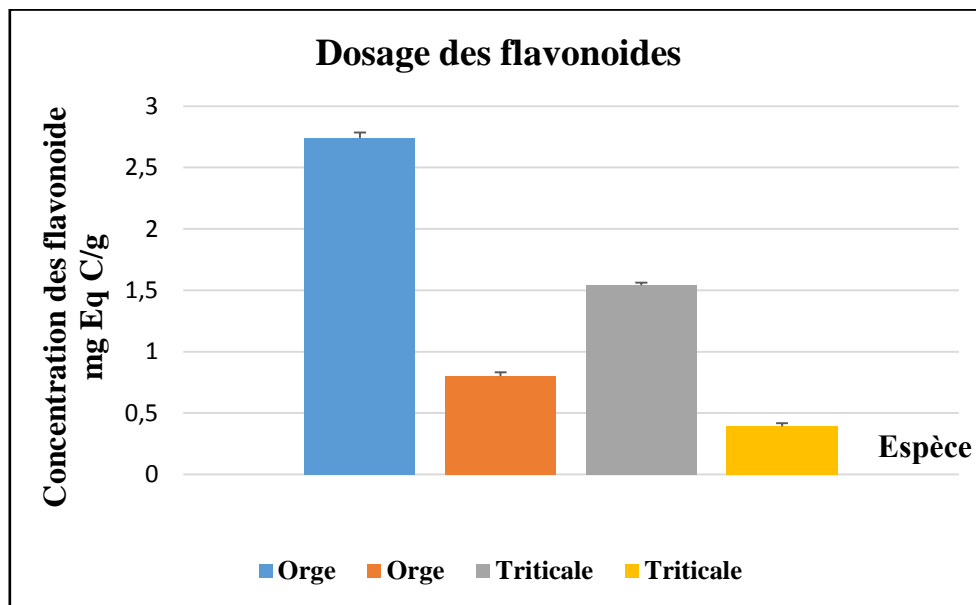


Figure 22 : La concentration des flavonoïdes chez orge et triticale sous stress hydriques.

On pense que la synthèse des flavonoïdes est élevée dans la plupart des plantes en déficit hydrique conditions (Nichols *et al.*, 2015). contrairement à notre étude, les flavonoïdes totaux ont diminué dans les plantes de triticale et l'orge sous stress hydrique. Ceci est n'est pas en accord avec ce qui a été obtenues par Boussora *et al.*, (2018) chez l'orge, dans les plantes stressées vous obtenez la valeur $(3.8 \pm 0.99$ mg EQ/g), tandis que les témoins d'une valeur $(3.03 \pm 0.87$ mg EQ/g). Les résultats contrastés peuvent être dus à un effet spécifique à l'espèce ou peuvent être liée à la sévérité du stress hydrique dans les cellules ou les tissus végétaux (Aziz *et al.*, 2017).

Discussion générale

L'étude de la réponse au stress hydrique chez les deux espèces orge et triticale testées révèle l'existence d'une grande variabilité pour la plupart des paramètres mesurés, l'effet du stress hydrique est bien marqué.

Les plantes ont adapté un ensemble de mécanismes moléculaires et physio-biochimiques pour atténuer les effets drastiques de la pénurie d'eau, y compris le développement d'un système de racines profondes (**Shafiq et al., 2014**).

L'accumulation des molécules antioxydants permettra de protéger les enzymes antioxydants des dégâts causés par les radicaux hydroxyles (**Deng et al., 2012**). L'accumulation des osmolytes dans les cellules soumises à un stress est associée à la mise en marche de mécanismes de tolérance aux effets néfastes du déficit hydrique (**Pirzad et al., 2011**).

De nombreuses espèces végétales accumulent naturellement la glycine bétaine GB comme osmolytes organiques majeurs lorsqu'elles sont soumises à différents stress abiotiques. L'accumulation de bétaine pourrait contribuer à l'osmoregulation dans des accumulateurs naturels ; cependant, l'osmoprotection semble être responsable de la tolérance aux stress abiotiques (**Hussain et al., 2009**). La glycine bétaine (GB) est plus abondante en réponse au stress de déshydratation (**Yang et al., 2003**).

Dans de nombreuses plantes cultivées, l'accumulation naturelle de GB est plus faible que suffisante pour atténuer les effets néfastes de la déshydratation causée par divers stress environnementaux (**Subbarao et al., 2001**).

Le déficit hydrique induit un stress oxydatif avec formation de radicaux libres. Le MDA, est l'un des produits finaux de la peroxydation des lipides membranaires (**Guichardant et al., 1994**). Cette peroxydation est le symptôme le plus attribué aux dommages oxydatifs ; il est souvent employé comme indicateur du stress oxydatif (**Zhang et Kirkham 1994**). Le dosage de la MDA est un moyen efficace pour évaluer les dommages du stress oxydatif sur la membrane (**Katsuhara et al., 2005**).

L' H_2O_2 joue le rôle d'une molécule signal qui alerte la cellule de la présence d'un stress environnemental (**Maksymiec, 2007**). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut fonctionner comme un messenger secondaire à des faibles concentrations mais il devient toxique à fortes concentrations (**Dat et al., 2000**).

Protéines induites ont une fonction directe dans l'augmentation de la tolérance au stress (protéines fonctionnelles), d'autres ont une fonction dans la chaîne de transduction (protéines régulatrices) qui aboutissent à la production de protéines fonctionnelles. La plupart des protéines à fonction directe sont des aquaporines et des enzymes catalysant la biosynthèse d'osmolytes (carbohydrate et acides aminés).

Les polyphénols expriment les propriétés antioxydantes par : Le piégeage direct des espèces réactives de l'oxygène (ERO), La suppression de la formation des ERO par l'inhibition de quelques enzymes ou par chélation des ions métalliques, impliqués dans leur production, La protection des systèmes de défense antioxydants de l'organisme (**Boudiaf, 2006**). En effet, les polyphénols possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) et superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) (**Bartosz, 2003**).

La propriété des flavonoïdes la mieux décrite est leur activité antioxydante et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$), anions superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) et radicaux peroxylipidiques. Ils inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle ($\text{C}_3\text{-OH}$) fortement réactif. Ils sont également capables de chélater les ions métalliques (**Ghedira, 2005**). Des travaux ont montré que les niveaux des flavonoïdes augmentaient dans les cas de stress biotique et abiotique, tels que le stress hydrique, la toxicité aux métaux et la privation de nutriments (**Winkel-Shirley, 2002**).

A decorative border consisting of a thin black line with ornate floral corner pieces at each of the four corners. The floral pieces feature roses and leaves.

Conclusion

Conclusion

Le stress hydrique affecte négativement les indicateurs de croissance végétative des changements physiologiques et biochimiques de la plante pour compléter ses fonctions et son cycle de vie, Comme stratégie pour résister à ce stress, en augmentant le taux de production d'antioxydants par les radicaux libres avec effet oxydant des cellules végétales.

La réponse des plantes au changement de stress varie selon l'intensité du stress et les caractéristiques de la plante même. La tolérance au stress oxydatif généré sous déficit hydrique demeure la résultante de nombreux mécanismes adaptatifs fonctionnels durant la vie de la plante.

Après cette étude Les résultats ont montré que le déficit hydrique à influencer sur les différents paramètres biochimiques étudiés. Le stress hydrique a provoqué une augmentation importante en tous les paramètres étudiée (dosage de la glycine bétaine, malondialdéhyde (MDA), peroxyde hydrogène (H_2O_2), les protéines, les polyphénols, et flavonoïdes). Au niveau des feuilles des deux espèces. Cette tolérance se manifeste à une forte concentration en molécules antioxydants. Le stress hydrique qui a été augmenté de la teneur de la glycine bétaine, le MDA, et H_2O_2 dans les feuilles notamment dans le triticale par rapport au l'orge. il a également entraîné une augmentation plus importante du taux de protéines dans les feuilles, notamment chez l'orge, par rapport au triticale. Quant à la teneur en polyphénols et flavonoïdes, les résultats étaient contrairement à ce qui a été trouvé dans d'autres études, ou nous avons constaté que la concentration dans les deux plantes stressées était plus basse que celle les deux plants témoins. Donc les résultats contrastés peuvent être dus à un effet spécifique à l'espèce ou peuvent être liée à la sévérité du stress hydrique dans les cellules ou les tissus végétaux.

En fin, on peut dire que l'étude a montré que les deux espèces est tolérant et efficace contre les contraintes hydriques.

Conclusion

Par conséquent, il est utile voire nécessaire ou même vital de s'orienter vers une sélection des espèces orge et de triticale tolérantes ou résistantes au stress hydrique. Pour cela, il faut:

- ✓ Sélectionner des caractères pouvant apporter des éléments supplémentaires susceptibles d'expliquer les mécanismes de la tolérance aux stress abiotiques et notamment à la contrainte hydrique.
- ✓ Contribuer davantage à l'identification des voies métaboliques impliquées dans la réponse au stress et sélectionner des marqueurs moléculaires intervenants dans la réaction de la plante face au stress.
- ✓ L'utilisation des outils moléculaires, comme le test de Comète, doit aussi être envisagé pour montrer l'implication des ERO dans l'effet clastogène.

A decorative border consisting of a thin black line forming a rectangle, with ornate floral corner pieces at each of the four corners. The floral pieces feature stylized roses and leaves.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- **ABDELLAOUI R, BOURALLEBF, HADDED Z**, 2016. Etude de quelques critères adaptatifs de *stipa lagascae* vis-à-vis du déficit hydrique. *Journal of New Sciences Agriculture and Biotechnology, IABC(21)*, 1350-1359.
- **AHMADIZADEH, M., VALIZADEH, M., ZAEFIZADEH, M. AND SHAHBAZI, H.** 2011. Antioxidative protection and electrolyte leakage in durum wheat under drought stress condition. *Journal of Applied Sciences Research* 7(3): 236-246.
- **AHMADIZADEH, M., VALIZADEH, M., ZAEFIZADEH, M. AND SHAHBAZI, H.** 2011. Antioxidative protection and electrolyte leakage in durum wheat under drought stress condition. *Journal of Applied Sciences Research* 7(3): 236-246.
- **ALIA, HAYASHI H., CHEN T. H. H., MURATA N.** 1998a. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth. *Plant Cell Environment*, 21: 232-239.
- **AMIC D., DAVIDOVIC-AMIC D., BESLO D., ET TRINAJSTIC N.,** 2003. Structure–Radical scavenging activity relationships of flavonoids. *CROATICA CHEMICA ACTA CCACAA*, 76 (1): 55-61.
- **AMIROUCHE A., DJAALEB R.,** 2017. Comparaison de quelques paramètres biochimiques chez quatre variétés de blé dur sous stress oxydatif généré par un stress hydrique. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine 1.
- **ANDREW C., KAREN P. S., IRENE A. G., ALEXANDER A. C., CATHY H., JOHN W., PETER M.,** 2017: The agronomic performance and nutritional content of oat and barley varieties grown in a northern maritime environment depends on variety and growing conditions, *Journal of Cereal Science*, Volume 74, Pages 1-10.
- **AZIZ, A., AKRAM, N.A. ASHRAF, M.,** 2017. Influence of natural and synthetic vitamin C (ascorbic acid) on primary and secondary metabolites and associated metabolism in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). plants under water deficit regimes. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- **BAGHER Z M., RAZI H., SAED-MOUCHESHI A.,** 2016. Evaluation of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation and Proline Content as Selection Criteria for Grain Yield under Water Deficit Stress in Barley. *Journal of Applied Biological Sciences*, 74, 71-78.
- **BAIK, B.-K & ULRICH, S.E.** BARLEY for food: characteristics, improvement and renewed interest. *Journal of Cereal Science* 48, 233-242 (2008)
- **BARTOSZ G,** 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*. 9 : 5-21.
- **BARTOSZ G.,** 2003. Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments on Toxicology*, 9, 5-21.
- **BENACEUR. M, RAHMOUN.C, SDIRI.H, MEDAHI. M. et SELMI.M.,** 2001. Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains de quelques variétés maghrébines de blé. *Revue Sécheresse* , Volume 12, N°03, pp. 167-174.

Références bibliographiques

- BENKADDOUR M. 2014. Modification physiologique chez des plantes de blé (*Triticum durum* desf) exposées à un stress salin. Université Badji Mokhtar, Annaba. Thèse de doctorat : 23-80-81p.
- BENNACEUR M, NAILY M, SELIMI M. 1999. Effet d'un déficit hydrique, survenant a différents stade de développement du blé sur humidité du sol, la physiologie de la plante et sur les composantes du rendement. Médit, N°2/99, P.53-60.
- BENNEFONT-ROUSSELOT D., THEROND P.ET.DELATTRE J.(2003) Radicaux libres et antioxydants.Ed :Flammarion Médecine-Sciences ,59-81
- BENSALÉM. M., BOUSSEN. H, SLAMA.A., 1995. Évaluation de la résistance à la contrainte hydrique et calorique du blé dur : recherche de paramètres précoces de sélection. Sixièmes Journées scientifiques du réseau Biotech-Génie Génétique des plantes, (AUPELF/UREF), Orsay, juillet 1997.
- BENSARI M, CALME SJ, VIALA G .1990. Répartition du carbonefixé par photosynthèse entre l'amidonet le saccharosedans la feuille de soja: influence d'un déficithydrique. Plant Physiology and Biochemistry Journal 28, 113-124.
- BERNARD M. ET BERNARD S., 1992: Développement et application des techniques de coloration différentielle des chromosomes chez les végétaux: caryotype et structures des chromosomes, identification des espèces et relations phylétiques. Société Française de genetique.8 (3).X-II.
- BERUBE R, MALENFANT J, GAUVIN D, BIAIS M, GAGNON E, DUMAS R, RACINE M.C, OURQUE J, BELANGER A, (2000). Quantitation of androgenic and estrogenic steroids in rat and monkey serum using gas ehromatography and negative chemical ionisation mass spectrometry. Proc 48th ASMS Conference on Mass spectrometry and Allied Topics, Long Beach, CA. 605.
- BLOOMER RJ, FISHER, WELLMAN KH, (2008).Blood oxidative Stress Biomarkers: influence of sex. Training Status, and dietary Intake. Gender Medicine.5 (3): 218_228.
- BOIZOT N ET CHARPENTIER J.P., 2006, Méthode rapide d'évaluation du contenu en composésphénoliques des organes d'un arbre forestier, INRA - Amélioration génétique et physiologieForestières, Laboratoire d'analyses biochimiques, le cahier des technique de l'INRA,P: 79- 80
- BOROS, B., JAKABOVA, S., DORNYEI, A., HORVATH, G., PLUHAR, Z., KILAR, F., FELINGER, A. (2010À) .Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. Journal of Chromatography A, 1217: 7972–7980.
- BRADFORD, MM (1976). Une méthode rapide et sensible pour la quantification de quantités de protéines en microgrammes utilisant le principe de la liaison protéine colorant Biochimie analytique, 72 (1-2), 248-254.
- BOUCHAREB,R.,GHAROUCHA,H.,(2015).durum wheat (*Triticum drum desf.*) Evaluation under water stress conditions in Eastern Algeria .european journal of scientific research,pp.15-21.
- BOUSSORA FAIZA.,TEBRA TRIKI.,GUASMI,F.,SIHEM BEN ALI.,(2018). Etude de la composition phénolique et des propriétés antioxydantes d'extraits des feuilles de

Références bibliographiques

- cinq variétés d'orge (*Hordeum vulgare* L.) soumis à un stress hydrique (PEG 6000). *Revue des Régions Arides* n°43 (3/2017) – Numéro spécial – Actes du 5ème Meeting International sur l'Aridoculture et les Cultures Oasiennes.
- CAUDERON Y. (1981). Origine et évolution des triticales. *Industrie des céréales*, 10,39.
 - CECCARELLI S, GRANDO S, MAATOUGUI M, MICHAEL M, SLASH M, HAGHPARAST R, RAHMANIAN M, TAHERI A, AL-YASSIN A, BENBELKACEM A, LABDI M, MIMOUN H, NACHIT M. (2010) Plant breeding and climate changes. *J. Agr. Sci*, 148 :1–11.
 - DACOSTA, E. (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Yves Dacosta (éd). Paris, p317.
 - DAT J., VANDENABEELE., VRANOVA S.V., VAN MONTAGU E., INZE M.D., VAN BREUSEGEM F., 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol.Life Sci*. 57: 779-795.
 - DAVE-OOMAH B., 2003. Bulletin IBP, numéro 1, Canada.
 - DELATTRE, 2005, des Plantes, Livre V, d'après le Livre II, paragraphe 25 de l'Anthologie palatine.
 - DELAUNEY A. J. AND VERMA D.P.S., (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*. 4(2): 215–223.
 - DENG B, DU W, LIU C, SUN W, TIAN S, DONG H, (2012). Antioxidant response to drought, cold and nutrient stress in two ploidy levels of tobacco plants: low resource requirement confers polytolerance in polyploids? *Plant Growth Regulation*. 66(1): 37-47.
 - DERAISSAC M., 1992. Mécanismes d'adaptation à la sécheresse et maintien de la productivité des plantes cultivées. *Revue Agro-Tropical*, Volume 64, N°1, pp. 23-37.
 - DJEBBAR R. (2012). Effet du stress hydrique sur le métabolisme cellulaire de plantes de tabac sauvage (*Nicotiana sylvestris*) et d'un mutant mitochondrial (CMSII). Thèse de doctorat d'état de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, 233p.
 - DJEKOUN A ET YKHLEF N, (1996). Déficit hydrique, effet stomatique et non stomatique et activité photosynthétique chez quelques génotypes de blé tétraploïdes. 3ème Réunion du réseau SEWANA, de blé dur IAV HASSAN II du 67 décembre 1996 (Maroc).
 - DUTUIT P, POURRAT Y, DUTUIT J.M, (1994). La notion de stress de la cellule à l'écosystème. *Sècheresse*, 5. 1: 23-31.
 - FAVIER A. (2003) Le stress oxydant. *Actualité chimique*, 108-115.
 - FELIACHI K, AMROUNE R ET KHALDOUNE. 2001. Impact de la sécheresse sur la production des céréales cultivées dans le nord de l'Algérie: céréaliculture N0 35.ED. ITGC. Algérie.
 - FLEXAS J., BOTA J., GALMES J., MEDRANO H., RIBAS-CARBO M. (2006). Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum*. 127: 343-352.

Références bibliographiques

- **GABBAY-AZARIA R., TEL-OR E., SCHÖNFELD M.** 1988. Glycine betaine as an osmoregulant and compatible solute in the marine cyanobacterium *Spirulina subsalsa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 264: 333-339.
- **GERM, M., & GABERŠČIK, A.** (2016). The Effect of Environmental Factors on Buckwheat. In *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat* (pp. 273–281).
- **GHEDIRA, K.**, 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 3, 162–169.
- **GHEZZI P, BONETTO V,** (2003). Redox proteomics: identification of oxidative ly modified proteins. *Proteomics*. 3, 1145_1153.
- **GRIEVE C.M., GRATTAN, S.R.**, 1983. Rapid assay for the determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant Soil* 70, 303-307.
- **GUEI R.G., WASSOM C.E.** 1993. Genetics of osmotic adjustment in breeding maize for drought tolerance. *Heredity*, 71: 436-441.
- **GUICHARDANT M., VALLETE-TALBI L., CAVADINI C. ET AL.** 1994. Malondialdehyde measurement in urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical sciences and Applications*, 655, 112-116.
- **HAFEZ YM, ABDELAAL KAA, EID ME, MEHIAR FF** (2016) Morphophysiological and biochemical responses of barley plants (*Hordeum vulgare* L.) against barley net blotch disease with application of non-traditional compounds and fungicides. *Egypt J Biol Pest Control* 26(2):261–268.
- **HALLIWELL B,** 1994. *Nutr. Rev.* , 52, 253- 265.
- **HALLIWELL B.** (2006) Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiology* 141(2), 312-322.
- **HAMMOUDA D.** (2013). Évolution et organisation du génome chez le (x-Triticosecale Wittmack). Thèse de doctorat. Université de Constantine 1
- **HERNANDEZ J.A ET ALMANSÁ M.S.,** 2002. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves, *Physiol Plant*, vol. 115, no 2: 251-257.
- **HOLLOWAY P.J., ET JEFFREE CE.,** 2017 : Epicuticular Waxes, In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences (Second Edition)*, edited by Brian Thomas, Brian G Murray and Denis J Murphy, Academic Press, Oxford, Pages 374-386.
- **HONG Z., LAKHINENI K., ZHANG Z. and VERMA DP,** 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.* Volume 122, pp 1129 - 1136.
- **HOPKINS W. G.** (2003). *Physiologie végétale*. 2ème édition. De Boeck, Bruxelles : 61-476.
- **HUSSAIN, M., MALIK, M.A., FAROOQ, M., KHAN, 644 M.B., AKRAM, M., SALEEM, M.F.,** 2009. Exogenous glycinebetaine and salicylic acid application improves water relations, allometry and quality of hybrid sunflower under water deficit conditions. *J. Agron. Crop Sci.* 195, 98-109.

- **JESSICA G., SHEPHERD., WOLFRAM B., SARAN P., SOHL, KATE V. H., 2017** :Bioavailability of phosphorus, other nutrients and potentially toxic elements from marginal biomass-derived biochar assessed in barley (*Hordeum vulgare*) growth experiments, *Science of The Total Environment*, Volumes 584–585, Pages 448-457.
- **KARABÍN M., TEREZA HUDCOVÁ., LUKÁŠ JELÍNEK., PAVEL DOSTÁLEK., 2015.** Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. Department of Biotechnology, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28Prague 6, Czech Republic. Kim K. H., Tsao, R and Cui S. W.
- **KARABÍN M., TEREZA HUDCOVÁ., LUKÁŠ JELÍNEK., PAVEL DOSTÁLEK., 2015.** Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. Department of Biotechnology, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.
- **KATSUHARA M., OTSUKA T. & EZAKI B. 2005.** Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 169, 369-373.
- **KEVIN L.G, FCARCSI, NOVALIJA E, STOWE D.F, (2005).** Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: The relevance to anesthesia practice. *Anesthesia and Analgesia*. 101:1275–1287.
- **KHITHER H, (2019).** Etude des effets de la thymoquinone sur le stress oxydant : Applicati
- **KIANI P. 2007.** Analyse génétique des réponses physiologiques du tournesol (*Helianthus annuus L.*) soumis à la sécheresse. Thèse Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse.
- **KIM D.O., JEONG S.W. ET LEE C. Y., 2003.** Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321–326.
- **KRIEGER-LISZKAY, A., 2005.** Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337–346.
- **LAMAZE T. 1994.** Résistance de plantes a la sécheresse: mécanismes physiologiques. *Le sélectionneur Français*, 45: 75-85p.
- **LEOPOLDINI, N. RUSSO, M. TOSCANO, 2011,** the molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants *Food Chemistry*, pp. 288-306.
- **LIN CC, KAO CH (2000)** Effect of NaCl stress on H₂O₂ metabolism in rice leaves. *Plant Grow Reg.* 30:151-155.
- **LORETO F ET VELIKOVA V, 2001.** Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiology* 127:1781-1787.
- **LUSHCHACK, V. AND SEMCHYSHY, H.M. (2012).** Oxidative Stress-Molecular Mechanism and Biological Effects . Intech, Rijka , Croatia.

- **M**ACHEIX J J., FLEURIET A., JAY-ALLEMAND C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes. p4-5.
- **M**AKSYMIEC W, 2007. Signaling responses in plants to heavy metals. *Acta Physiol.Plant* 29 : 177-187.
- **M**ANIPULATION OF ANTIOXIDANT ENZYMES. *ASIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH* 5(1): 17-27.
- **M**CCALL MR, FREI B, 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Rad Biol Med*, 26:1034–53.
- **M**CGOVERIN, C. M., SNYDERS, F., MULLER, N., BOTES, W., FOX, G., AND MANLEY, M. (2011). A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *J. Sci. Food Agric.* 91, 1155–1165. doi: 10.1002/jsfa.4338
- **M**ERGOUM, M., SINGH, P., PENA, R., LOZANO-DEL RÍO, A., COOPER, K., SALMON, D., ET AL. (2009). “Triticale: a “new” crop with old challenges,” in *Cereals*, eds M. Mergoum, P. K. Singh, R. J. Pena, A. J. Lozano-del Rio, K. V. Cooper, D. F.
- **M**OKABLI A., 2002- Biologie des nématodes à kyste des céréales (Heterodera) en Algérie. Virulence de quelques populations à l'égard de diverses variétés et lignées de céréales. Thèse Doct. Inst. Nat. Agro., El Harrach, 63p.
- **M**ØLLER I.M, JENSEN P.E, HANSSON A, (2007). Oxydative modifications to cellular components in plants. *AnnuRev plant Biol.* 58, 459_481.
- **M**OREL C, (2007). Etude de la régulation de la sulfhydryl oxydase QSOX1 et de son implication dans l'apoptose induite par le stress oxydant. Thèse de Doctorat de l'université de Franche Comté.
- **M**URATA N., MOHANTY P. S., HAYASHI H. AND PAPAGEORGIOU G. C. 1992. Glycinebetaine stabilizes the association of extrinsic proteins with the photosynthetic oxygen-evolving complex. *FEBS Letters*, 296: 187-189.
- **N**EMMAR M., 1983. Etude de la résistance à la sécheresse chez les variétés de blé dur et tendre ; évolution des teneurs en proline au cours du cycle de développement. Thèse .doct - Ing .I .N .S A Montpellier, 142 Pages
- **N**ICHOLS, S.N., HOFMANN, R.W., WILLIAMS, W.M., 2015. Physiological drought resistance and accumulation of leaf phenolics in white clover interspecific hybrids. *Environ. Exp. Bot.* 119, 40-47.
- **O**LSEN, K.M., HEHN, A., JUGDÉ, H., SLIMESTAD, R., LARBAT, R., BOURGAUD, F., LILLO, C., 2010. Identification and characterisation of CYP75A31, a new flavonoid 3'5'-hydroxylase, isolated from *Solanum lycopersicum*. *BMC Plant Biol.* 10, 21
- **O**N A L'HEPATOTOXICITE ET L'ARTHRITE RHUMATOÏDE INDUITE CHEZ LE RAT .LA THESE DE DOCTORAT. UNIVERSITE FERHAT ABBAS SETIF 1. FACULTE DES SCIENCES DE NATURE ET DE LA VIE LA.

Références bibliographiques

- OUHRANIA R, BORDJAH S, (2016). Paramètre Hématologiques et Biochimiques durant premier trimestre de la gestation chez la vache. Mémoire de Master. Université A. MIRA - Bejaia Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
- **PASSIOURA J.** (2004). Increasing crop productivity when water is scarce: from breeding to field management. In proceedings of the 4th International Crop Science Congress "New directions for a diverse planet" Brisbane, Australia. 12 pages.
- PASTRE J.O.C, (2005). Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de docteur vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.
- PEER S. 2013. Plantes cultivées en suisse-L'orge-. Suisse. Verein für alpine Kulturpflanzen, Alvaneu, septembre 2013.p. 14-16.
- PELTIER J.B, YTTERBERG A.J., SUN Q, VAN WIJK K.J, (2004). New functions of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* 279, 49367_49383.
- PEREZ MARTINEZ S, FARINA M, OGANDO D, RIBEIRO M.L, GIMENO M, FRANCHI A.M, (2000). Nitric oxide inhibits prostanoïd synthesis in the rat oviduct. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62:239-242. *Phytologist*.173, 677-702.
- PEREZ-JIMENEZ J, S.-C. F. Literature data may underestimate the actual antioxidant capacity of cereals. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 5036- 5040.
- PIRZAD, A., SHAKIBA, M. R., ZEHTAB-SALMASI, S., MOHAMMADI, S. A., DARVISHZADEH, R. AND SAMADI, A. 2011. Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *J Med Plants Res* 5(12): 2483-2488.
- POWERS S.K, JACKSON M.J, (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev.* 88, 1243-1276.
- **RAMADE F,** (2003). *Elément d'écologie fondamentale*. Ed. Dunod, Paris, 690p.
- REDDY AR., CHAITANYA KV. ET VIVEKANANDAN M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J Plant Physiol.* 161: 1189-1202.
- RIBEREAU-GAYON P., 1968. *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Ed., Paris.p. 254.
- **SAED-MOUCHESHI A, SHEKOOFA A, PESSARAKLI M** (2014). Reactive oxygen species (ROS) generation and detoxifying in plants. *J Plant Nut.* 37:1573-1585
- SAKAMOTO A. AND MURATA N. 2002. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environment,* 25: 163-171.
- SCHROETER H, BOYD C, SPENCER JPE, ET AL. MAPK, 2002, signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric acid. *Neurobiol Aging;* 23:861-80.

Références bibliographiques

- SHAFIQ, S., AKRAM, N.A., Ashraf, M., 2015. Does exogenously-applied trehalose alter oxidative defense system in the edible part of radish (*Raphanus sativus* L.) under water-deficit conditions? *Sci. Hort.* 185, 68–75.
- SHARMA, A.B. JHA, R.S. DUBEY, M. PESSARA K LI, 2012, Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions *J. Bot.*, pp. 1-26.
- SHIMIZU H, 2004. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study, *Stroke*, 35 (9): 2072-2077.
- SINGH, N., BHARDWAJ, R.D., 2016. Ascorbic acid alleviates water deficit induced growth inhibition in wheat seedlings by modulating levels of endogenous antioxidants. *Biologia* 71, 402-413.
- SMIRNOFF N, FOYER C, DIETZ K, MITTLER R, FEIERABEND J, GRACE S, DESIKAN R JONES M, VREEBURG R, LOGAN B, JASPERS P, (2005). *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Blackwell publishing.
- SOLTNER, D. 2005. *les grandes productions végétales*. 20ème. Ed. CCTA . Pp20-140
- STACE, C. (1987). *Triticale: a case of nomenclatural mistreatment*. *Taxon* 36, 445–452. doi:10.2307/1221447
- SUBBARAO G. V., WHEELER R. M., LEVINE L. H. AND STUTTE G. W. 2001. Glycine betaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply. *Journal of Plant Physiology*, 158 (6): 767-776.
- SUBBARAO, G.V., Wheeler, R.M., Levine, L.H., Stutte, G.W., 2001. Glycine betaine accumulation, ionic and water relations of red-beet at contrasting levels of sodium supply. *J. Plant Physiol.* 158, 767– 776.
- TEMAGOULT M. 2009. *Analyse de la variabilité de la réponse au stress hydrique chez des lignées recombinantes de Tournesol (Helianthus annuus L.)*. Mémoire de magistère. Université Mentouri Constantine.
- TERPOLILLI NA, MOSKOWITZ MA, PLESNILA N (2012). Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 32: 1332-1346.
- TOUMI M., BARRIS S., AID F., 2014. Effets des stress hydrique et osmotique sur l'accumulation de proline et de malondialdéhyde (MDA) chez deux variétés de colza (*Brassica napus* L.). *Bulletin de l'Institut Scientifique, Rabat, Section Sciences de la Vie*, 5, 17-24.
- TURNER N. C., WRIGHT G. C., SIDDIQUE K. H. M. 2001. Adaptation of grain legume to water limited environments. *Advanced Agronomy*, 71: 193-231.
- VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC ET M. MAZUR (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-Biological Interactions* 160(1): 1-40.
- VALKO, M., LEIBFRITZ, D., MONCOL, J., CRONIN, M.T., MAZUR, M., TELSER, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84

Références bibliographiques

- VANSANT G, 2004. Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Ed Institut Danone.
- VAVILOV N.I., 1951. The Origin, Variation, Immunity, and Breeding of Cultivated Plants. *Chronica Botanica* , volume 13, N°1, pp 1949-50
- VURUKONDA S.S.K.P., VARDHARAJULA S., SHRIVASTAVA M., ALI S.Z. (2016). Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiol. Res.* 184:13–24.
- WANGXIA WANG, BASIAVINOCUR, ARIE ALTMAN, (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*218: 1–14
- WARDMANE P.ET CANEIAS FENTON L.P. (1996) *Chemistry an introduction Radiation Res*, 145: P/5326531.
- WILSON A.S. (1876). Wheat and Rye hybrids, *Proceedings Bot. Soc. Edinburgh*, 12,286-288.
- WINKEL-SHIRLEY, B., 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 218–223.
- WITCOMBE J. R. (2009). Breeding for abiotic stress for sustainable agriculture. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 363: 703 -716.
- YADAV S.K, DHOTE M, KUMAR P, SHARMA J, CHAKRABARTI T, JUWARKAR A.A, (2010). Differential antioxidative enzyme responses of *Jatropha curcas* L., to chromium stress. *J. Hazard. Mater.* 180, 609_615.
- ZEGHAD N., MERGHEM R., 2013. Antioxydant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L.
- ZERRAD W, MAATAOUI B ,HILALI S, EL ANTRI S, LAZA S, HMYENE A. 2009.The effect of hydric stress upon the synthesis of four isoenzymes of two varieties of durum wheat. *Scientific study end Reseach*, vol3, p. 53-259.



Annexes

Les annexes:

Annex 1 : Les résultats des concentrations différentes étudiées avec des Statistiques descriptifs.

Espèce	MDA		H ₂ O ₂		GB		Protéines		Polyphénols		Flavonoides	
	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S	T	S
Orge	0,0809	0,123	3,665	4,575	0,0048	0,0121	0,1086	0,1591	14,06	9,86	2,74	0,8
Tricale	0,2334	0,5213	6,357	6,925	0,0083	0,0143	0,0134	0,0662	10,76	5,02	1,54	0,39
P<0,001	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Annex 2: Concentration de glycine bétaine (GB)

GB	Orge		Triticale	
	Témoin	Stressée	Témoin	Stressée
C1	0,0085	0,0124	0,0081	0,0139
C2	0,0088	0,0118	0,008	0,0144
C3	0,008	0,0122	0,0088	0,0145
TOTALE	0,0084	0,0121	0,0083	0,0143
Ecartype	0,00040415	0,00030551	0,00043589	0,00032146

Annex 3: Concentration de malondialdéhyde (MDA)

MDA	Orge		Triticale	
	Témoin	Stressée	Témoin	Stressée
C1	0,0845	0,1238	0,2191	0,5265
C2	0,0761	0,125	0,2429	0,5217
C3	0,0821	0,1202	0,2382	0,5158
TOTALE	0,0809	0,123	0,2334	0,5213
Ecartype	0,004327	0,002498	0,012605	0,005359

Annex 4: Concentration de peroxyde hydrogène (H₂O₂)

H ₂ O ₂	Orge		Triticale	
	Témoin	Stressée	Témoin	Stressée
TOTAL	3,665	4,575	6,357	6,925
Ecartype	0,00351188	0,01357694	0,00416333	0,00416333

Annex 5: Concentration des protéins

Protéines	Orge		Triticale	
	Témoin	Stressée	Témoin	Stressée
C1	0,1081	0,1631	0,0143	0,0666
C2	0,1122	0,1564	0,0103	0,0693
C3	0,1055	0,1577	0,0157	0,0626
TOTAL	0,1086	0,1591	0,0134	0,0662
Ecartype	0,00337787	0,00355293	0,00280238	0,00337095

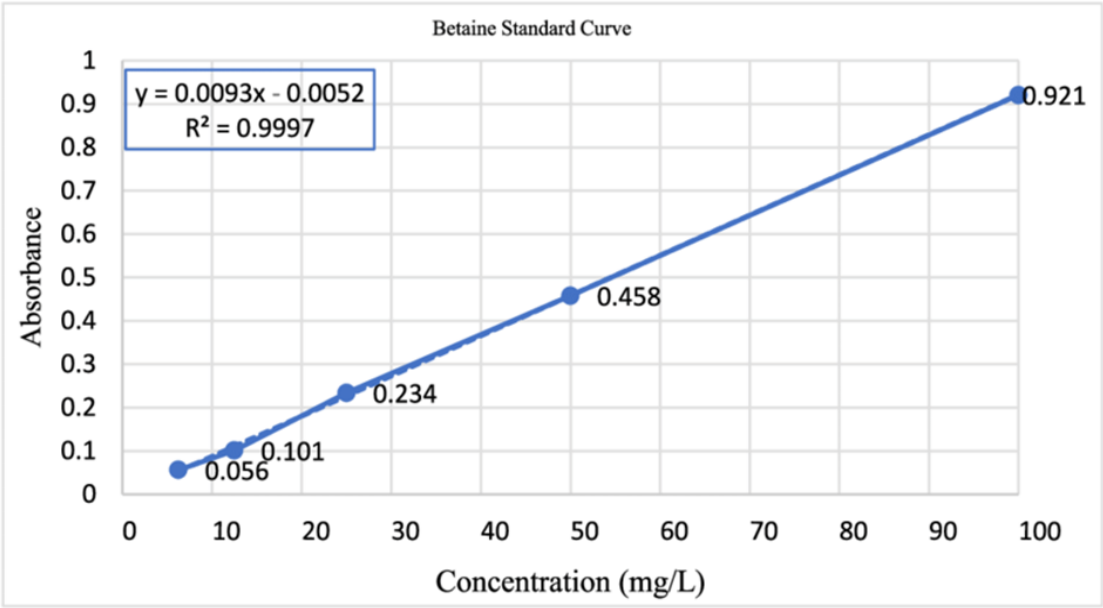
Annex 6: Concentration des polyphénols

Polyphénols	Orge		Triticale	
	Témoin	Stressée	Témoin	Stressée
C1	4,67719298	3,25614035	3,58508772	1,61140351
C2	4,68157895	3,32192982	3,60701754	1,78684211
C3	4,70789474	3,29122807	3,57631579	1,6245614
TOTAL	14,0666667	9,86929825	10,7684211	5,02280702
Ecartype	0,016605	0,03291909	0,01581382	0,09771289

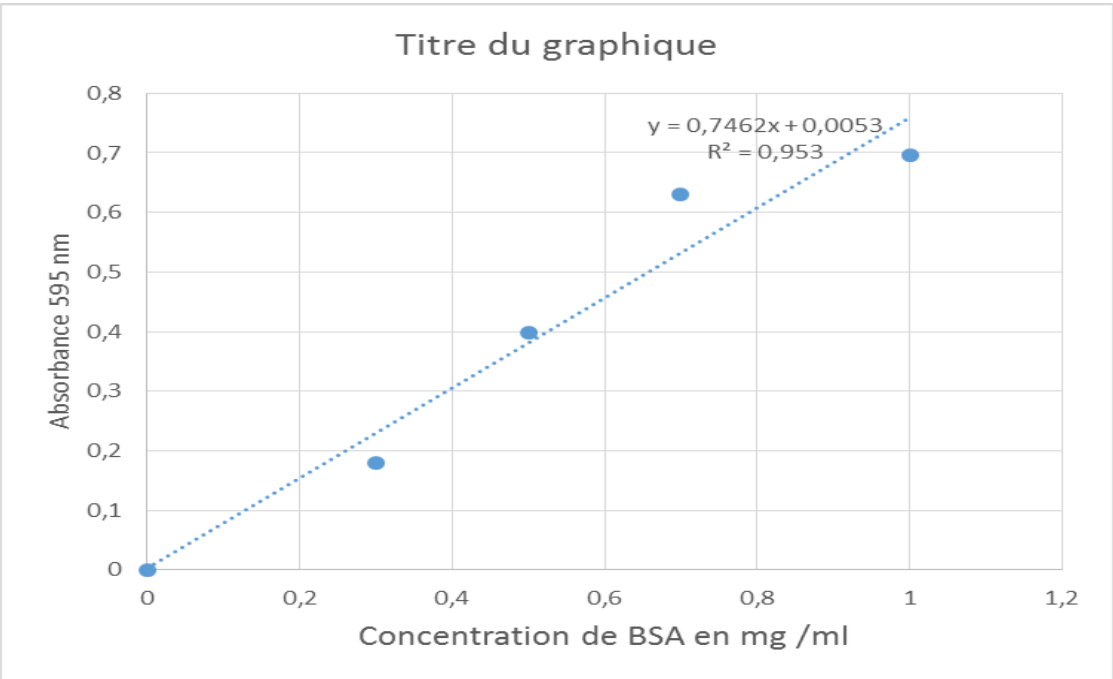
Annex 7: concentration des flavonoïdes

Flavonoïdes	Orge		Triticale	
	Témoin	Stressée	Témoin	Stressée
C1	2,79583333	0,8375	1,56666667	0,42083333
C2	2,72291667	0,80625	1,525	0,4
C3	2,7125	0,775	1,53541667	0,36875
TOTAL	2,74375	0,80625	1,54236111	0,39652778
Ecartype	0,0454052	0,03125	0,02168402	0,0262147

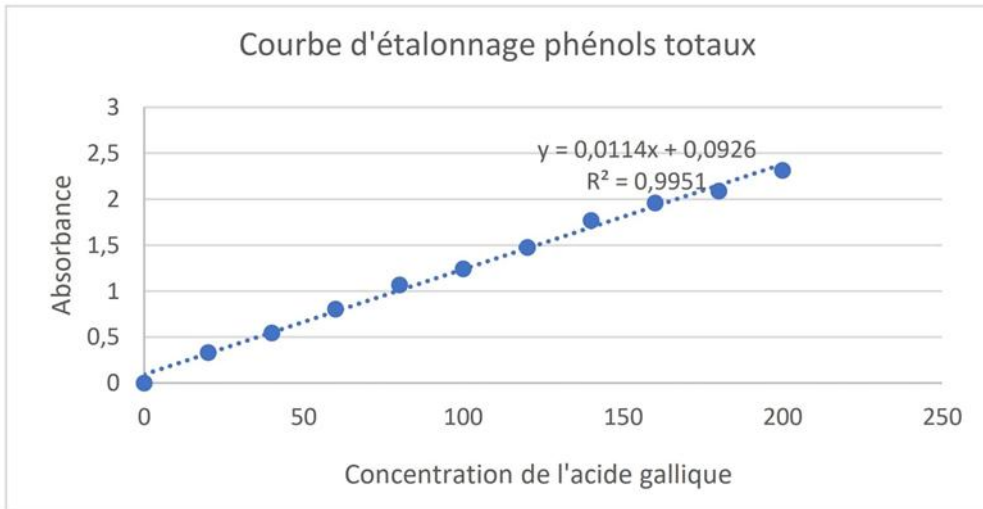
Annex 8: Courbe d'étalonnage de glycine bétaine



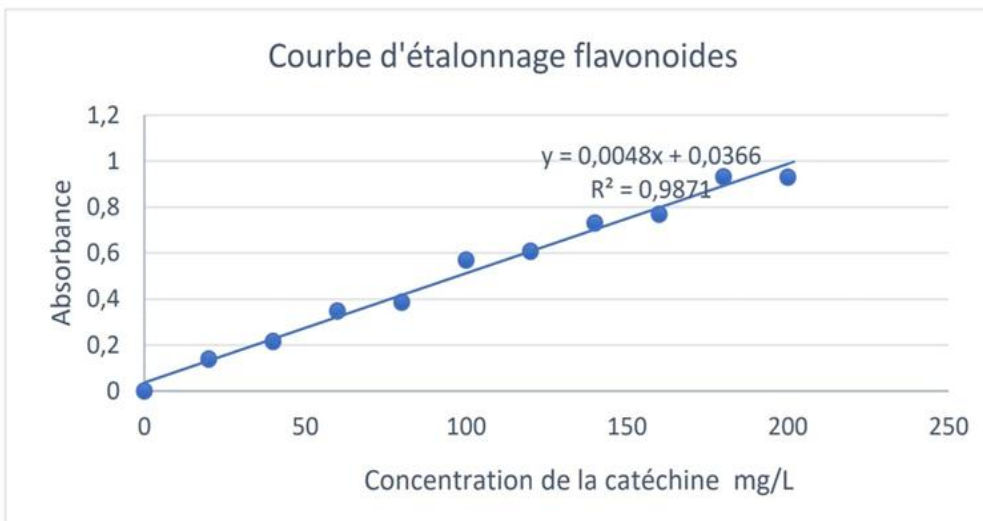
Annex 9: La courbe de protéine mg/ml.



Annex 10: Courbe d'étalonnage phénols totaux



Annex 11: Courbe d'étalonnage flavonoïdes



Rows of data with missing values removed: 0

Rows which remain: 24

Source	df	Type II SS	MS	F	P

Main Effects					
Type de cu	3	1.010796e-4	3.3693e-5	231.83511	.0000***
Etat T S	1	1.536216e-4	1.5362e-4	1057.0348	.0000***
Interaction					
Type de cu * Etat T S	3	6.8691e-6	2.2897e-6	15.754898	.0000***
Error	16	2.325321e-6	1.4533e-7->		

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : MIOUAT Imene
SEGHIR Adel

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie et Physiologie Végétale

Effet potentiels et mécanismes d'action antioxydants chez (*Triticosecale Wittmack*) et (*Hordeum vulgare L*) induit par un stress hydrique.

Résumé

Dans ce travail, on a étudié les caractéristiques biochimiques et l'effet des mécanismes d'action antioxydant chez le triticale et l'orge induits par le stress hydrique. Les paramètres mesurés ont été réalisés au sein de faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Mentouri Constantine 1. Les dosages sont : La glycine bétaine, le malonedialdéhyde (MDA), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les protéines, les polyphénols et les flavonoïdes.

Les résultats de cette étude révèlent un niveau élevé de variabilité pour les principales concentrations mesurées. La variabilité a été évaluée grâce à des analyses statistiques. Les résultats obtenus montrent que le stress hydrique a entraîné une production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que le rôle important des métabolites secondaires dans la défense contre le stress oxydatif causé par le stress hydrique. La concentration de la glycine bétaine, MDA, et H_2O_2 à été plus élevée dans le Triticale par les valeurs suivants (0.0143 mg/ml, 0,521 nmol/ml et 6,92 mg/ml, respectivement) par contre les polyphénols, les flavonoïdes et les protéines, on a enregistré des concentrations plus élevé chez l'orge, (9.86 mgEAG/g, 0.80 mgEQC/g et 0.159 mg/ml, respectivement).

En conclusion, l'étude a montré que les deux espèces sont tolérantes et efficaces contre les contraintes hydriques.

Mots-clefs : stress hydrique, stress oxydatif, antioxydants, Triticale, Orge.

Laboratoires de recherche : laboratoire n°13 de biologie et physiologie Végétale au niveau Université Frères Mentouri Constantine 1.

Encadreur : BOUCHARREB RADIA (MCA - UFM , Constantine 1).

Examineur 1 : CHIBANI SALIH (MCA - UFM , Constantine 1).

Examineur 2 : AOUAIDJIA NAWAL (MCB - UFM , Constantine 1).