

## Université Constantine1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et Ecologie Végétale  
Filière Sciences Biologiques

### Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en  
Biologie et Génomique Végétales

### Thème

**Etude de l'effet d'un stress oxydatif et le système  
défensif enzymatique chez le blé dur**

***(Triticum durum Desf.)***

Soutenu le : 22 juin 2014,

Présenté par : AIT YAHIA LOUIZA

ZEMMOURA HELLA DJAOUHARA

Devant le jury d'évaluation :

**Président (e) : Pr. YKHLEF Nadia.,** Professeur. Université Constantine 1.

**Encadreur : Dr. BOUSBAA Ratiba.,** Docteur. Université Constantine 1.

**Examineur : Mlle. MOUELLEF Adra.,** MAT. Université Constantine 1.

Année universitaire 2013-2014

## *DEDICACES*

*Avant de dédier ce travaille on tient d'abord  
à remercier ALLAH, le tout puissant qui  
nous a permis de mener à bien ce modeste  
travaille*

*A la mémoire de nos parents*

*Nos frères et sœurs*

*A nos familles respectives*

*« Ait yahia, Zemmoura »*

## *REMERCIEMENT*

*Au terme de cette recherche on est heureuses de pouvoir remercier tous ceux et celles qui nous ont accompagné et soutenu tout au long de cette aventure.*

*On tient à remercier sincèrement Madame **BOUSBAA RATIBA** qui s'est toujours montré à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps quelle a bien voulu nous consacrer et la grande patience dont elle a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*On tient également à remercier madame le professeur **YKHLEF NADIA** pour sa grande disponibilité et d'avoir aimablement accepter de présider ce jury, qu'elle nous soit permis de lui témoigner nos sincère et profond respect.*

*Nos sentiments profonds à Melle **MOUELLEF ADRA** qui a eu l'amabilité en nous faisant l'honneur d'examiner ce mémoire, veuillez agréer l'expression de nos reconnaissance et de nos remerciements les plus sincères.*

*Monsieur **BEL BAKRI M<sup>ed</sup>.N** et Melle **BOULDJEDJ RYMA**, on vous remercie pour votre patience, votre gentillesse de nous avoir guidées au laboratoire.*

*On remercie également très chaleureusement le responsable du laboratoire monsieur **DJEKOUN** de nous avoir permis de réalisé notre travail.*

*Un grand Merci de tout cœur à nos parents, sans qui on ne serait absolument pas où on est aujourd'hui. On les remercie sincèrement pour et leur soutien inconditionnel, de nous avoir donné de l'espoir.*

## **Résumé :**

Dans la présente étude deux génotypes de blé dur (*Triticum durum* Desf) : **Marton Dur, Djnah Khotifa** qui sont comparés entre eux pour leurs tolérance et leur réponses physiologiques et biochimiques au déficit hydrique. Le choix des niveaux d'irrigation est appliqué au stade troisième feuille. Les paramètres suivants sont mesurés : l'activité de la superoxyde dismutase SOD, la teneur en malonedialdéhyde MDA, le niveau du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la teneur en anthocyanes et la teneur en chlorophylle. Une large variabilité est enregistrée au niveau des paramètres mesurés. En outre les résultats obtenus montrent que le stress hydrique a entraîné une production de ROS chez les deux variétés et qui a été évalué par analyse spectrophotométrique. Sauf pour la teneur en chlorophylle elle a été mesurée par un SPAD. Ces résultats soulignent également le rôle important des métabolites secondaires qui sont l'anthocyane dans la défense contre le stress oxydatif, causé par les différents stress abiotiques, dans la détoxification des espèces réactif de l'oxygène (ERO) en condition de stress. Ainsi on remarque que les génotypes étudiés les meilleures valeurs des activités photochimiques et photosynthétique se trouvent chez les génotypes présentant les plus faibles valeurs du stress hydrique foliaire et racinaire qui est Marton Dur une variété introduite.

**Mots clés :** Blé dur, stress oxydatif, ROS, SOD, MDA , peroxyde d'hydrogène, anthocyanes, chlorophylle.

## **Abstract:**

In this study two genotypes of durum wheat (*Triticum durum Desf*): Marton Dur, Djnah Khotifa are compared with each other for their tolerance and their biochemical and physiological responses to water deficit. The choice of levels of irrigation is applied to the third leaf stage. The following parameters are measured: the activity of superoxide dismutase SOD, the content of malondialdehyde MDA, the level of hydrogen peroxide H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the content of anthocyanins and chlorophyll. A large variability is recorded in the parameters measured. In addition, the results show that water stress led to a ROS production in both varieties and was evaluated by spectrophotometric analysis. Except for chlorophyll content has been measured by a SPAD. These results also emphasize the important role of secondary metabolites that are anthocyanin in the defense against oxidative stress caused by abiotic stress in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) under stress conditions. Thus we see that the genotypes best values photochemical and photosynthetic activities are among the genotypes with the lowest values of leaf and root water stress is Marton Dur a variety introduced.

**Keywords:** Durum wheat, oxidative stress, ROS, SOD, MDA, hydrogen peroxide, anthocyanins, chlorophyll.

## ملخص

مع Djnah Khotifa يتم مقارنة مارتون أمامي، (Desf) في هذه الدراسة اثنتين من المورثات من القمح القاسي (قمح القاسي) يتم تطبيق اختيار مستويات الري إلى المرحلة. بعضها البعض من أجل التسامح وردودهم البيوكيميائية والفسولوجية لنقص المياه ، malondialdehyde MDA يتم قياس المعلمات التالية: نشاط الهيئة العامة للسودو ديسموتاز الفائق، ومضمون. الثالثة ورقة بالإضافة. يتم تسجيل تقلبات كبيرة في قياس المعلمات. ، محتوى الانثوسيانين والكلوروفيل H2O2 ومستوى بيروكسيد الهيدروجين باستثناء محتوى. في كل أصناف تم تقييمها من قبل والتحليل الطيفي ROS إلى ذلك، فقد بينت النتائج أن الإجهاد المائي أدى إلى إنتاج تؤكد هذه النتائج أيضا على أهمية دور المركبات الثانوية التي يتم الأنثوسيانين في الدفاع ضد الاكسدة. SPAD الكلوروفيل وقد تقاس وهكذا نرى أن أنشطة. تحت ظروف الإجهاد (ROS) التي يسببها الإجهاد غير الحيوية في إزالة السموم من أنواع الاكسجين التفاعلية المورثات أفضل القيم الضوئية والتمثيل الضوئي هي من بين الأنماط الجينية مع أدنى القيم من الإجهاد المائي ورقة والجذر مارتون هو مجموعة متنوعة أدخلت

**الكلمات الرئيسية:** القمح القاسي، الاكسدة، بيروكسيد الهيدروجين، الانثوسيانين، الكلوروفيل MDA، الهيئة العامة للسودو، ROS

# Liste des Abreviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>AGPI</b>	acides gras polyinsaturés.
<b>CAT</b>	catalase.
<b>Cu<sup>-</sup></b>	cuiivre.
<b>CuZnSOD</b>	SOD à cuivre et à zinc.
<b>ERO</b>	Espèces Réactives à l'oxygène.
<b>Fdx</b>	Ferrédoxine.
<b>FeSOD</b>	SOD à fer.
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	fer ferreux.
<b>H<sup>+</sup></b>	proton.
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène.
<b>MDA</b>	Malondialdehyde.
<b>MnSOD</b>	SOD à manganèse.
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène.
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anion super oxyde.
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	oxygène singulet.
<b>OH<sup>•</sup></b>	anion hydroxyl.
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	peroxynitrite.
<b>POX</b>	catalase et les peroxydases
<b>PS</b>	Photosystème
<b>PSI</b>	Photosystème I
<b>PSII</b>	Photosystème II.
<b>SOD</b>	Super oxyde Dismutase
<b>TBARS</b>	acides thiobarbiturique

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Espèces réactives de l'oxygène radicalaire et non radicalaire.....	5
<b>Tableau 2 :</b> Origine et localisation des espèces réactives de l'oxygène.....	8
<b>Tableau 3 :</b> Les types de superoxyde dismutase.....	18
<b>Tableau 4 :</b> Les variétés étudiées et leurs origines.....	20
<b>Tableau 5 :</b> La constitution du milieu réactionnel.....	22
<b>Tableau 6 :</b> comparaison des moyennes de la teneur en chlorophylle à partir de trois traitements de stress hydrique appliqué aux deux variétés de blé dur.....	33
<b>Tableau 7 :</b> test de NEWMAN-KEULS de la teneur en chlorophylle chez les deux variétés pour le facteur stress.....	34

# Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées(ROS) et les antioxydants .....	3
<b>Figure 2</b> : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie.....	6
<b>Figure 3</b> : Représentation du transport d'électrons photosynthétique.....	10
<b>Figure 4</b> : Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons de la membrane mitochondriale interne.....	11
<b>Figure 5</b> : Voie de production de superoxyde par le système de transport d'électrons du cytochrome P450.....	13
<b>Figure 6</b> : Prise de mesure de l'absorbance.....	22
<b>Figure 7</b> : Le filtrage.....	24
<b>Figure 8</b> : Mesure de l'activité enzymatique du SOD chez deux variétés de blé dur soumis à deux niveaux de stress hydrique (24h et 48h), V1=Marton Dur, V2= Djenah Khotifa.....	27
<b>Figure 9</b> : Teneurs en malondialdéhyde (MDA) dans les feuilles et les racines de deux variété de blé dur V1= Marton Dur, V2= Djenah Khotifa, soumis à deux niveaux de stress hydrique (24h e48h).....	28
<b>Figure 10</b> : Variation du niveau H2O2 chez deux variété de blé dur V1= Marton dur, V2=Djenah khotifa étudié sous trois niveau d'alimentation hydrique T=témoin, S1= stress de 24h, S2= stress de 48h.....	30
<b>Figure 11</b> : Variation de la teneur en anthocyanes chez les deux variétés de blé dur V1= Marton dur, V2= djnah khotifa sous trois régimes hydrique T=témoin, S1= stress de 24h, S2= stress de 48h.....	31
<b>Figure 12</b> : Variation du taux de chlorophylle en fonction du stress appliqué chez les deux variétés étudiées....	33

# Sommaire

Introduction.....	01
<b>CHAPITRE I : Revues bibliographiques</b>	
1. Le blé dur <i>Triticum durum</i> Desf.....	02
2. Définition du stress oxydatif.....	03
3. Définition des espèces réactives de l'oxygène.....	04
3.1. Radicaux libres.....	04
3.2. Formation des espèces réactives de l'oxygène.....	05
3.2.1. Anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ).....	06
3.2.2. Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).....	07
3.2.3. Radical hydroxyle ( $O^{\circ}$ ).....	07
3.3. Sources des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule végétale.....	08
3.3.1. Chloroplastes et l'appareil photosynthétique.....	08
3.3.2. Mitochondries et chaîne respiratoire.....	10
3.3.3. Peroxysomes.....	12
4. Conséquences du stress oxydatif.....	13
4.1. Peroxydation lipidiques.....	13
4.1.1. Intérêt du dosage du malonedialdéhyde (MDA).....	14
4.2. Oxydation des protéines.....	14
4.3. Dommage de l'ADN.....	15
5. Mécanismes d'adaptations biochimiques des plantes au stress hydrique.....	16
5.1. Adaptation biochimique.....	16
5.1.1 . Les antioxydants.....	16
5.1.1.1. Systèmes de défenses antioxydants enzymatiques.....	17
A. Superoxyde dismutase (SOD).....	17
5.1.1.2. Systèmes de défense antioxydants non enzymatiques.....	19
A. Anthocyanes.....	19
6. Mécanisme d'adaptation physiologique.....	19
6.1. La teneur en chlorophylle.....	19

## CHAPITRE II : Matériel et méthodes

1. Matériel végétale.....	20
2. Conduite et organisation de l'essai.....	20
3. Expérimentation 01.....	20
3.1. Préparation des pots et semi.....	20
3.2. Détermination et application du stress hydrique.....	21
3.3. Paramètres étudiés.....	21
3.3.1. Paramètre biochimique.....	21
a. Mesure de l'activité enzymatique SOD.....	21
b. Dosage du malondialdéhyde(MDA).....	23
c. Niveau du peroxyde d'hydrogène(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	23
d. Détermination des anthocyanes.....	23
4. Expérimentation 02.....	24
4.1. Préparation et installation de l'essai.....	24
4.2. Application du stress hydrique .....	24
4.3. Paramètres étudiés.....	25
4.3.1. Paramètre physiologique.....	25
4.3.1.1. Mesure de la chlorophylle totale des feuilles.....	25
5. Traitement et analyse statistique des données.....	25

## CHAPITRE III : Résultats et discussion

1. Variation des paramètres biochimiques .....	26
1.1. Activité enzymatique SOD.....	26
1.2. Teneur en Malonedialdéhyde MDA .....	27
1.3. Niveau du peroxyde d'hydrogène H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	29
1.4. Teneur anthocyane.....	30

<b>2. Variation des paramètres physiologiques.....</b>	<b>32</b>
<b>2.1. Teneur en chlorophylle.....</b>	<b>32</b>

<b>Conclusion .....</b>	<b>35</b>
-------------------------	-----------

**Références Bibliographiques**

**Annexes**

# Introduction

## **Introduction :**

Les céréales sont une source majeure d'alimentation pour une grande partie de l'humanité, le blé dur est considéré comme une culture stratégique en Algérie. Toute fois, la croissance de cette culture et l'amélioration de son rendement sont limités par les changements climatiques.

Dans les systèmes biologiques le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) et leur destruction par des systèmes de défense antioxydants (Bonnet-Rousselot et *al.*, 2003).

Le stress oxydatif est à l'origine de plusieurs stress abiotiques (salinité, métaux lourds, stress hydrique...), d'où la mise en œuvre par la cellule végétale de plusieurs systèmes de détoxification tels que les métabolites secondaires, qui jouent un rôle crucial dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Les espèces réactives oxygénées (ERO) peuvent engendrer des dommages importants dans la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (Cadenas & Davies, 2000 ; Pincemail & *al.*, 1999).

Les plantes possèdent également de nombreux composés et enzymes capables d'empêcher la production des ERO ou de la contrôler. Parmi ces composés, nous nous sommes intéressés particulièrement à l'activité de la superoxyde dismutase pour son fort pouvoir à piéger les radicaux libres, la teneur en malondialdéhyde pour son pouvoir autant que biomarqueur du stress, ainsi que le niveau du peroxyde d'hydrogène et les anthocyanes.

La problématique de notre travail est développée au sein du Laboratoire de Génétique Biochimie équipe de Biotechnologies Végétales, visant à caractériser deux variétés de blé dur Djnah Khotifa et Marton Dur et à évaluer l'impact du stress oxydatif sur ces deux variétés leurs mécanismes de défense contre les effets néfastes des radicaux libres.

# CHAPITRE I : Revues bibliographiques

## 1- Description de la plante (blé dur *Triticum durum* Desf) :

Le blé appartient à la famille des graminées (Gramineae = Poaceae), qui comprend plus de 10000 espèces différentes (Mac Key, 2005). Plusieurs espèces de ploïdie différentes sont regroupées dans le genre *Triticum* qui est un exemple classique d'allo polyploïdie, dont les génomes homologues dérivent de l'hybridation inter espèces appartenant à la même famille (Levy et Feldman, 2002).

Le blé est un composant incontournable de l'alimentation humaine particulièrement pour les populations méditerranéennes. L'Algérie est actuellement l'un des plus gros importateurs de blé dur dans le monde. Le rendement grain national de cette culture est plus faible du bassin méditerranéen (Belaid, 2000). La culture du blé dur demeure encore difficile à maîtriser tant que celle-ci reste confrontée et soumise à plusieurs contraintes biotiques et abiotiques. Cette situation engendre une production faible et variable qui ne couvre que 30 à 35 % des besoins (Bouzerzour et al.2002) la majeure partie des emblavures se trouve localisée sur les hautes plaines caractérisées pas l'altitude, des hivers froids, un régime pluviométrique insuffisant et irrégulier. La pluviométrie et les températures sont sujet à des grandes variations intra et inter-annuelles, qui affectent sérieusement. les conditions de croissance, le développement et le rendement (Madhava Rao et al., 2006).

Le manque d'eau reste le facteur le plus limitant auquel fait face la culture du blé dur, tout progrès sensible des agro système basés sur cette culture, dans l'étage bioclimatique semi-aride semble conditionné par l'amélioration de l'efficience de l'eau (Richards et al.1997). La variation des rendements en grains du blé dur (*Triticum durum* Desf.) des zones semi-arides d'altitude tire son origine en grande partie des effets des contraintes abiotiques de nature hydrique qui cause principalement un stress oxydant.

## 2- Définition du stress oxydant :

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) et leur destruction par des systèmes de défense antioxydants (Bonfont-Rousselot *et al.*, 2003).

Les espèces réactives oxygénées (ERO) peuvent engendrer des dommages importants dans la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (Cadenas & Davies, 2000 ; Pincemail & *al.*, 1999).

Dans les conditions quotidiennes normales, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydant/ anti-oxydants est en équilibre. 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) (Figure 1).

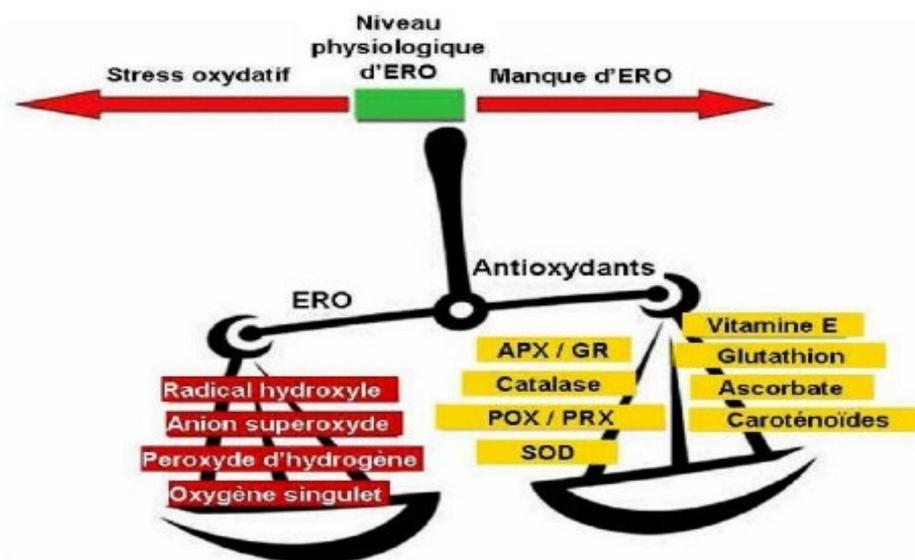


Figure 1 : Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées(ROS) et les antioxydants (Pourrut, 2008).

### 3- Définition des espèces réactives de l'oxygène :

L'oxygène représente, après l'azote, le deuxième élément le plus abondant dans l'atmosphère (21%). Il est indispensable à la vie des organismes aérobies. Ces organismes utilisent l'oxygène pour oxyder les substrats riches en carbone et en hydrogène. Cependant, quand on oxyde les molécules avec l'oxygène, ce dernier est réduit et forme des intermédiaires radicalaires, très réactifs connus sous le nom d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces ERO comprennent des radicaux tels l'anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) ou le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ) (Garrel *et al.* 2007 ; Simonian and Coyle 1996)

#### 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 appairer 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 (Bonnefont-Rousselot *et al.*, 2003) (**Tableau 1**).

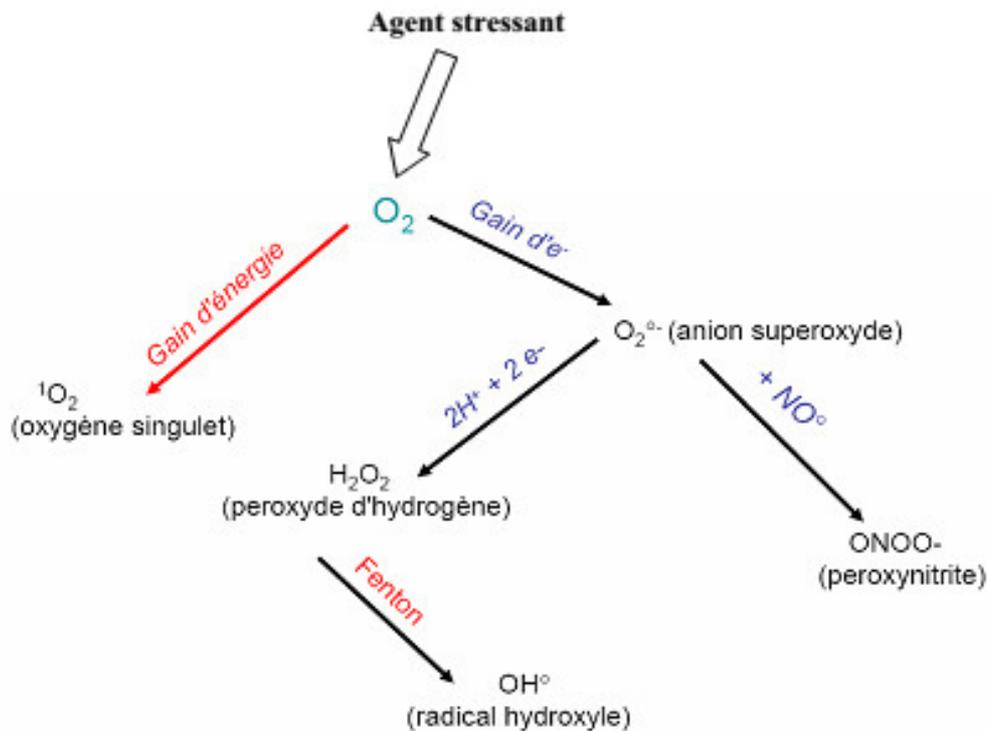
**Tableau 1 : Espèces réactives de l'oxygène radicalaire et non radicalaire (Halliwell, 2006)**

<b>ERO (radicalaire)</b>	<b>Formule chimique</b>
Oxygène moléculaire	$^3O_2$
Dioxygène singulet	$^1O_2$
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$
Radical hydroxyle	$^{\cdot}OH$
Radical hydroperoxyde	$HOO^{\cdot}$
Radical peroxyde	$ROO^{\cdot}$
Radical alkoxyde	$RO^{\cdot}$
Radical oxyde nitrique	$NO^{\cdot}$
Peroxinitrite	$ONOO^{\cdot}$
<b>ERO (non radicalaires)</b>	<b>Formule chimique</b>
Hydroperoxyde	$ROOH$
Hypochlorite	$ClOH$
Ozone	$O_3$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$

### 3-2. Formation des espèces réactives de l'oxygène :

Le métabolisme chez les végétaux produits à l'état physiologique plusieurs variétés d'ERO (**Figure 2**). Dans le cas d'un stress oxydatif, tous les ROS ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Parmi les radicaux formés chez les végétaux on distingue (Smirnoff, 2005) :

- ❖ Anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ )
- ❖ Peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )
- ❖ Radical hydroxyle ( $H O^{\circ}$ )



**Figure 2 : Schéma modifié de l'origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Thèse de Salem Amara, 2007).**

### 3-2.1. Anion superoxyde ( $O_2^{\circ-}$ ) :

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 (réaction1).



### 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  $Cu^{2+}$ ), 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).**



### 3-2.3. Radical hydroxyle ( $^{\circ}\text{OH}$ ) :

Le radical hydroxyle ( $^{\circ}\text{OH}$ ) 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 superoxide selon la réaction de Haber Weiss (réaction 4).



### 3-3. Sources des espèces réactives de l'oxygène 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 (**Tableau 2**), 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 2 : Origine et localisation des espèces réactives de l'oxygène (Smirnoff, 2005)**

Origine	Localisation	ERO
Photosynthèse, PSI ou PSII	Chloroplaste	$\text{O}_2^{\circ}$
Respiration (transport d'électrons)	Mitochondrie	$\text{O}_2^{\circ}$
Glycolate oxydase	Peroxysome	$\text{H}_2\text{O}_2$
Chlorophylles excitées	chloroplaste	$\text{O}_2^{\circ}$
NADPH oxydase	Membrane cellulaire	$\text{O}_2^{\circ}$
$\beta$ -oxydation des acides gras	Peroxysome	$\text{H}_2\text{O}_2$
Oxalate oxydase	Apoplaste	$\text{H}_2\text{O}_2$
Xanthine oxydase	Peroxysome	$\text{O}_2^{\circ}$
Peroxydases, $\text{Mn}^{2+}$ et NADH	Membrane cellulaire	$\text{H}_2\text{O}_2$
Amine oxydase	Apoplaste	$\text{H}_2\text{O}_2, \text{O}_2^{\circ}$

### 3-3.1. Chloroplastes et l'appareil photosynthétique :

Le chloroplaste est souvent considéré comme étant la principale source des ROS chez les organismes photosynthétiques (Foyer & Noctor, 2003 ; Edreva, 2005 ; Asada, 2006). En effet, de nombreuses situations de stress abiotiques entraînent une inhibition de la photosynthèse et les électrons qui ne participent plus à la fixation du CO<sub>2</sub> vont entraîner la production et l'accumulation de ROS. Un processus qui permet aux plantes de synthétiser des glucides en exploitant l'énergie lumineuse et le CO<sub>2</sub> atmosphérique. Toutefois, ce processus indispensable à une vie photo autotrophe est également producteur d'espèces réactives de l'oxygène (**Figure 3**).

La première source de ROS se situe au niveau du photosystème II (PSII). Au niveau du centre réactionnel, l'absorption d'un photon par la chlorophylle permet d'augmenter son énergie et libérer ainsi rapidement un électron, qui sera ensuite transférés vers une chaîne de transporteurs d'électrons de la membrane des thylakoïdes. La chlorophylle se retrouve à l'état triplet excité (Chl\*) et peut ainsi réagir avec l'oxygène moléculaire pour former de l'oxygène singulet (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) fortement oxydant (Macpherson et *al.*, 1993; Telfer et *al.*, 1994).

L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) est produit dans les chloroplastes au niveau du photosystème I (PSI) (Asada, 2006) et du photosystème II (PSII) (Zhang et *al.*, 2003). Normalement, le flux d'électrons provenant du centre réactionnel PSI est dirigé vers l'accepteur NADP<sup>+</sup>, qui, une fois réduit, participe à la réduction du CO<sub>2</sub> au niveau du cycle de Calvin. Lorsque ce flux d'électrons est trop important, il est redirigé vers la Ferrédoxine (Fdx) qui utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur d'électrons, ce qui conduit à la formation importante d'anion superoxyde au niveau du site de réduction du PSI (réaction de Mehler) (Laisk and Edwards, 1998; Asada, 1999).

Une production de superoxyde est également possible au niveau du PSII, avec la réduction de l'oxygène moléculaire par les plastoquinones QA (Cleland and Grace, 1999; Navari-Izzo et *al.*, 1999), et QB (Zhang et *al.*, 2003). Bien que cette source de O<sub>2</sub><sup>-</sup> au niveau du PSII ne cause pas de dommage direct aux protéines D1 et D2 (les deux sous unités majeures du centre réactionnel du PSII) ni aux pigments (Davies, 1987; Liu et *al.*, 2004), il est possible que cela influence d'autres sous unités du PSII. Le PSI est généralement considéré comme la source majeure d'O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Une fois produit, ce superoxyde se transforme, spontanément ou par l'action de superoxyde dismutases, en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans le stroma (Edreva, 2005). Ce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

pourra à son tour être transformé en  $\text{OH}^\bullet$  en présence de  $\text{Fe}^{2+}$  par la réaction de Fenton. Ou bien être transformé en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et  $\text{O}_2$ .

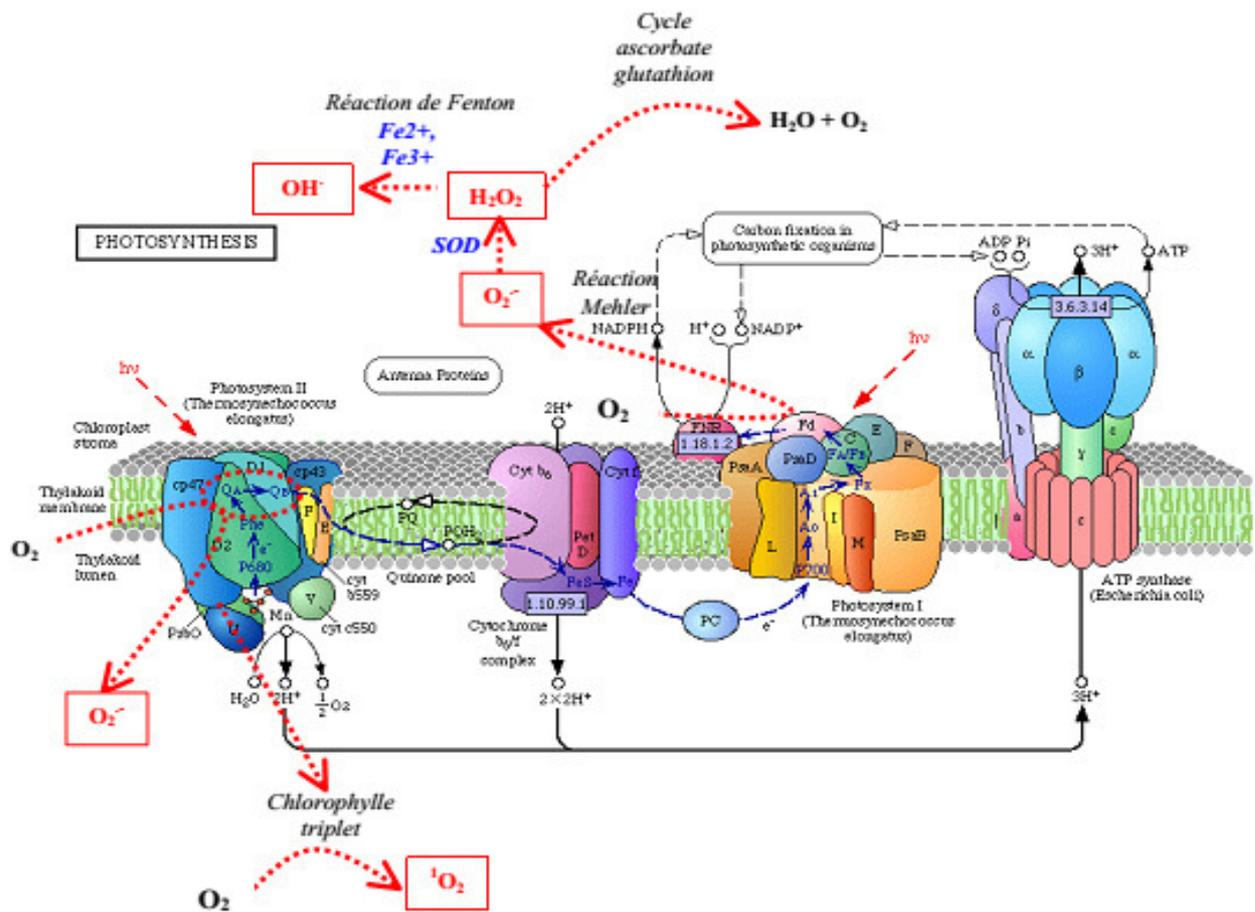


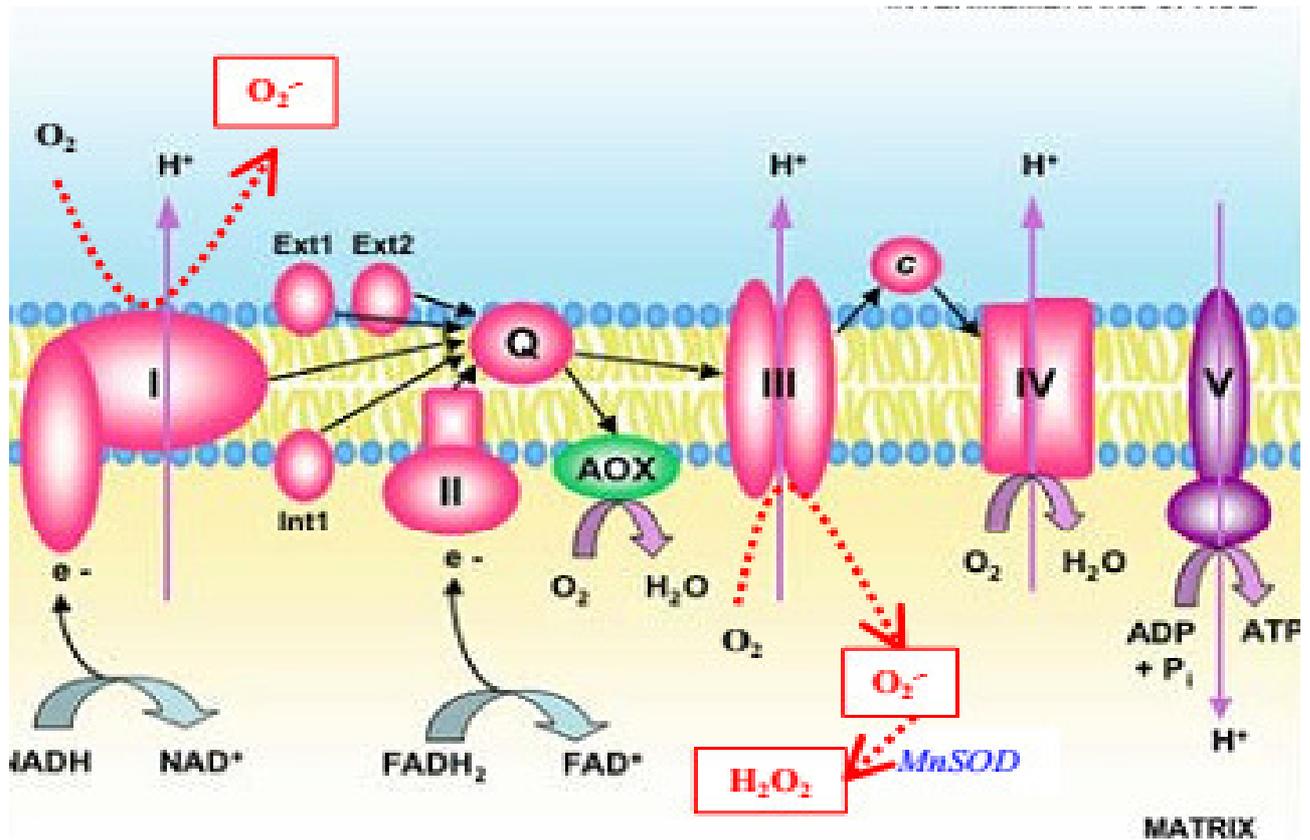
Figure 3 : Représentation du transport d'électrons photosynthétique, source d'espèces réactives de l'oxygène (d'après KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

### 3-3.2. Mitochondries et chaîne respiratoire :

Les mitochondries jouent un rôle primordial dans la bio-énergétique des cellules, grâce au processus de respiration situé au niveau de leur membrane interne. Ce processus, rassemblant des complexes protéiques qui assurent un transfert de protons et/ou d'électrons, est appelé chaîne respiratoire (Figure 4).

Les mitochondries représentent néanmoins une source significative de ROS dans les cellules, même lors du fonctionnement normal de l'organisme. En effet, une part de l'oxygène

consommé par les cellules est convertie en ion superoxyde. Becker (2004) a montré qu'environ 5% de l' $O_2$  absorbé était transformé en superoxyde, alors que le restant était consommé par la respiration et réduit en eau.



**Figure 4 : Représentation schématique de la chaîne de transfert des électrons de la membrane mitochondriale interne (d'après Foyer and Noctor, 2000)**

Cette production est causée par la fuite des électrons inhérente au fonctionnement même de la chaîne respiratoire et à leur fixation sur l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ), qui conduit à la réduction incomplète de l' $O_2$  et à la formation de ROS (Brookes, 2005). Cette fuite d'électrons se fait au niveau de la NADH déshydrogénase appartenant au complexe I (Turrens and Boveris, 1980), ainsi qu'au niveau du cytochrome bc1 du complexe III (Rich and Bonner, 1978). Cette production de ROS est indissociable du processus respiratoire et fortement modulée par les conditions environnementales (Moller, 2001). Le superoxyde formé sera ensuite rapidement transformé en  $H_2O_2$  par dismutation spontanée ou par action de la SOD mitochondriale

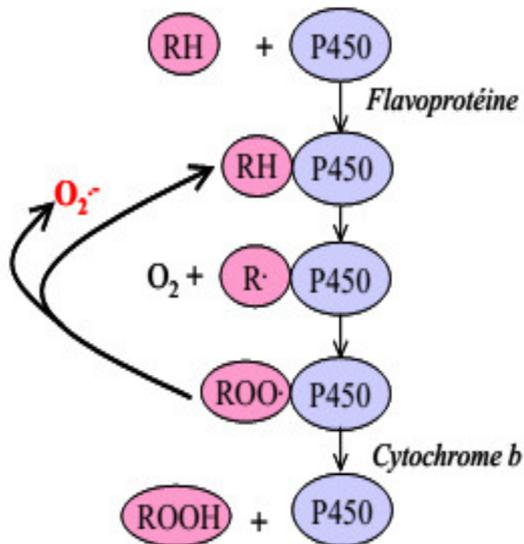
(Boveris and Chance, 1973; Loschen et al., 1974). La contribution des mitochondries dans la production de ROS dans les tissus photosynthétiques des plantes semble être plus faible que celle des mitochondries des cellules animales, où elle est considérée comme étant la source principale de ROS (Purvis, 1997).

### 3-3.3. Les peroxysomes :

Les peroxysomes sont impliqués, selon leur localisation tissulaire, dans un grand nombre de fonctions cellulaires essentielles (del Rio et al., 2002). Les peroxysomes situés dans les tissus de stockage et les graines (appelés glyoxysomes) sont spécialisés dans la dégradation des lipides de réserves et dans leur transformation en acides organiques pour la respiration et la néoglucogenèse (Tolbert, 1981; Beevers, 1982; Huang et al., 1983). Ceux présents au niveau des feuilles sont plutôt spécialisés dans la photorespiration (Tolbert, 1981; Douce et Heldt, 2000). Les peroxysomes sont également responsables de la détoxification de substances organiques toxiques par l'action d'oxydases, ou de molécules de peroxyde d'hydrogène via des catalases (Schrader and Fahimi, 2006).

Comme dans le cas des chloroplastes et des mitochondries, le métabolisme normal des peroxysomes est à l'origine d'une production de ROS. Deux sites de production de superoxyde ont été identifiés. Le premier concerne le catabolisme de la xanthine, essentiel au turnover des nucléotides, de l'ARN et de l'ADN (Corpas et al., 1993; del Rio et al., 1998). Le superoxyde est produit lors de l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine en acide urique par la xanthine oxydase (Fridovich, 1986). Le second site de production de  $O_2^-$  implique une chaîne de transport d'électrons située au niveau des membranes peroxysomales (Fang et al., 1987; Delrio et al., 1989; Struglics et al., 1993), permettant la régénération de  $NAD^+$  et  $NADP^+$ , essentiels au métabolisme oxydatif présent dans les peroxysomes (del Rio et al., 2003). Il existe également plusieurs sources de  $H_2O_2$  dans les peroxysomes. La première résulte de la photorespiration active à la lumière, et dont l'intensité est fonction de l'activité photosynthétique de la plante. L'enzyme Rubisco, qui permet la fixation du  $CO_2$  dans le cycle de Calvin, peut en effet réagir avec l' $O_2$  présent dans les chloroplastes. Le produit de cette oxygénation est ensuite exporté dans les peroxysomes et impliqué dans des réactions qui entraînent la production de  $H_2O_2$ , au cours de la transformation du glycolate en glyoxylate par la glycolate oxydase (**Figure 5**) (Foyer, 1996). Noctor et al. (2002) ont décrit les peroxysomes comme étant les principaux producteurs de  $H_2O_2$  chez les plantes au cours de la

photorespiration, avec un taux deux fois supérieur à celui des chloroplastes et 50 fois supérieur à celui des mitochondries.



**Figure 5 : Voie de production de superoxyde par le système de transport d'électrons du cytochrome P450. Le substrat organique est représenté par RH. (d'après Bryan D and McKersie, 1996)**

#### 4- Conséquences du stress oxydatif :

Les dommages induits par les ROS sont : une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines, des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité, voire à la mort cellulaire notamment par l'intermédiaire de l'apoptose (mort cellulaire programmée).

##### 4.1. Peroxydation lipidique (lipoperoxydation) :

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Hulbertl, 2005 ; Pamplona et al, 2000).

L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes (Hong *et al.*, 2004). Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN (Marnett, 1999). Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malonedialdéhyde (MDA), le acides thiobarbiturique (TBARS) qui sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique.

#### **4.1.1. Intérêt du dosage du malonedialdéhyde (MDA) :**

Le malonedialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides et dont la teneur est en relation étroite avec les dégradations de la membrane cellulaire, permet de monter l'effet d'une pénétration d'un xénobiotique dans l'organisme. Ce paramètre constitue un indicateur précoce d'une agression toxique et par conséquent il peut être utilisé comme biomarqueur du stress oxydatif (Ladhar-Chaabouni *et al.* 2007 ; Funes *et al.* 2005 ; Giguère *et al.* 2003).

Les radicaux libres en particulier les radicaux hydroxyles, sont susceptibles d'interagir au niveau des doubles liaisons C=C avec les chaînes d'acides gras polyinsaturés qui constituent le double feuillet phospholipidique des membranes (Bonfont-Rousselot, 1994). Ils entraînent alors la peroxydation des acides gras polyinsaturés (Gutteridge et Halliwell, 1990) provoquant une désorganisation membranaire pouvant aboutir à la lyse cellulaire. Les hydroperoxydes lipidiques formés sont dégradés principalement en malonedialdéhyde (MDA) (Chaudhary *et al.* 1996) qui réagissent de manière covalente avec les protéines et les inactivent.

#### **4.2. Oxydation des protéines :**

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Cette oxydation provoque l'introduction d'un groupe carbonyle dans la protéine (Levine, 2002 ; Peng *et al.*, 2000). Ces réactions d'oxydation, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu<sup>2+</sup> et le Fe<sup>2+</sup>, peuvent être classées en deux catégories :

1°) celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique.

2°) les modifications des peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique.

Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (Levine, 2002). L'oxydation des protéines peut être un signal pour les "protéines de stress" (Heat Shock Protein, HSP) connus pour leur rôle cyto protecteur (Welch, 1992). Ainsi, les membres de la famille de HSP70 ont un rôle de protéines chaperonnes. Elles prennent en charge les protéines dénaturées (participation à la restauration de la fonction de ces protéines) mais aussi les protéines en cours de maturation (participation à leur synthèse, à leur importation vers le réticulum endoplasmique et la mitochondrie). La synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS (Essig & Nosek, 1997).

#### **4.3. Dommages de l'ADN :**

L'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ROS. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. L'atteinte de l'ADN implique le franchissement préalable de toutes les barrières de défense mises en place par les végétaux.

Un feed-back positif est avancé pour expliquer les altérations mitochondriales:

- Une formation de bases oxydées
- Des sites abasiques qui sont une partie de l'ADN dépourvue d'une base purique ou pyrimidique et ayant perdu l'information génétique par rupture de la liaison entre une base et le désoxyribose.
- Des cassures au niveau des brins d'ADN, qui peuvent être double ou simple brin.
- Une apparition d'adduits à l'ADN. Ils correspondent à la formation de produits d'addition entre le polluant et les nucléotides, suite à la peroxydation des lipides.
- Des pontages ADN-protéines

Ces lésions au niveau de l'ADN entraînent des ruptures de chromosomes en fragments acentriques générant des micronoyaux lors de la division cellulaire.

Ce sont des entités nucléaires indépendantes qui se retrouvent hors du noyau, dans le cytosol (Lagadic & *al.*, 1997 ). Ils apparaissent sous forme de petits noyaux à côté du noyau principal.

Des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène (Beckman & Ames, 1998 ; Wong & Cortopassi, 1997).

## **5- Mécanisme d'adaptation des plantes au stress hydrique :**

Afin de lutter contre le déficit hydrique, les plantes développent des stratégies qui varient en fonction de l'espèce et des conditions du milieu. La résistance d'une plante à une contrainte hydrique peut être définie, du point de vue physiologique, par sa capacité à survivre et à s'accroître et du point de vue agronomique, par l'obtention d'un rendement plus élevé que celui des plantes sensibles (Madhava Rao et *al.*, 2006). La résistance globale d'une plante au stress hydrique apparaît comme le résultat de nombreuses modifications morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui interagissent pour permettre le maintien de la croissance, du développement et de production (Hsissou, 1994).

### **5.1. Adaptation biochimique :**

La plante réagit au stress en mettant en œuvre diverses stratégies de défense, elle perçoit un stimulus qui engendre l'émission de signaux. Ceux-ci sont transmis à l'intérieur de la cellule déclenchant l'activation de gènes codant pour des enzymes du métabolisme secondaire pour synthétiser diverses molécules de défense. (Kangasjarvi & *al.*, 1994 ; Pell et *al.*, Noctor & 1998). Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et les peroxydases (POX). Ces enzymes agissent directement sur les espèces réactives, mais leur action est parfois insuffisante.

### **5.1.1 : Les antioxydants :**

Les antioxydants au sens large représentent l'ensemble des molécules susceptibles d'inhiber directement la production, de limiter la propagation ou de détruire les ROS (Sies 1997a et Sies 1997). Ces antioxydants peuvent agir en réduisant ou en dismutant ces espèces, en les piégeant pour former un composé stable. Une fois les taux des ROS fortement baissés, les systèmes enzymatiques interviennent et permettent la réparation.

Il existe 3 types de défenses :

- Les enzymes qui existent à l'état endogène, défendent les cellules contre les radicaux libres. Les principaux systèmes enzymatiques comprennent les superoxydes dismutases (SODs), la catalase (CAT)...
- Les protéines chélatrices du fer comme la transferrine et l'hémosidérine ou du cuivre comme l'albumine. Ce système bloque les ions métalliques impliqués dans la réaction de Fenton.
- Les molécules antioxydantes ou piègeurs de radicaux libres comme la vitamine E, les caroténoïdes, les anthocyanes... ces molécules interviennent au niveau des membranes lipidiques.

#### **5.1.1.1 : Systèmes de défenses antioxydants enzymatiques :**

Les enzymes existent à l'état endogène et permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits de manière physiologique au cours du métabolisme cellulaire normal. Parmi les principaux systèmes enzymatiques on a la superoxyde dismutase SOD (Garrel *et al.* 2007 ; Harris and Hochhauser 1992 ; Harris 1992 ; Jacob *et al.* 2006 ; Menon and Goswami 2007 ; Michiels *et al.* 1994. Schuckelt *et al.* 1991).

##### **A. La superoxyde dismutase (SOD) :**

La superoxyde-dismutase (SOD) joue un rôle central dans la défense contre les ROS (Beyer *et al.*, 1991; Bowler *et al.*, 1992; Scandalios, 1993). Elle élimine, par une réaction de dismutation, l'anion superoxyde, formant à partir de deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme permet ainsi de diminuer le risque de formation de radical hydroxyle généré à partir du superoxyde au cours de la réaction de Haber-Weiss catalysée par des ions métalliques comme le fer ou le cuivre.

Les plantes possèdent de nombreuses isoformes de SOD avec une structure centrale qui a été très conservée au cours de l'évolution, et qui forme un puit hydrophobe où se glisse l'anion superoxyde (Zelko et *al.*, 2002).

Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal situé au cœur de l'enzyme. Sa nature permet de différencier trois groupes d'enzymes : la Mn-SOD majoritairement présente dans les mitochondries et les peroxysomes, mais également dans le cytosol (Bowler et *al.*, 1989; del Rio et *al.*, 1998; Hernandez et *al.*, 2000), la Cu/ZnSOD présente dans le cytosol, ainsi que dans les mitochondries et les chloroplastes (Hernandez et *al.*, 1994) et la Fe-SOD localisée dans le cytosol, mais également dans les chloroplastes, mitochondries et peroxysomes (Becana et *al.*, 1986; Droillard and Paulin, 1990; Gomez et *al.*, 1999). Il est intéressant de mentionner que c'est la découverte de ces deux derniers types de SOD, qui a permis de démontrer pour la première fois l'existence des radicaux libres, existence jusque là supposée totalement impossible du fait de leur fort potentiel réactif. Ainsi, c'est en démontrant l'existence de puissants systèmes antioxydants enzymatiques, que McCord et Fridovich (1969a, 1969 b, 1970) ont placé pour la première fois le stress oxydatif au cœur de la compréhension du fonctionnement cellulaire (McCord and Fridovich, 1969, 1969, 1970). De nombreuses études utilisent aujourd'hui des plantes transgéniques ou des clones surexprimants des ADNc de SOD (Bowler et *al.*, 1991; Perl et *al.*, 1993) et présentant une augmentation de l'activité enzymatique correspondante. Certaines de ces expérimentations ont abouti à une amélioration de la tolérance au stress oxydatif (Bowler et *al.*, 1991; Gupta et *al.*, 1993; Perl et *al.*, 1993), mais ce n'est pas toujours le cas (Tepperman and Dunsmuir, 1990; Pitcher et *al.*, 1991). Ces variations de réponse des plantes transgéniques pourraient provenir d'un déséquilibre entre les activités SOD et les enzymes de détoxification du peroxyde d'hydrogène, telles que l'ascorbate peroxydase, la catalase ou la glutathion réductase. En effet, si l'activité des SOD n'est pas couplée à une activité suffisante de ces enzymes, cela conduit à une augmentation d' $H_2O_2$  qui, en présence de métaux de transition, pourra conduire à la production de radical hydroxyle.

**Tableau 3 : Les types de superoxyde dismutase**

<b>Superoxyde dismutase</b>	<b>localisation intracellulaire</b>	<b>référence</b>
<b>Cu/Zn-SOD</b>	cytosol	<b>Duke &amp; Salin, 1983; Bowler &amp; al., 1994</b>
<b>Fe-SOD</b>	chloroplastes, (détectable dans mitochondries et le cytosol)	<b>Salin, 1988; Bowler &amp; al., 1994; Asada, 2000</b>
<b>Mn-SOD</b>	exclusivement mitochondriales	<b>Bowler &amp; al., 1994; Del Rio et al., 2003</b>

### **5.1.1.2 : Systèmes de défenses antioxydants non enzymatiques**

#### **A. Les anthocyanes**

Les anthocyanes sont des molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et qui sont capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes e bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des bais rouges, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplis d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont du aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (Bassas et al, 2007).

## **6 -Mécanisme d'adaptation physiologique :**

### **6.1. La teneur en chlorophylle :**

La chlorophylle est un pigment végétal responsable de la coloration verte des plantes. Ce pigment, que l'on retrouve dans les cellules des végétaux, est utilisé avec d'autres pigments par les plantes pour effectuer la photosynthèse. Ce processus permet à la plante d'utiliser l'énergie du soleil pour convertir le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et l'eau en oxygène et en matière organique.

Il existe plusieurs pigments photosynthétiques (chlorophylle a, b, c, carotène, xanthophylle) mais le pigment le plus commun est la chlorophylle a, car on en retrouve dans toutes les plantes, les algues et les cyanobactéries.

Lors d'un stress hydrique, une diminution de la teneur en chlorophylle est remarquée chez le blé dur (Bousba et *al.*, 2009). Pour limiter les pertes en eau par évaporation et aussi l'augmentation de la résistance à l'entrée du CO<sub>2</sub> atmosphérique nécessaire à la photosynthèse, l'économie de l'eau se traduit par une turgescence relative moins affectée par le stress conduisant à une dilution de la chlorophylle (Slayter ,1974).

# CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

## 1. Matériel végétal :

L'étude a porté sur deux variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf) d'origine locale et introduite. Les semences utilisées sont répertoriés selon le catalogue officiel de l'ITGC de la station expérimentale de Khroub, constantine (Tableau 4).

**Tableau 4 : Les variétés étudiées et leurs origines.**

Variétés	code	origine
Djenah khetalfa	DK	Algérie (ITGC).
Marthon dur	MD	Amélioré

## 2. Conduite et organisation de l'essai :

Deux expérimentations contrôlées ont été menées, la première sous serre et la deuxième en chambre de culture (culture hydroponique). Ces deux essais ont été réalisés au niveau du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV) à Chaabet El Rsas, Université Constantine1.

## 3. Expérimentation 01 :

### 3.1 Préparation des pots et le semi :

Les semences ont été désinfectées dans une solution d'eau de javel à 10% puis ils ont été rincés 3 fois avec de l'eau distillée, Le repiquage a été effectué le 23 janvier 2014 dans des bacs de germinations sur un papier absorbant pendant 10 jours dans des conditions ambiantes : température variante entre 20-25°C et à l'obscurité.

Les semences germées ont été ensuite repiquées dans des pots. Chaque pot contient un mélange de sol / sable avec des proportions 3 :1.

### **3.2 application du stress hydrique :**

Les pots ont été placés sous serre, ils sont irrigués régulièrement 3 fois par semaine jusqu'à obtention du stade troisième feuille.

Les plantes ont été soumises à trois régimes hydriques à raison de trois répétitions pour chaque traitement.

- Témoin (T) : les plantules sont irriguées à la capacité au champ.
- Stress niveau 1 (S1) : stress appliqué avec arrêt d'irrigation pendant 24h
- Stress niveau 2 (S2) : stress appliqué avec arrêt d'irrigation pendant 44h
- 

### **3.3 . Paramètres étudiés**

#### **3.3.1. Paramètres biochimiques**

##### **a. Mesure de l'activité enzymatique SOD**

L'extraction a été réalisée avec 50 à 100mg de feuille et racine dans l'azote liquide, puis broyées mécaniquement à l'aide d'un mortier, ensuite les tubes sont conservés à -20° afin d'empêcher la dégradation des enzymes jusqu'à utilisation.

Les feuilles et racines sont récupérées et mis dans une solution tampon d'extraction Tris-HCL PH =7.8 (annexe.04), puis refroidie à 4°C. L'homogénat est centrifugé à froid pendant 15minutes à 10.000 rpm. Le surnageant ainsi obtenu est utilisé en tant que source de superoxyde dismutase.

L'activité superoxyde dismutase (SOD) est déterminée en utilisant la méthode de Beauchamp et Fridovich (1971), qui mesure par spectrophotométrie à 560 nm l'inhibition de la réduction photochimique du nitrobleu de tétrazolium (NBT). Une unité d'activité SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour une inhibition de 50% du taux de réduction du NBT. Le milieu réactionnel est constitué de :

**Tableau 5 : La constitution du milieu réactionnel.**

Réactifs	Echantillon	Témoin
Solution tampon de phosphate de potassium (annexe.01) 0.067 M , ph=7,8 (ml)	2,55	2,55
Solution d'EDTA disodique (annexe.02) 0.1 M, ph=7.8 (ml)	0,20	0,20
Extrait enzymatique : liquide de culture	0,10	0,10
Solution de NitroBleu Tertrazolium(NBT) (annexe.03) 1,5 mM	0 ,1	0,1
Solution de riboflavine 0,12 mM	0,05	0,05

L'échantillon et le témoin sont exposés à l'illumination, 5 minutes exactement, devant une lampe à néon, à une distance de 10 cm .On procède à la lecture des extinctions (absorbances) de l'échantillon et du témoin, à 560 nm, comparées à celles de l'eau distillée.



**Figure 6 : Prise de mesure de l'absorbance par un spectrophotomètre.**

### **b. Dosage du malonedialdéhyde (MDA) :**

Les feuilles et racines sont mises dans une solution tampon d'extraction TCA (annexe.05) 1% sous haute. L'homogénat est centrifugé à froid, 5min à 10.000 rpm.

Le surnageant ainsi obtenu est utilisé en tant que source de MDA.

La mesure de la concentration des MDA est déterminée en prenant 4ml de TCA à 20% TBA 0,5%. Puis on ajoute 1 ml de surnageant, le tout est placé pendant 30min dans un bain marie 95% .pour arrêter la réaction, les tubes sont placés dans la glace puis centrifuger à 10.000 rpm pendant 10 min. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 532 nm puis à 600 nm.

### **c. Niveau du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) :**

Le niveau du peroxyde d'hydrogène a été mesuré colorimétriquement décrite par jana and choudhuri 1991, la méthode consiste à prendre 50 mg du matériel végétale (feuille et racine), homogénéiser dans 3ml du tampon phosphate (ph=6,5). L'homogénat est centrifugé à froid, 25min à 6.000 rmp.

Le surnageant ainsi obtenu est utilisé en tant que source du niveau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Le niveau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est déterminé en ajoutant à 3ml de l'extrait 1ml de titanium sulphate.

L'intensité de la couleur jaune du surnageant est mesurée à 410 nm.

### **d. Détermination des anthocyanes :**

Selon le protocole décrit par Eryilmaz, 2006, les feuilles et racines sont homogénéisé dans 3ml de méthanol-HCL (HCL à 1%)

Les échantillons ont été laissés à 4° C au réfrigérateur pendant 48h.

L'extrait étant filtré est utilisé en tant que source des anthocyanes.

La teneur en anthocyanes a été mesurée par spectrophotomètre à 530 nm et 657 nm.



**Figure 7 : Le Filtrage.**

#### **4. Expérimentation 02 :**

La deuxième expérience est réalisée sur milieu hydroponique dans une chambre de culture sous des conditions contrôlées avec une photopériode de 16h et une intensité de 8000 lux et une température de 25°C.

##### **4.1. Préparation et installation de l'essai :**

Les semences ont été désinfectées dans une solution d'eau de javel à 10% puis ils ont été rincés 3 fois avec de l'eau distillée, Le semis a été effectué le 03 mai 2014 dans des bacs de germinations sur un papier absorbant dans des conditions ambiantes : température variante entre 20-25°C et à l'obscurité. Les semences germées ont été ensuite repiquées dans des pots. Chaque pot contient du sable.

##### **4.2. Application du stress hydrique :**

Les pots ont été placés dans des bacs contenant la solution nutritive (annexe.06) pendant 15 jours jusqu'à obtention de la troisième feuille.

Les plantes ont été soumises à trois régimes hydriques à raison de trois répétitions pour chaque traitement.

- Témoin (T) : les plantules sont laissées dans la solution nutritive.
- Stress niveau 1 (S1) : les plantes sont privées de solution nutritive pendant 2h.
- Stress niveau 2 (S2) : les plantes sont privées de solution nutritive pendant 4h.
- Stress niveau 3 (S3) : les plantes sont privées de solution nutritive pendant 6h.

#### **4.3. Paramètres étudiés :**

##### **4.3.1 : Paramètres physiologiques :**

###### **a. Mesure de la chlorophylle totale des feuilles:**

La quantité de la chlorophylle totale des feuilles a été mesurée à l'aide d'une chlorophylle mètre SPAD 502 de Minolta . L'appareil a la forme d'une pince qui mémorise jusqu'à 30 mesures, Les valeurs retrouvées se situent entre 0 et 50 (unités SPAD). Le chlorophylle mètre est utilisé pour évaluer la teneur en azote des feuilles. Trois prises de mesure sont effectuées au niveau de la feuille. La moyenne des trois valeurs s'affiche sur l'écran à la fin (unité SPAD). Sachant que le temps de chaque mesure est de l'ordre de deux secondes.

Les mesures ont été effectuées à trois durées différentes (2h00, 4h00 et 6h00) sur trois feuilles situées sur la partie médiane de la plante.

#### **5. Traitement et analyse statistique des données :**

L'analyse des données des paramètres étudiés ainsi que le calcul des moyennes et la conception des graphiques ont réalisés à l'aide du tableur Excel 2007 pour windows.

Les résultats sont présentés sous forme d'histogrammes et des courbes, rejoignent le plus souvent des valeurs moyennes et leur écartypes. L'analyse de la variance (ANOVA) à deux facteurs de classification on été utilisés, le facteur variété, facteur traitement et leur interaction. Et les groupes homogènes ont été réalisée par l'utilisation d'un logiciel spécifique « Statistica. 7 » en utilisant le test de NEWMAN-KEULS.

# CHAPITRE III : Resultats et Discussion

Les données traitées dans le cadre de cette étude concernent les paramètres biochimiques (l'activité enzymatique) et physiologiques (la teneur en chlorophylle).

## **1. Variation des paramètres biochimiques :**

### **1.1. Activité enzymatique SOD :**

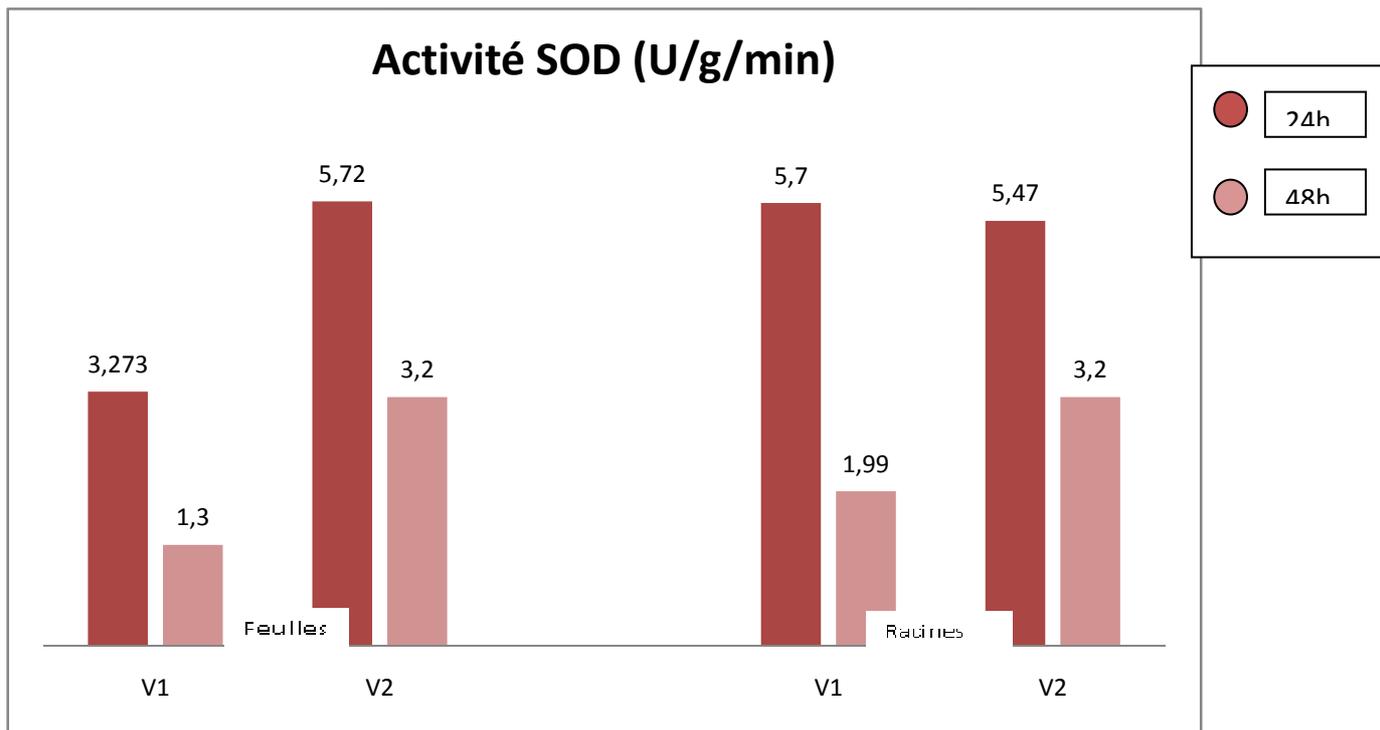
La superoxyde dismutase est une métallo enzyme produite de façon endogène dans toutes les cellules aérobies. Elle catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène.

Dans ce travail, L'activité du SOD varie d'une variété à une autre et d'un organe à un autre. L'analyse de l'activité de cette enzyme montre que cette dernière est stimulées dès l'installation du stress hydrique (24h) chez les deux variétés étudiées , cette activité atteint son maximum à 24 h puis elle diminue en 48h , cela laisse suggérer que l'accumulation de ROS intracellulaires en situation de stress environnementaux conduit à l'activation de mécanismes de défense, par augmentation d'activités enzymatiques anti oxydantes, notamment la SOD , qui est reconnue comme la première ligne de défense contre les ROS.

Cependant, au niveau des feuilles on remarque que la valeur maximale est enregistrée chez le génotype locale Djnah Khotifa avec une activité de 5.72 U/g/min en 24h, et une activité de 3.2 U/g/min en 48h, alors que la valeur minimale est enregistrée chez le génotype Marton Dur qui marque une activité de l'ordre de 3.27 U/g/min en 24h, et 1.3 U/g/min en 48h **(Figure 8)**.

Au niveau des racines les deux variétés marquent des valeurs proches en 24h variant de 5.47 U/g/min à 5.7 U/g/min. En 48h les valeurs varient de 1.99 U/g/min à 3.2 U/g/min.

Dans cette étude on remarque que l'activité du SOD est plus importante dans les racines des deux variétés comparativement aux feuilles, Cela pourrait être expliqué par l'installation du manque d'eau au niveau de la partie racinaire. Ces constatations sont en accord avec ceux rapportées par Schützendübel et *al.*, (2001) qui ont montré une importante activité de cette enzyme dans la partie racinaire.



**Figure 8 : Mesure de l'activité enzymatique du SOD chez deux variétés de blé dur soumis à deux niveaux de stress hydrique (24h et 48h), V1=Marton Dur;, V2= Djenah Khotifa.**

### **1.2.La teneur en malondialdéhyde MDA :**

Lors d'un stress oxydatif le MDA est formé à partir d'une auto oxydation et d'une dégradation des acides gras polyinsaturé dans les cellules, Afin d'estimer la peroxydation des lipides dans les membranes et le système biologique on procède par le dosage du MDA par spectrophotomètre.

La teneur en MDA varie d'une variété à une autre et d'un organe à un autre.

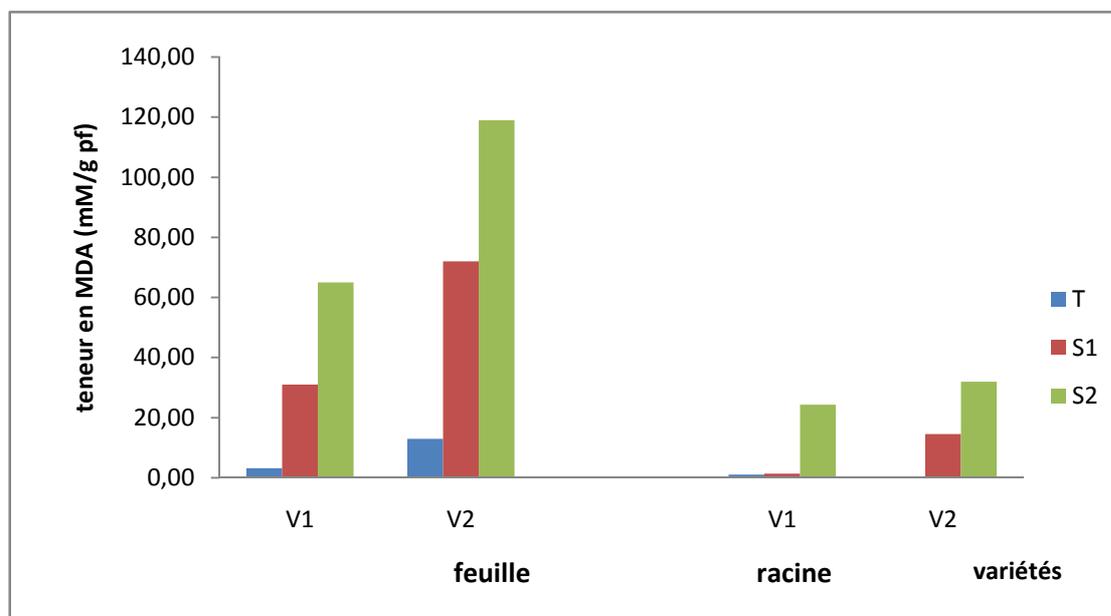
La figure 9 montre qu'au niveau foliaire , l'accumulation de MDA varie selon le stress et la variété ; En effet, le stress a augmenté la teneur en MDA qui est noté chez les deux génotypes étudiés Marton Dur et Djenah Khotifa cette accumulation est bien marquée chez la variété Djenah Khotifa qui atteint une valeur de 72 mM/gpf en 24h, et une valeur de 119 mM/gpf en 48h. Tandis que la variété Marton Dur présente des valeurs minimales qui donne une valeur de 31 mM/gpf en 24h, et une valeur de 65 mM/gpf en 48h.

Au niveau racinaire, la figure 9 montre une légère augmentation de la teneur en MDA chez la variété Djanh Khotifa de 14.5 mM/gpf sous stress de 24h, la quantité de MDA ne montre pas de variation par rapport au témoin chez le deuxième génotype Marton Dur ; par contre après 48h de stress les deux variétés montrent une augmentation de MDA qui est de l'ordre de Djanh Khotifa 32 mM/gpf et Marton Dur 24,34 mM/gpf .

Dans ce travail la variété Djanh Khotifa présente une accumulation plus importante de la production du MDA par rapport a la variété Marton Dur.

En conclusion : l'application du stress hydrique induit la production du MDA au niveau des organes et quelque soit le génotype étudié, la teneur en ce métabolites est plus importante au niveau des feuilles.

Il a été admis pendant longtemps que les MDA jouaient un rôle d'indicateur de stress abiotique par conséquent il peut être utilisé comme bio marqueur du stress oxydatif (Ladhar-Chaabouni *et al.* 2007 ; Funes *et al.* 2005 ; Giguère *et al.* 2003). Comparativement à la littérature les stress environnementales provoquent une accumulation de MDA qui permet de montré une accumulation de MDA soit racinaire pour certains auteurs (Dixit *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2006) soit foliaire (Yannarelli *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007).



**Figure 9 : Teneurs en malondialdéhyde (MDA) dans les feuilles et les racines de deux variété de blé dur V1= Marton Dur, V2= Djanh Khotifa, soumis à deux niveaux de stress hydrique (24h et 48h).**

### **1.3.Le niveau du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :**

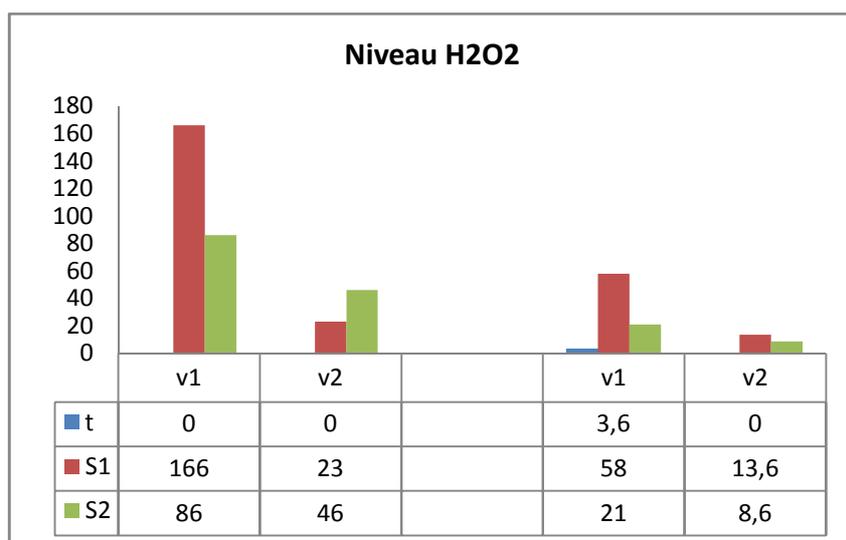
Le peroxyde d'hydrogène peut provoquer la dégradation des protéines, la libération de Fe<sup>3+</sup> ; l'oxydation de l'ADN, de lipides, mais également l'inactivation d'enzymes. Sa capacité à traverser les membranes biologiques fait du peroxyde d'hydrogène une des composantes utilisée par les cellules.

Le niveau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varie d'une variété a une autre et d'un organe a un autre.

La figure 10 montre que dans les feuilles, le niveau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varie selon le stress et la variété ; En effet, le stress a diminué le niveau de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est noté chez les deux génotypes étudiés Marton Dur et Djnah Khotifa ce niveau est bien marqué chez la variété Marton Dur qui atteint une valeur de 166 mol en 24h, et une valeur de 86 en 48h. Tandis que la variété Djnah Khotifa présente des valeurs minimales par rapport à la variété Marton Dur, qui donne une valeur de 58 mol en 24h, et une valeur de 21 mol en 48h.

Au niveau racinaire, la figure 10 montre une légère augmentation du niveau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chez la variété Marton Dur de 58 mol sous stress de 24h. Après 48h de stress les deux variétés montrent une diminution du niveau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui est de l'ordre de Djnah Khotifa 32 mol et Marton Dur 8.6 mol.

Dans ce travail la variété Marton Dur présenter un niveau H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plus important par rapport a la variété Djnah KHotifa.



**Figure 10 : variation du niveau H2O2 chez deux variété de blé dur V1= Marton dur, V2=Djnah khteifa étudié sous trois niveau d'alimentation hydrique T=témoin, S1= stress de 24h, S2= stress de 48h.**

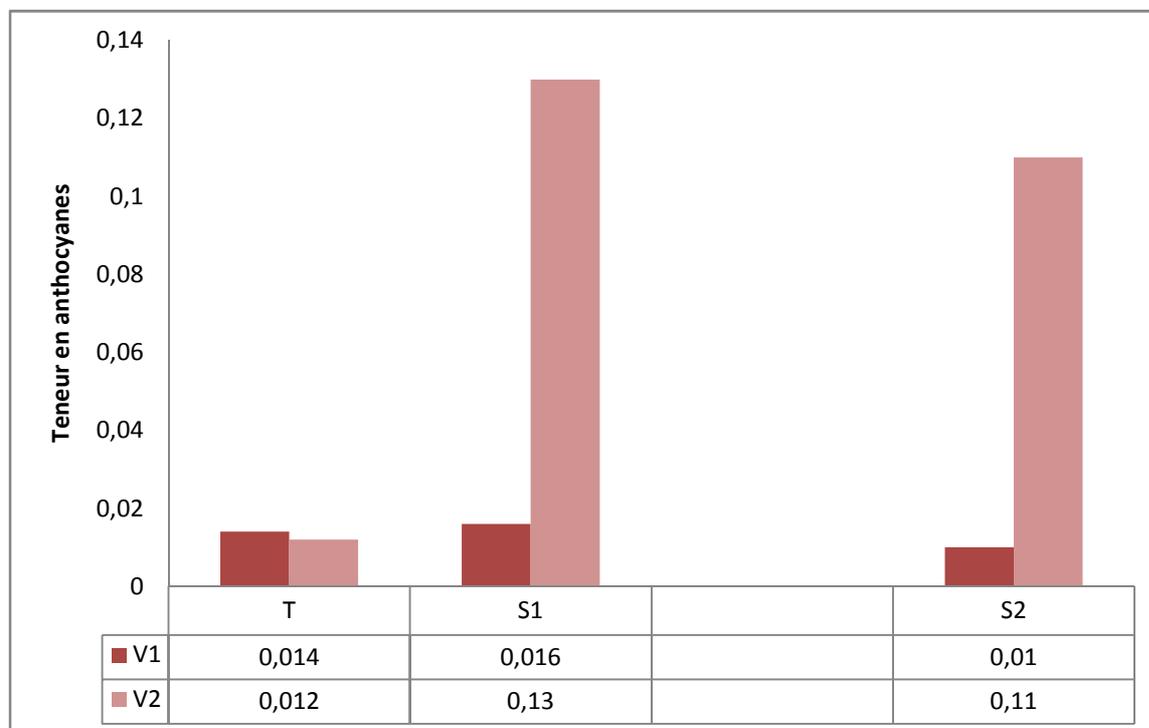
Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> joue le rôle d'une molécule signal qui alerte la cellule de la présence d'un stress environnemental (Rentel et Knight, 2004; Maksymiec, 2007). Selon Dat et al. (2000), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut fonctionner comme un messager secondaire à des faibles concentrations mais il devient toxique à fortes concentrations. Le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> peut provenir de la réaction de dismutation de l'anion superoxyde par la SOD (Cakmak, 2000; Mishra et al., 2006). Il peut provenir aussi de l'altération du transport d'électrons dans les chaînes photosynthétique et respiratoire (Dixit et al., 2001; Gomes-Junior et al., 2006).

#### **1.4.Teneur en anthocyanes :**

Les anthocyanes sont des pigments qui absorbent les lumières intenses et les convertis en chaleur ce qui facilite la croissance des végétaux. L'effet anti oxydant des anthocyanes est expliqué en partie par piégeage des radicaux libres. Ce sont néanmoins les radiations qui induisent la synthèse des anthocyanes (Lois, 1994).

Dans ce travail, La teneur en anthocyanes varie d'une variété à une autre et d'un traitement à un autre ; cependant, on note qu'au niveau foliaire la teneur en anthocyanes montre chez les deux génotypes Marton Dur et Djnah Khotifa des valeurs proches de 0.014 Do/mg et 0.012 Do/mg. tandis que pour les stressé de 24h et 48h de stress, on note une

augmentation de la teneur en anthocyanes, cette dernière est plus marquée chez la variété locale Djenah khotifa avec des valeurs respectives ( 0,13Do/mg et 0,11Do/mg)(**Figure 11**)



**Figure 11 : variation de la teneur en anthocyanes chez les deux variétés de blé dur V1= marton dur, V2= djenah khtaifa sous trois régimes hydrique T=témoin, S1= stress de 24h, S2= stress de 48h.**

En premier lieu et dès l'installation de la contrainte hydrique , la teneur en anthocyanes augmente chez les deux genotypes avec une teneur importante notée chez la variété Djenah khotifa de l'ordre de ( 0,13 et 0,11) (**Figure 11**) , la deuxième variété MD montre une légère augmentation de la teneur en anthocyanes en S1 (24h), puis cette valeur diminue et rejoint celle du témoin .

Notre étude montre, aussi que la variété locale Djenah khioifa a enregistré une accumulation importante d'anthocyanes cela pourrait être expliqué par la tolérance de cette dernière qui se manifeste par une forte teneur en molécules anti oxydantes, plusieurs recherches montrent que ces métabolites de base du système non enzymatique sont mises en place par la plante pour une détoxification en présence d'un stress (Eryilmaz, 2006)

D'autres composés tels que les flavonoïdes, métabolites secondaires issus de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes, ont également un important effet antioxydant : la désactivation de l'oxygène singulet, qui est dû à leur structure phénolique (Tournaire et *al.*, 1993; Benov and Georgiev, 1994), le scavenging de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et OH. (Gould et *al.*, 2002). composés protègent également les plantes des radiations UV et dégradent les ROS générés par ces radiations (Shirley, 1996).

## **2. Variation des paramètres physiologiques :**

### **2.1. Le taux de chlorophylle :**

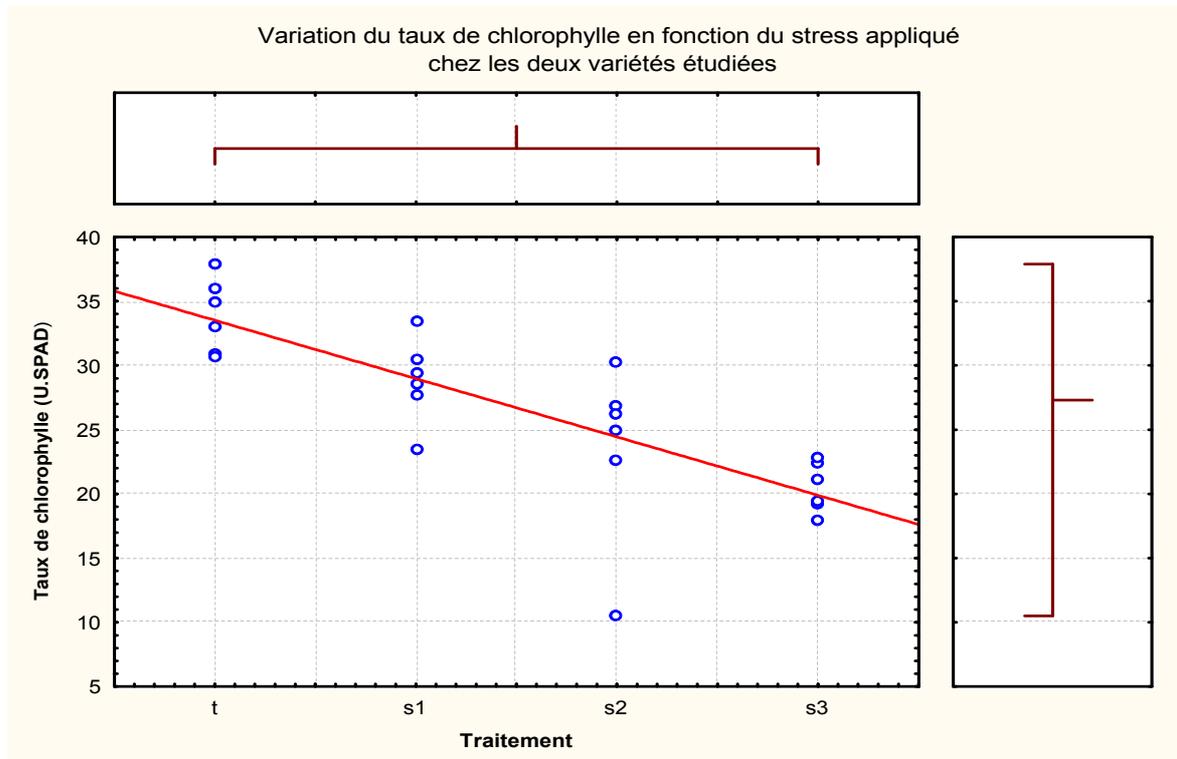
La chlorophylle est un pigment végétal responsable de la coloration verte des plantes. Ce pigment, que l'on retrouve dans les cellules des végétaux, est utilisé avec d'autres pigments par les plantes pour effectuer la photosynthèse. Ce processus permet à la plante d'utiliser l'énergie du soleil pour convertir le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et l'eau en oxygène et en matière organique.

La figure 12 a montré que le taux de la chlorophylle diminue en fonction du degré de stress appliqué chez les deux variétés étudiés sous différents traitements hydrique. Chez les témoins on note que les valeurs du taux de la chlorophylle différents selon les variétés, la variété Marton Dur représente une teneur en chlorophylle plus élevée avec une valeur de 34.6 U.SPAD, par contre la variété Djnah Khotifa marque une valeur de 33.2 U.SPAD.

Pour les stressé de 2h on note que le taux de chlorophylle totale chez la variété Marton Dur donne une valeur plus élevée de 30.23 U.SPAD que celle de la valeur enregistré chez la variété Djnah Khotifa 23.5 U.SPAD.

Pour les stressé de 4h on note que le taux de chlorophylle totale chez la variété Marton Dur donne une valeur plus élevée de 27.53 U.SPAD que celle de la valeur enregistré chez la variété DK noté 20.56 U.SPAD.

Pour les stressé de 6h on remarque que la variété Djnah Khotifa donne une valeur supérieure en taux de chlorophylle qui est de 21.16 U.SPAD. Et la variété Marton Dur enregistre une valeur de 19.86 U.SPAD.



**Figure 12 : Variation du taux de la chlorophylle des deux variétés de blé dur soumis aux différents niveaux de stress hydrique.**

L'ANNOVA nous révèle que le stress appliqué a un effet très hautement significative entre les différents traitements. Et un effet variété et interaction non significatif (Tableau 6).

**Tableau 6 : comparaison des moyennes de la teneur en chlorophylle à partir de trois traitements de stress hydrique appliqué aux deux variétés de blé dur.**

	SC	DDL	MC	F	P
Variété	28,82	1	28,82	1,6421	0,218302
Traitement	626,70	3	208,90	11,9024	0,000239
Var*trait	41,12	3	13,71	0,7810	0,521686

Le test NEWMAN au seuil 5% classe les différents traitements en deux groupes homogènes A, B (Tableau 7). On remarque que ces deux groupes ont la capacité d'accumuler

la chlorophylle mais avec des degrés différents commandés par le potentiel génétiques des génotypes étudiés.

**Tableau 7 : Test de NEWMAN-KEULS de la teneur en chlorophylle chez les deux variétés pour le facteur stress.**

Traitement	chlorophylle	Variété Marton Dur	Variété Djanh Khotifa
S3	20,51667	A	
S2	23,55000	A	
S1	28,86667		B
T	33,88333		B

Le premier groupe A qui englobe les stressés de 6h et 4h présente la teneur en chlorophylle la plus faible de 20.51 U/SPAD et 23.55 U/SPAD respectivement.

Par contre le deuxième groupe B qui englobe le témoin et les stressés de 2h présente la teneur en chlorophylle la plus élevée de 33.88 U/SPAD et 28.86 U/SPAD respectivement.

La teneur en chlorophylle est considérée comme paramètre de tolérance au stress abiotique (salinité, sécheresse) chez plusieurs espèces (Srivastava et *al.*, 1988). Dans notre travail on remarque que le stress hydrique affecte significativement ce paramètre par la diminution du taux de chlorophylle avec l'intensité du stress.

Des résultats similaires ont été reportés par plusieurs chercheurs (Eryilmaz.2006) (Hernandez et *al.*.,2000) montrant que le stress hydrique affecte le développement et la croissance de la plante ainsi que par une diminution du taux de chlorophylle.

# Conclusion

## **Conclusion :**

Les travaux effectués dans cette étude ont portés sur l'adaptation de deux variétés de blé dur aux conditions contraignantes de leur environnement qui nécessite des modifications morphologiques, métaboliques et moléculaires. Ces changements doivent aider à la fois à minimiser les effets nocifs des stress et permettre à la plante de survivre.

La réponse des plantes aux variations de stress hydrique, varie selon le type de stress et les caractéristiques de la plante.

D'après nos résultats, le stress causé par le déficit hydrique chez les deux variétés, engendre des désordres relatifs à la croissance des plantules de blé dur. Ces altérations sont plus importantes dans les racines comparées aux feuilles qui sont traitées sous différents niveaux de stress hydrique. Le système racinaire semble être plus affecté par le stress oxydatif. Ceci pourrait être expliqué par l'accumulation et la répartition des ROS au sein de la plante. En effet les ROS sont accumulés préférentiellement dans les racines qui montrent une activité de la superoxyde dismutase plus élevées par rapport aux feuilles.

L'augmentation de l'activité de cette enzyme montrent une production importante d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui est observée dans les racines et les feuilles des deux variétés de blé dur. En effet, l'activité de la superoxyde dismutase converti l'anion superoxyde  $O_2^-$  en  $H_2O_2$ .

L'application du stress hydrique induit la production du MDA au niveau des organes et quelque soit le génotype étudié, la teneur en ce métabolites est plus importante au niveau des feuilles.

Les ROS accumulés, particulièrement le  $H_2O_2$  semblent avoir une action de signal qui alerte la cellule de stress oxydatif. L'  $H_2O_2$  peut provenir de la réaction de dismutation de l'anion superoxyde par la SOD. Le stress hydrique provoque une augmentation très importante en anthocyanes au niveau des feuilles de la variété djnah khotifa qui sa tolérance se manifeste as une forte teneur en molécules antioxydantes.

La teneur en chlorophylle est considéré comme paramètre de tolérance au stress abiotique on remarque que le stress hydrique affecte significativement ce paramètre par la diminution du taux de chlorophylle avec l'intensité du stress.

En conclusion, pour mener à bien cette étude, il serait intéressant d'élargir l'investigation à d'autres méthodes d'analyse et aux autres marqueurs de stress oxydatif (dosage de carbonyles, dosage des différents enzymes antioxydantes, dosage de la vitamine E,...).

# Références Bibliographiques

# References bibliographiques

- **Abbassenne F, Bouzerzour H & Hachemi L (1998)** Phénologie et production du blé dur en zone semiaride d'altitude. Annales INA- El Harrach 18: 24-36
- **ANCA NEGURĂ1\*, SIMONA D, MARIUS Ș, LUCIAN N, NICOLAE Ș(2007)** L'ACTIVITÉ DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE ET DE LA PEROXYDASE DANS LES FEUILLES DE GRAND ROSEAU (*PHRAGMITES COMMUNIS*), DANS LES LACS DE LA RIVIÈRE CIRIC.
- **Anonyme(a).2012** <http://biologiedelapeau.fr/spip.php?article64>
- **Asada K (2006)** Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology 141: 391-396.
- **Asada K. (1999)** The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 50: 601-639.
- **Asada K. (2006)** Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. Plant Physiology 141: 391-396.
- **Beckman KB and Ames BN (1998)** The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- **Beevers H (1982)** Glyoxysomes in higher plants. Annals of the New York Academy of Sciences 386: 243-253
- **Belaid D (2000)** The economics of durum wheat production in WANA: past trends and future prospects. In: Proceeding of the symposium blé 2000, enjeux et strategies, 49-70.
- **Bennefont-Rousselot D., Therond P. et Delattre J. (2003)** Radicaux libres et antioxydants. Ed : Flammarion Médecine-Sciences, 59-81.
- **Bousba R., Yekhlif N .et Djekoun A. (2009)**. Water use efficiency and flag leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum desf*). World journal of Agricultural science 5.5: 609-616 p.
- **Bouzerzour ,H., A. Benmahammed, N. Benkharbech, K.L. Hassou (2002)** contribution des nouvelles obtentions à l'amélioration et à la stabilité du rendement d'orge (*Horeum vulgare L*) en zone semi-aride d'altitude. Revue Recherche Agronomique de l'INRAA, 10, 45-58.

- **Bouzerzour H & Benmahammed A (1994)** Environmental factors limiting barley grain yield in the high plateaux of eastern Algeria. *Rachis* 12: 11-14.
- **Boveris, A.; Chance, B. (1973)** the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707-716.
- **Brookes PS (2005)** Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 12-23.
- **Cakmak, I. (2000)** Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol.* 146; 185-205.
- **Ciguère A, Couillard Y, Campbell PGC, Perceval O. Hanc L' Pinel-Atloul B, Pelterin J (2003)** Steady-state distribution of metals among metallo(ionein and other cybsolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquat Toxicol* g:185-200.
- **Cleland RE, Grace SC (1999)** Voltammetric detection of superoxide production by
- **Corpas FJ, Gomez M, Hernandez JA, Delrio LA (1993)** Metabolism of activated oxygen in peroxisomes from 2 *Pisum-sativum* L cultivars with different sensitivity to sodiumchloride. *Journal of Plant Physiology* 141: 160-165
- **Dat, J., Vandenabeele, S. V., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F. (2000)** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* 57; 779–795.
- **Davies KJA (1987)** Protein damage and degradation by oxygen radicals .1. General-aspects. *Journal of Biological Chemistry* 262: 9895-9901.
- **Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Gomez M, Barroso JB (2002)** Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *J Exp Bot* 53:1255-1272.
- **Del Rio LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez-Huertas E, Hernandez JA (1998)** The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195-1200.
- **Del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Romero-Puertas MC, Gomez M, Barroso JB (2003)** Peroxisomes in oxidative stress and cell signaling. *Free Radical Research* 37: 32
- **Delrio LA, Fernandez VM, Ruperez FL, Sandalio LM, Palma JM (1989)** NADH induces the generation of superoxide radicals in leaf peroxisomes. *Plant Physiology* 89: 728-731

- **Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001)** Differential oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. Cv. Azad). *J. Exp. Bot.* 52; 1101-1109.
- **Douce R, Heldt HW (2000)** Photorespiration. In STD Leegood R.C., von Caemmerer S., eds., ed, *Photosynthesis: physiology and metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic
- **Edreva A (2005)** Generation and scavenging of reactive oxygen species I chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture Ecosystems & Environment* 106: 119-133.
- **Edreva A. (2005)** Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture Ecosystems & Environment* 106: 119-133.
- **Eryilmaz F (2006)** The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants .*biotechnol and biothechnol Eq* : 47.
- **Eryilmaz F (2006)** The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants .*biotechnol and biothechnol Eq*: page-3.4.
- **Fang TK, Donaldson RP, Vigil EL (1987)** Electron-transport in purified glyoxysomal membranes from castor-bean endosperm. *Planta* 172: 1-13
- **Favier A. (2003)** Le stress oxydant. *Actualité chimique*, 108-115.
- **Foyer C.H.et Noctor G.(2000)**Redox sensing.Tansley Review NO.112.Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling.*New Phytologist* 146(3),359-388.
- **Foyer CH (1996)** Oxygen processing in photosynthesis. *Biochemical Society Transactions* 24:427-433.
- **Foyer CH, Noctor G. (2003)** Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.
- **Fridovich I (1986)** Biological effects of the superoxide radical. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 247: 1-11.
- **Funes V Alhamâ J, Navas JI, I-npez-Barea J, Peinado J. (2006)** Ecoroxicologicâl etrects of metâl pollution in two mollusk species liom the Spanish South Adantic littoral *Environmentâl Pollution* 139:214 23.
- **Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F.S., Pompeu, G. B., Gratão, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J., Azevedo, R. A. (2006)** Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in reponse to cadmium. *Chemosphere* 65; 1330-1337.

- **Halliwell B.(2006)** Reactive Species and Antioxidants.Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* 141(2),312-322.
- **Hernandez H.A ., Williams C.A(2000)** phytochemistry,55,481-504.
- **Hsissou D(1994)** Sélection In vitro et caractérisation de mutants de blé dur tolérant à la sécheresse.Thèse de doctorat.Univ. catholique de louvain.
- **Huang AHC, Trelease RN, Moore TSJ (1983)** Plant peroxisomes. In A Press, ed, New York, N.Y. (USA), p 252 .
- **Jana S and Chaudhuri MA (1981)** Glycolate metabolism of three submerged aquatic angiosperm during aging.*Aquat Bot* 12 : 345-354.
- **Kangasjarvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R (1994)** Plant defense systems induced by ozone. *Plant Cell and Environment* 17: 783-794
- **Ladhâr-Châabouni R, Ga.gouri R' Hamzâ-ChalTâi À. (2007)** Effect of cadmium on some biomarkers in ûe clâm ruditapes dessusatus: Merâllothionein quantification by using rrvo techniques. *Internâtionnal Journal of En\ironmenr ând Pollution*
- **Ladhar-Chaabouni R, Gargoun R, Hamza-Chaffai A (2007)** Effect of cadmium on some biomarkers ì\ lhe clam Ruditapes declrrdrrr: métallohionein quantilicalion by using two techûiques. *Int J Environ Pollul* 10:593-601.
- **Lagadic L., Amiard J.C.,Ramade F.(1997).** Biomarqueurs en écotoxicologie.Aspects fondamentaux .Masson (ed),Parie,France,419 p.
- **Laisk A, Edwards GE. (1998)** Oxygen and electron flow in C-4 photosynthesis: Mehler reaction, photorespiration and CO2 concentration in the bundle sheath. *Planta* 205:632-645.
- **Levy, A.A., M. Feldman (2002)** The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiol.* 130: 1587-1593.
- **Liu K, Sun J, Song YG, Liu B, Xu YK, Zhang SX, Tian Q, Liu Y (2004)** Superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in D1/D2/cytochrome b-559 Photosystem II reaction center complex. *Photosynthesis Research* 81: 41-47.
- **Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M., Chai, L. (2007)** Cadmium-induced oxidative stress and reponse of the ascorbate-glutathion cycle in *Bechmeria nivea*(L.) Gaud. *Chemosphere* 69; 99-107.
- **Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L (1974)** Superoxide radicals as precursors of

- **Mac Key J (2005)** Wheat: Its concept, evolution, and taxonomy. In: Conxita, R., Nachit, M., di Fonzo, N., Araus, J.L., Pfeiffer, W.H., and Slafer, G.A. (eds.). Durum wheat breeding: current approaches and future strategies. Food product press. 3-61.
- **Macpherson AN, Telfer A, Barber J, Truscott TG (1993)** Direct-detection of singlet oxygen from isolated photosystem-II reaction centers. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1143: 301-309.
- **Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S et Janardhan Reddy K.(2006)** Printed in the Netherland Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Springer: 1-4 p.
- **Maksymiec, W. (2007)** Signaling responses in plants to heavy metals. *Acta Physiol. Plant* 29; 177-187.
- **Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., Prasad, M. N. V. (2006)** Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L.. *Plant Physiol. Bioch.* 44; 25-37.
- **Moller IM (2001)** Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561-591.
- **Navari-Izzo F, Pinzino C, Quartacci MF, Sgherri CLM (1999)** Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat. *Free Radical Research* 31: S3-S9.
- **Noctor G, Foyer CH (1998)** Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279
- **Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH (2002)** Drought and oxidative load in the leaves of C-3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* 89: 841-850
- **photosystem II. Febs Letters 457: 348-352 Coleman JOD, Blake Kalff MMA, Davies TGE (1997)** Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* 2: 144-151.
- **Pincemail I., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O.(1999).** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine *MEDISPHERE*, 1-4
- **Pincemail J., Meuriss M., Limet R. et Defraingne J.O.(1999)** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine *MEDISPHERE* , 1-4.

Potential role of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology* 165(6),571-579.

- **Pourrut B.,Perchet G.,Silvestre J.,Cecchi M.,Guirese M.et Pinelli E.(2008)** Publishers, p 115–136.
- **Purvis AC (1997)** Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 100: 165-170.
- **Rentel, M., Knight, M.R. (2004)** Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135; 1471-1479.
- **Rich PR, Bonner WD (1978)** EPR analysis of cyanide-resistant mitochondria isolated from mutant poky strain of *Neurospora crassa*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 504: 345-363.
- **Richard RA.,GJ.Rebtzke.AF.Van Herwaardlen,BL.Dugganb ,AG.condon(1997)** Improving yield in rainfed environments through physiological plant breeding. *Dryland Agriculture* 36:254-266.
- **Schrader M, Fahimi HD (2006)** Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1763: 1755-1766.
- **Slyter R.(1974)** The effect of internal water statuts on plant growth development and in:plant responses to climatic factors. *Proc.of upsal simpsium,Unesco*.
- **Smirnoff N. (1998)** Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9(2), 214-219.
- **Srivastava T.P,Gupta S.C., Lal P., Muralia P.N .,Kumar A.(1988)** *Ann Arid Zone*, 27,197-204.
- **Struglics A, Fredlund KM, Rasmusson AG, Moller IM (1993)** The presence of a short redox chain in the membrane of intact potato-tuber peroxisomes and the association of malatedehydrogenase with the peroxisomal membrane. *Physiologia Plantarum* 88: 19-28.
- **Telfer A, Dhami S, Bishop SM, Phillips D, Barber J .(1994)** Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem-II reaction centers. *Biochemistry* 33: 14469-14474.
- **Tolbert NE (1981)** Metabolic pathways in peroxisomes and glyoxysomes. *Annual Review of Biochemistry* 50: 133-157.

- **Turrens JF, Boveris A (1980)** Generation of superoxide anion by the nadh dehydrogenase of bovine heart-mitochondria. *Biochemical Journal* 191: 421-427.
- **Wardman P. et Caneias Fenton L.P.(1996)** Chemistry an introduction Radiation Res., 145: P/5326531.
- **Wong A and Cortopassi G (1997)** mtDNA mutations confer cellular sensitivity to oxidant stress that is partially rescued by calcium depletion and cyclosporin A. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 139-145.
- **Yannarelli, G. G., Fernández-Alvarez, A. J., Santa-Cruz, D. M, Tomaro, M. L. (2006)** Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. *Phytochemistry*.
- **Zhang SP, Weng J, Pan JX, Tu TC, Yao S, Xu CH (2003)** Study on the photo generation of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynthesis Research* 75: 41-48.

# Annexes

## **Annexe 1 :**

### **Taxonomie et classification des *Triticum***

Embranchement : Spermaphytes  
Sous Embranchement : Angiospermes  
Classe : Monocotylédones  
Ordre : Poales  
Familles : Poaleae  
Sous-famille : Festucoideae  
Tribu : Triticeae  
Genre : *Triticum*  
Espèce : *Triticum durum* Desf.

## **Annexe 2 :**

### **Tampon phosphate de potassium 0.067 M, au PH=7,8**

Dans un ballon de jaugé de 500 ml on dissout 0,2917 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  si 5,4616 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , dans 400 ml eau bidistillée. On corrige le PH à 7,8 avec de la solution KOH 1N, soit avec de la solution d'acide phosphorique 1 :3. On complète à 500 ml avec de l'eau bi distillée.

## **Annexe 3 :**

### **Solution EDTA di sodique 0,1 M, au PH=7,8**

Dans un ballon de jaugé de 100 ml on dissout 3,7223 g *éthylène diamine tétra acétate de sodium* ( $\text{EDTA-Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dans 75 ml eau bi distillé. On corrige le

PH à 7,8 avec de la solution NaOH 1N, et on complète à 100 ml avec de l'eau bi distillé

#### **Annexe 4 :**

##### **Solution de nitroBlue tetrazolium(NBT) 1,5 mM**

On dissout 12,26 mg nitroBlue tetrazolium dans 10 ml d'eau bi distillé. On garde au réfrigérateur.

#### **Annexe 5 :**

##### **Solution tampon Tris-Hcl 0,1M au PH=7,8**

Contenant 1 mMole dithiothéréitol (DTT) et 1mMole acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA)

#### **Annexe 6 :**

##### **Solution nutritif**

- 5000 ML d'eau
- 10 ml EDTA Ferric sodium
- 2,5 ml oligo elements
- 2,5ml  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2M)
- 2,5  $\text{KH}_2\text{P}_4$
- 2,5 Mg  $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  \_ $\text{K}_2\text{SO}_4$ \_  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

**Nom & prénom:** AIT YAHIA LOUISA

**ZEMMOURA HELLA DJAOUHARA**

**Date de soutenance :** 22/06/2014

**Titre :**

**Etude de l'effet d'un stress oxydatif et le système défensif enzymatique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf)**

**Nature du diplôme:** Master en Biologie et Génomique Végétales

**Résumé :**

Dans la présente étude deux génotypes de blé dur (*Triticum durum* Desf) : **Marton Dur, Djnah Khotifa** qui sont comparés entre eux pour leurs tolérance et leur réponses physiologiques et biochimiques au déficit hydrique. Le choix des niveaux d'irrigation est appliqué au stade troisième feuille. Les paramètres suivants sont mesurés : l'activité de la superoxyde dismutase SOD, la teneur en malonedialdéhyde MDA, le niveau du peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la teneur en anthocyanes et la teneur en chlorophylle. Une large variabilité est enregistrée au niveau des paramètres mesurés. En outre les résultats obtenus montrent que le stress hydrique a entraîné une production de ROS chez les deux variétés et qui a été évalué par analyse spectrophotométrique. Sauf pour la teneur en chlorophylle elle a été mesurée par un SPAD. Ces résultats soulignent également le rôle important des métabolites secondaires qui sont l'anthocyane dans la défense contre le stress oxydatif, causé par les différents stress abiotiques, dans la détoxification des espèces réactif de l'oxygène (ERO) en condition de stress. Ainsi on remarque que les génotypes étudiés les meilleures valeurs des activités photochimiques et photosynthétique se trouvent chez les génotypes présentant les plus faibles valeurs du stress hydrique foliaire et racinaire qui est Marton Dur une variété introduite.

**Mots clés :** Blé dur, stress oxydatif, ROS, SOD, MDA, peroxydase d'hydrogène, anthocyane, chlorophylle.

**Laboratoire de recherche:** Laboratoire de Génétique, Biochimie équipe de Biotechnologies Végétales.

**Membres de jury : Président (e):** **YKHLEF Nadia.,** Professeur. Université Constantine 1.

**Encadreur :** **BOUSBA Ratiba.,** Docteur. Université Constantine 1.

**Examineur :** **MOUELLEF Adra.,** MAT. Université Constantine 1.