



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : بيولوجيا و ايكولوجيا النبات

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Métabolisme Secondaire et Molécules Bioactives*

Intitulé :

**Etude biochimique de dix variétés de blé dur (*Triticum durum Desf.*)
Sous l'effet d'un stress oxydatif généré par un stress hydrique**

Présenté et soutenu par : BENKOLLI Mehdi

Le : 12/06/2016

BOUZEGHAIA Bilal

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIBANI Salih (MCA - UFM Constantine),

Rapporteur : BOUCHARREB Radia (MAA - UFM Constantine),

Examineurs : AOUAIDJIA Nawel (MAA - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 – 2016*

Remerciements

On remercie avant tout ALLAH , le tout puissant, de nous avoir guidés toutes les années d'étude et nous avoir donnés la volonté, la patience et le courage pour terminer ce travail.

Nous nous adressons l'expression de nos très vives gratitudee et respects à notre encadreur, Madame BOUCHAREB Radia pour son soutien, pour ses conseils utiles et sa gentillesse et pour ses appréciations sur ce travail

Nous tenons à remercier aussi les membres du jury

Mr CHIBANI Salih et Mme Aouaidjia Nawel pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger notre travail.

« BENKOLLI, BOUZEGHAIA »

DEDICACES

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

A la mémoire de nos parents

Nos frères et sœurs

A nos familles respectives

« BENKOLLI, BOUZEGHAIA »

Résumé :

Dans ce travail on a étudié les caractères biochimiques de dix variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) introduites et locales. Qui sont comparés entre eux pour leurs tolérances et leurs réponses au stress oxydatif généré sous un déficit hydrique.

Les paramètres mesurés sont : le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le dosage de malonedialdéhyde (MDA), ainsi le dosage des protéines totales et des polyphénols totaux.

Une large variabilité est enregistrée entre les variétés. En outre les résultats obtenus montrent que le stress hydrique a entraîné une production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et des oxydations lipidiques et protéiques chez les variétés étudiées. Cette variabilité a été évaluée par une analyse statistique.

Ces résultats soulignent également le rôle important des métabolites secondaires (les polyphénols) dans la défense contre le stress oxydatif causé par le stress hydrique, dans la détoxification des espèces réactif de l'oxygène (ERO) en condition de stress.

Ainsi on remarque que les génotypes étudiés qui ont une tolérance efficaces contre le stress hydrique se trouvent chez les génotypes : **B17, Ter (2-1), Bousselem**. Qui ont bien résisté le stress appliqué.

Mots clés : Blé dur, stress hydrique et oxydatif, MDA, H₂O₂, protéines, polyphénols

Abstract:

In this work we studied the biochemical characteristics of ten varieties of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) local And introduced. Which are compared with each other for tolerances and responses to oxidative stress generated under water deficit.

The measured parameters are: hydrogen peroxide (H₂O₂) and (MDA) and the determination of total protein and total polyphenols.

A wide variability is recorded between varieties. In addition the results show that drought stress resulted a production of reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and oxidation of lipid and protein in varieties studied. This variability was evaluated by a statical analysis.

These results show the important job of secondary metabolites (polyphenols) in the defense against oxidative stress caused by drought stress in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) under stress conditions.

Thus we see that the genotypes studied that effective tolerance against drought stress are among genotypes: **B17, Ter (2-1), Bousselem**. Which have resisted the stress applied.

Keywords: Durum wheat, water and oxidative stress, MDA, H₂O₂, proteins, polyphenols.

المخلص:

قمنا في هذا العمل بدراسة الخصائص البيوكيميائية لعشرة أنواع مختلفة من القمح الصلب (*Triticum durum Desf.*) منها المستوردة والمحلية لدراسة التباين بينهم على مستوى كل من درجة التحمل ومدى الاستجابة للإجهاد التأكسدي المولد تحت العجز المائي. العناصر التي تم تحديدها وتقييمها هي كمية كل من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) و المالونديالدهيد (MDA) و البروتينات الكلية والبوليفينول الكلي. سجل هناك اختلاف كبير بين الاصناف كما تشير النتائج المتحصل عليها حيث ان الإجهاد المائي تسبب في انتاج أنواع أكسجين تفاعلية (ERO) مثل بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) و أكسدة الدهون و ايضا البروتين عند الاصناف المدروسة. قيم هذا الاختلاف بلجراء دراسة إحصائية. تشير هذه النتائج ايضا الى اهمية الدور الاساسي للايض تحت الثانوية (PP) في الحماية ضد الإجهاد التأكسدي المسبب جراء الاجهاد المائي في إزالة انواع الاكسجين التفاعلية تحت ظرف الإجهاد. كما نلاحظ ايضا ان من بين الاصناف المدروسة التي لها تحمل فعال ضد الإجهاد المائي هي الاصناف Bousselem ,B17 ,Ter (2-1). أين أظهرت مقاومة فعالة ضد الإجهاد.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب, الإجهاد المائي و التأكسدي, البروتين, البوليفينول

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acides gras polyinsaturés
ANOVA	Analyse de variance
ARNm	Acide désoxyribonucléique messenger
BSA	Sérum albumine bovine
CAT	Catalase
CuZnSOD	SOD à cuivre et à zinc
D.O	Densité optique
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
H⁺	Proton
H₂O₂	Eau Oxygénée ou peroxyde d'hydrogène
LDL	Lipoprotéine de basse densité
MDA	Malondialdéhyde
MF	Matière fraîche
PP	Polyphénols
PSI	Photosystème I
S	Stressé
SOD	Super oxyde dismutase
T	Témoin
TBA	Acide Thio barbiturique
TCA	Acide Trichloracétique

Liste des tableaux

Tableaux	Pages
Tableau 01: Principales espèces réactives oxygénées radicalaires et non radicalaires	08
Tableau 02: Différents mécanismes des systèmes antioxydants	12
Tableau 03: Principales classes des polyphénols	17
Tableau 04: Les dix variétés étudiées de blé dur (<i>Triticum durum Desf.</i>) et leurs origines	20
Tableau 05: Les résultats des concentrations différentes étudiées avec des Statistiques descriptifs	27

Listes des figures

Figures	Pages
Figure 01: Le blé dur (<i>Triticum durum</i> Desf.)	03
Figure 02: <i>Schéma des facteurs du stress oxydatif</i>	06
Figure 03: <i>Schéma de différentes formes d'ERO</i>	10
Figure 04: Schéma de système de défense antioxydant enzymatique	14
Figure 05: Schéma de système de Mécanisme d'action des antioxydants	15
Figure 06: Structure du phénol (C ₆ H ₆ O)	16
Figure 07: Piégeage des ERO par les polyphénols	19
Figure 08: Les dix variétés de blé dur (<i>Triticum durum</i> Desf.) sous serre	21
Figure 09: Dosage de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	21
Figure 10: Dosage de malondialdéhyde (MDA)	22
Figure 11: Dosage des protéines totales	23
Figure 12: Préparation des solutions A,B,C1,C2,D	24
Figure 13: Courbe d'étalonnage de BSA pour le dosage des protéines totales	25
Figure 14: Dosage des polyphénols totaux	25
Figure 15: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	26
Figure 16: La concentration de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) chez les dix variétés étudiées	28
Figure 17: La concentration de malondialdéhyde (MDA) chez les dix variétés étudiées	29
Figure 18: La concentration des protéines totales chez les dix variétés étudiées	30
Figure 19: La concentration des polyphénols totaux chez les dix variétés étudiées	31

Sommaire

Titres et Sous titres	Pages
Introduction	01
CHAPITRE I : Revues bibliographiques	
1. Description Et Classification de blé dur (<i>Triticum durum Desf</i>)	03
1.1. Taxonomie et classification des <i>Triticum</i>	03
1.1.1. Taxonomie	03
1.1.2. Classification des <i>Triticum</i>	03
2. Le stress	04
3. Le stress hydrique	04
3.1. Les conséquences du stress hydrique	04
3.2. Les mécanismes de résistance contre le stress hydrique	05
4. Le stress oxydatif	06
4.1. Les conséquences du stress oxydatif	06
4.1.1. Les conséquences du stress oxydatif sur les lipides	07
4.1.2. Les conséquences du stress oxydatif sur les protéines	07
4.1.3. Les conséquences du stress oxydatif sur l'ADN	08
5. Les Espèces Réactives de l'Oxygène	08
5.1. Les radicaux libres	09
5.1.1. Le radical superoxyde	09
5.1.2. Le radical hydroxyle	09
5.1.3. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	10
5.2. Les mécanismes de résistance contre les espèces réactives de l'oxygène	11

6. Les antioxydants	11
6.1. Les antioxydants enzymatiques et leurs systèmes	11
6.1.1. Le Superoxyde dismutase (SOD)	12
6.1.2. La Glutathion peroxydase (GPx)	12
6.1.3. Les Catalases (CAT)	13
6.1.4. Les peroxydases (POX)	13
6.1.5. Le malondialdéhyde (MDA)	13
6.1.5. 1 Intérêt du dosage du malonedialdéhyde (MDA)	13
6.2. Les antioxydants non enzymatiques	14
6.3. Antioxydants d'origine végétale	14
6.4. Mécanisme d'action des antioxydants	15
7. Les polyphénols	16
7.1. Structure chimique et classification des polyphénols	16
7.2. Biosynthèse des polyphénols	17
7.2.1. La voie de Shikimate	17
7.2.2. La voie des phénylpropanoïdes	18
7.3. Effets biologiques et antioxydants des polyphénols	18
CHAPITRE II : Matériel et méthodes	
1. Matériel végétale	20
2. Conduite de l'essai	20
3. Mise en Expérimentations	21
3.1. Dosage de peroxyde d'hydrogène H₂O₂	21
3.1.1. Technique de dosage	22
3.2. Dosage de malondialdéhyde MDA	22

3.2.1. Technique de dosage	22
3.3. Dosage des protéines totales	23
3.3.1. Réactif utilisés	23
3.3.2. Technique de dosage	24
3.4. Dosage des polyphénols totaux	25
3.4.1. Technique de dosage	26
4. Analyse statistique des données	26
CHAPITRE III : Résultats et discussion	
Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)	28
Le malonedialdéhyde (MDA)	29
Les protéines totales	30
Les polyphénols totaux	31
Discussions générales	32
Conclusion et perspectives	34
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction

Introduction

Le blé est cultivé principalement dans les pays du bassin Méditerranéen à climat des régions arides et semi-arides là où l'agriculture est dans la plus mauvaise passe. Elle se caractérise par l'augmentation de la température couplée à la baisse des précipitations, en plus la désertification et la sécheresse tuent les sols agricoles **(Abeledo et al., 2008)**.

Au niveau des hautes plaines semi-arides d'Algérie, la sécheresse est souvent le facteur principal qui affecte la production du blé **(Larbi et al., 1998)**.

En Algérie, le blé dur (*Triticum durum Desf.*) a acquis au cours des siècles une véritable valeur symbolique, du fait de son importance dans l'agriculture et l'alimentation humaine. Son grain constitue un produit de base dans l'alimentation des algériens (couscous, pain...), il est considéré aussi comme une très grande ressource de protéines et d'hydrate de carbone. Il renferme également des acides aminés, des lipides et des vitamines. En outre, ses sous produits (paille) servent d'aliments pour le bétail **(Godon, 1985)**.

L'Algérie avant les années 1830, exporte son blé au Monde entier. Actuellement l'Algérie importe son blé et se trouve dépendante du marché international.

Par sa position de grand importateur de blé, l'Algérie achète annuellement plus de 5% de la production céréalière mondiale, cette situation risque de se prolonger à plusieurs années, faute de rendements insuffisants et des besoins de consommation sans cesse croissants devant une forte évolution démographique **(Chellali, 2007)**.

Cette faiblesse de la production de blé en Algérie était toujours liée aux effets du stress hydrique qui se fait ressentir de manière très importante depuis la dernière décennie **(Chaise et al., 2005)**.

Les stress environnementaux, notamment le stress hydrique, limitent sérieusement la croissance des plantes ainsi que la productivité végétale **(Wang et al., 2003)**.

Une conséquence des stress environnementaux, comprenant le stress hydrique, est l'apparition du stress oxydatif **(Hernandez et al., 2001)**, c'est-à-dire l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène (ERO) à des concentrations élevées **(Azevedo et al., 2006)**, qui endommagent les structures cellulaires **(Parent et al., 2008)**. Ces derniers sont à l'origine du dysfonctionnement de l'appareil photosynthétique et les autres troubles métaboliques **(Rahnama et Ebrahimzadeh, 2005)**.

Cependant, la tolérance des plantes à la contrainte hydrique est fortement corrélée à leur capacité de synthèse des antioxydants nécessaire pour faire face aux espèces réactives d'oxygène (ERO) et de maintenir leur concentration à faible niveau dans les cellules lors du stress (**Reddy et al., 2004**).

La distribution des métabolites secondaires peut changer pendant le développement de la plante. Ceci peut être lié aux conditions climatiques dures (la température élevée, exposition solaire, sécheresse, salinité), qui stimulent la biosynthèse des métabolites secondaires tels que les polyphénols (**Falleh et al., 2008**).

Parmi les antioxydants naturels les polyphénols, ces composés phénoliques permettent de ralentir le phénomène d'oxydation qui favorisent le vieillissement cellulaire en interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le message de l'apoptose (**Macheix et al., 2005**).

Les polyphénols expriment les propriétés anti-oxydantes 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**).

L'objectif de notre travail est de comparer le comportement des dix variétés de blé dur (*Triticum durum Desf.*) sous stress oxydatif généré sous l'effet d'un stress hydrique par l'étude de quelques paramètres biochimiques tel que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et la peroxydation lipidique à travers le dosage de malondialdéhyde (MDA), ainsi le dosage des protéines totales et des polyphénols totaux.

Notre mémoire est présenté en trois chapitres :

- Le Chapitre I est une synthèse bibliographique sur le blé dur, les stress hydrique et oxydatif et les mécanismes biochimiques de la tolérance des plantes aux stress hydrique et oxydatif.
 - Le Chapitre II est l'ensemble des matériels et méthodes utilisés pendant notre expérimentation.
 - Le Chapitre III est l'ensemble des différents résultats et discussions des paramètres étudiés.
- Enfin, une conclusion et perspectives sont proposées.

CHAPITRE I :
Revue
bibliographiques

1. Description et Classification de blé dur (*Triticum durum* Desf.)

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) est une plante annuelle de la classe des Monocotylédones de la famille des poaceae, de la tribu des Triticées et du genre *Triticum* (Feillet, 2000). En termes de production commerciale et d'alimentation humaine, cette espèce est la deuxième plus importante du genre *Triticum* après le blé tendre. Leur famille comprend 600 genres et plus de 5000 espèces (Feillet, 2000).



Figure 01: Le blé dur (*Triticum durum* Desf.)

1.1. Taxonomie et classification des *Triticum* (Feillet, 2000)

Embranchement	Spermaphytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Poales
Famille	Poaceae
Sous-famille	Festucoideae
Tribu	Triticeae
Sou-Tribu	Triticineae
Genre	<i>Triticum</i>
Espèce	<i>Triticum durum</i> Desf.

1.1.2. Classification des *Triticum*

En fonction du degré de ploïdie et d'après le nombre de leurs chromosomes, on différencie les blés diploïdes *Triticum monococcum* ($2n=14$), les blés dur tétraploïdes *Triticum durum* ($2n=28$) et enfin les blés tendre hexaploïdes ($2n=48$) *Triticum aestivum* (Prats et Grandcourt, 1971 ; Beaugrand, 2004).

2. Le stress

Le stress est l'ensemble des conditions qui provoquent des changements des processus physiologique résultant éventuellement en dégâts, dommage blessures, inhibition de la croissance ou de développement (**Hopkins, 2003**).

Le stress perturbe les structures normales et la coordination des processus variés au niveau moléculaire, cellulaire, et de l'organisme entier. Le retour à la stabilisation et les réactions de répartition, l'accomplissement d'un réajustement, d'états adaptés, et le maintien de grands pouvoirs de résistance font tous appel à une énergie additionnelle et métabolite (**Larcher, 2001**).

Les basses températures hivernales, les chaleurs extrêmes de l'été, la sécheresse, les radiations élevées, la salinité et la pollution de l'air et des sols ne sont que quelques exemples de ce à quoi une plante doit faire face. Dans l'environnement, des conditions qui génèrent des stress sont créées lorsque les paramètres environnementaux atteignent des valeurs extrêmes. Il peut en résulter des impacts importants sur la physiologie, le développement et la survie des plantes (**Jones et Jones, 1989**).

3. Le stress hydrique

Le stress hydrique constitue un important facteur limitant la production des céréales. Il affecte tous les aspects de croissance. Il se traduit chez la plante par une série de modifications qui touchent les caractères morpho- physiologiques, biochimiques, génétiques et même les niveaux d'expression des gènes associés à la sécheresse (**Mefti et al., 2000**).

3.1. Les conséquences du stress hydrique

Le stress hydrique provoque des dommages qui résultent de la dessiccation du protoplasme. La sortie de l'eau de la cellule provoque une augmentation de la concentration des solutés, entraînant des conséquences sérieuses tant sur les plans structural et métabolique. L'intégrité des membranes et des protéines est également affectée par la dessiccation, ce qui entraîne des dysfonctionnements métaboliques.

Les protéines cytoplasmiques et les organites peuvent ainsi subir d'importantes pertes d'activité ou être complètement dénaturés lorsqu'ils sont déshydratés. La photosynthèse et la croissance cellulaire sont parmi les premiers processus affectés lors de stress hydrique (**Chaves et al., 2008**).

L'effet peut être direct, comme la diminution de la disponibilité en CO₂ causée par la limitation de la diffusion dans le mésophylle, l'altération du métabolisme photosynthétique, ou par le stress oxydatif (**Lawlor et Cornic, 2002 ; Flexas et al., 2004 ; Flexas et al., 2007**).

Lors du déficit hydrique, la déficience en CO₂ intracellulaire résulte en une sur-réduction des composantes de la chaîne de transport d'électrons et les électrons sont transférés à l'oxygène au niveau du photosystème I (PSI). Ce transfert mène à la production d'espèces réactives d'oxygène (ERO).

Une conséquence importante des réductions de photosynthèse en cas de stress hydrique est la synthèse de composés toxiques oxydants dans les cellules.

Si l'énergie solaire captée par les photosystèmes de la feuille n'est plus utilisée entièrement par la photosynthèse, des formes toxiques de l'oxygène peuvent apparaître, les radicaux (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et les radicaux hydroxyles (OH[•]). Ces radicaux sont les mêmes que ceux qui causent le vieillissement des cellules végétales et animales, en provoquant la peroxydation des lipides et la dénaturation des protéines et de l'ADN.

Au cours du déficit hydrique les ARNm ne sont pas traduits dans les mêmes proportions, et le taux de traduction est modifié.

Les quantités de protéines ne sont donc que partiellement corrélées aux quantités d'ARNm. Par ailleurs les protéines subissent ensuite des modifications (post traductionnelles) qui ont une influence sur leur activité (**Kawaguchi et al., 2004**).

3.2. Les mécanismes de résistance contre le stress hydrique

Les plantes possèdent divers mécanismes de résistance contre le stress. Lors d'un déficit en eau, les stomates se ferment, la biosynthèse d'osmolytes particuliers augmente, la balance de ces métabolites et la consommation, le partitionnement et la séquestration des ions change, la composition des membranes est modifiée, et une cascade de signalisation est initiée (**Bohnert et al., 1995**). La réponse d'acclimatation lors du stress hydrique inclut aussi l'inhibition de la croissance et la desquamation des feuilles, ce qui restreint la dépense en eau des tissus sources et aide à maintenir le statut en eau et l'assimilation de CO₂ chez la plante. Les composés osmotiques comme les sucres et autres osmolytes sont aussi produits en réponse à une lente induction de la déshydratation, et ont une fonction dans le maintien de l'activité métabolique des tissus (**Tardieu, 2003**).

4. Le stress oxydatif

Le stress oxydatif est défini comme étant le déséquilibre entre la génération des espèces réactives de l'oxygène et la capacité du corps à neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs (Boyd *et al.*, 2003).

Ce déséquilibre entre les systèmes de défense et de production des radicaux libres entraîne des lésions biochimiques au niveau des cellules de l'organisme du fait de leurs conséquences sur le plan moléculaire, telles que les altérations au niveau des protéines, l'apparition de cassures au niveau de l'ADN, ou des atteintes de l'intégrité de la membrane cellulaire par l'induction de la peroxydation lipidique.

Il est reconnu que le stress oxydatif représente aussi l'une des principales causes de la baisse de production en agriculture (Foyer et Noctor, 2005).



Figure 02 : Schéma des facteurs du stress oxydatif

4.1. Les conséquences du stress oxydatif

Au cours du stress oxydant, Les ERO sont des molécules très réactives et certaines d'entre elles, telles que le H_2O_2 , 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 des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et 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**).

4.1.1. Les conséquences du stress oxydatif sur les lipides

Au cours du stress oxydant, Les ERO peuvent également s'attaquer aux lipides et plus particulièrement aux acides gras polyinsaturés des phospholipides des membranes.

Les conséquences de la peroxydation lipidique sont nombreuses. Parmi celles-ci, on retrouve une réorganisation ainsi qu'une agglomération des phospholipides, une fluidité des membranes abaissées et cela peut même entraîner la disparition des compartiments cellulaires (**Perez et al., 2000**).

4.1.2. Les conséquences du stress oxydatif sur les protéines

Lors du stress oxydant, les protéines subissent des modifications soit en présence de métaux de transition, soit se l'action des radicaux libres.

Les ERO peuvent attaquer différents éléments des protéines comme leurs groupements sulfhydryles (**Lapointe et Bilodeau, 2003 ; Lapointe et al., 2005**).

Les tyrosines sont également des composantes des protéines qui peuvent être attaquées par les ERO. De plus, lorsqu'une protéine est attaquée par une ERO, il y a fréquemment formation de dérivés carbonyles, c'est pourquoi ces derniers sont souvent utilisés comme indicateurs de l'action des ERO sur les protéines (**Emond et al., 2004**).

La formation de ponts disulfures additionnels, des changements dans l'activité enzymatique et des problèmes lors du transport membranaire sont quelques unes des dysfonctions causées par l'oxydation des protéines (**Yun et al., 1997 ; Jablonka et al., 2000 ; Lapointe et al., 2005**). Cependant, L'oxydation des acides aminés des protéines est généralement induite par le radical hydroxyle mais peut aussi l'être par H₂O₂. Ces modifications peuvent intervenir sur la chaîne carbonée principale (**Berlett et Stadtman, 1997**) ou des chaînes latérales et peuvent entraîner la perte de la structure et/ou de la fonction d'une protéine (**Uchida et coll, 1990**).

4.1.3. Les conséquences du stress oxydatif sur l'ADN

La plus part des dommages causés par le stress au niveau de l'ADN concernant les espèces réactives de l'oxygène. Elles peuvent lui induire de nombreuses modifications covalentes telles que des lésions aux bases nucléotidiques (purines et pyrimidines), des cassures de brins, des pontages (cross-links) inter et intra brin (Sorg, 2004).

5. Les Espèces Réactives de l'Oxygène

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°) et les espèces non radicalaires telles le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (Simonian et Coyle, 1996 ; Garrel et al., 2007).

Tableau 01: Principales espèces réactives oxygénées radicalaires et non radicalaires (Antwerpen, 2006).

Radicalaires	Non radicalaires
$\cdot OH$ Radical hydroxyle	H_2O_2 Peroxyde d'hydrogène
RO° Radical alkoxyl	$ROOH$ Peroxyde organique
ROO° Radical peroxy	$HOCl$ Acide hypochloreux
$O_2^{\circ-}$ Anion superoxyde	1O_2 Oxygène singulet
NO° Radical oxynitrique	$ONOO^{\circ}$ Peroxynitrite

5.1. Les radicaux libres

Un radical libre est défini comme toute molécule possédant un ou plusieurs électrons non appariés (Jacques et André, 2004), cette molécule est très instable et réagit rapidement avec d'autres composants, essayant de capturer l'électron nécessaire pour acquérir la stabilité, une réaction en chaîne débute lorsqu'un radical libre attaque la molécule stable la plus proche en lui arrachant son électron, et la molécule attaquée devient elle-même un radical libre (Martinez, 1995).

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: le radical superoxyde ($O_2^{\circ-}$), le Radical hydroxyle ($H O^{\circ}$), le Peroxyde d'hydrogène (Smirnoff et al., 2005).

5.1.1. Le radical superoxyde ($O_2^{\circ-}$)

Le radical superoxyde intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions. Son origine principale est la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, ce système permet la production du radical superoxyde par l'addition d'un électron à l'oxygène moléculaire (Marfak, 2003; Antwerpen, 2006), cette réaction est catalysée par le cytochrome oxydase mitochondrial : $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\circ-}$

5.1.2. Le radical hydroxyle

Le radical hydroxyle (HO°) joue un rôle initiateur dans l'auto-oxydation lipidique. Il est principalement formé lors de réactions d'ions métalliques avec le peroxyde d'hydrogène, ces réactions sont décrites sous le nom de réactions de Fenton:



Le fer peut également catalyser la transformation de l'anion superoxyde en présence de peroxyde d'hydrogène avec production de radical hydroxyle selon la réaction dite Haber-Weiss (Jacques et André, 2004).



5.1.3. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Egalement appelée dioxyde de dihydrogène ou eau oxygénée est très soluble dans l'eau, pénètre facilement dans les membranes biologiques, et peut provoquer la dégradation des protéines, la libération de Fe³⁺ ; 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 inter cellulaire. 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 (Fe²⁺ et Cu⁻) en présence de sels métalliques (Wardman et Candeias, 1996).

Il se forme par une réaction de dismutation du radical superoxyde, catalysée par le superoxyde dismutase (SOD). $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$

Le peroxyde d'hydrogène est moins réactif que l'anion superoxyde, mais il possède une capacité de diffusion importante (Jacques et André, 2004).

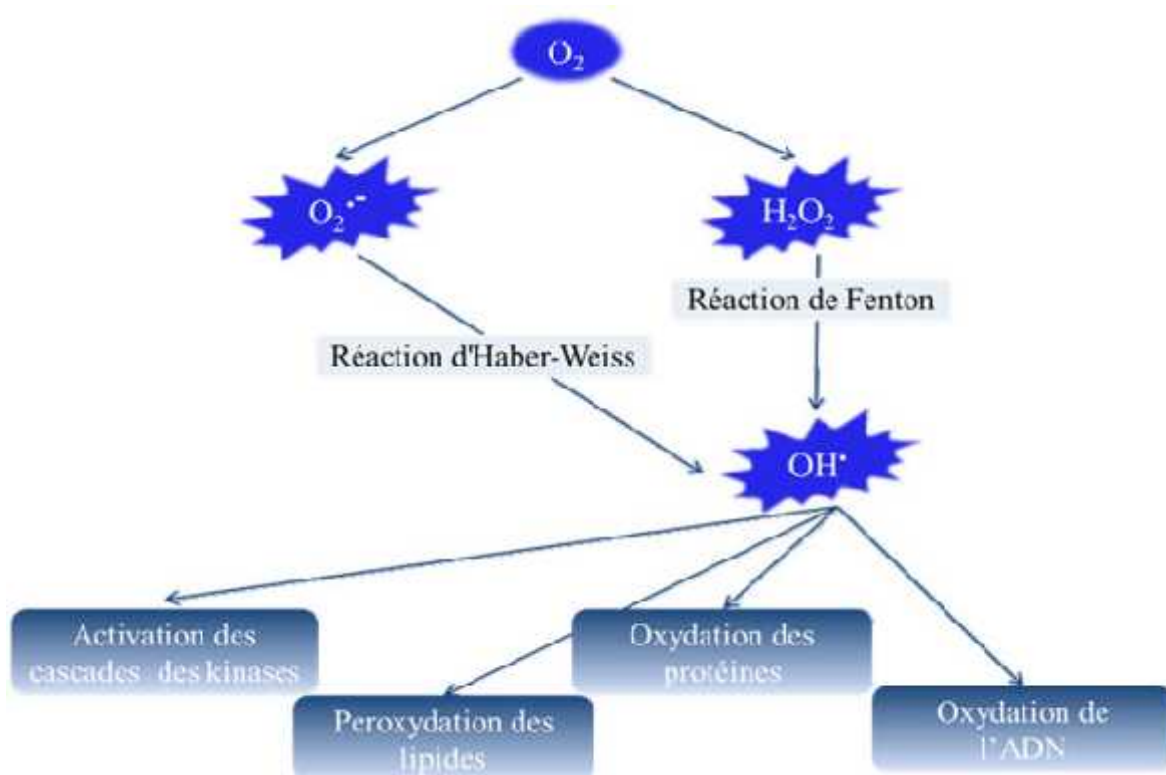


Figure 03 : Schéma de différentes formes d'ERO (Gutteridge et Halliwell, 1992).

5.2. Les mécanismes de résistance contre les espèces réactives de l'oxygène

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. 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.

(Kangasjarvi *et al.*, 1994 ; Pell *et al.*, 1997; Noctor *et al.*, 1998).

6. Les antioxydants

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).

Ils agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singlet pour la transformer en chaleur. En même temps, les anti oxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Haton, 2005).

6.1. Les antioxydants enzymatiques et leurs systèmes

Les antioxydants enzymatiques (le superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion reductase), sont considérés comme la première ligne de défense contre les différentes espèces oxydantes, leur rôle principal est de diminuer la quantité des ERO dans la cellule. Parfois, ces enzymes nécessitent des cofacteurs comme les oligo éléments (Zn, Cu, Mn, Se, Fe) pour exercer leur activité enzymatique (Mittler *et al.*, 2004).

Tableau 02: Différents mécanismes des systèmes antioxydants (Mittler *et al.*, 2004)

Mécanismes	Supprime (produit)	Localisation cellulaire
SOD	$O_2^{\bullet-}$ (H_2O_2)	Chl, Cyt, Mit, et Per
Catalase	H_2O_2 (H_2O)	Mit, Per
Péroxidases	H_2O_2 (H_2O)	beaucoup de localisation
Ascorbate/cycle glutathion	H_2O_2 (H_2O)	Chl, Cyt, Mit, Per
Glutathion peroxydases	H_2O_2 (H_2O), hydroperoxydes de lipide	Chl, Cyt, Mit, ER
Système Peroxyrédoxines	H_2O_2 (H_2O), hydroperoxydes d'alkyles et Peroxynitrates	Chl, Cyt, Mit, Nucl
Systèmes Thioredoxine	H_2O_2 (H_2O)	Chl, Cyt, Mit
Systèmes Glutarédoxines	H_2O_2 (H_2O), hydroperoxydes d'alkyles et Peroxynitrates	Chl, Cyt, Mit, sec
Carotens et tocopherol	O_2 (O_2)	Chl

Avec :

Chl : chloroplastes ; Cyt : Cytosol, ER : réticulum endoplasmique,
 Mit : mitochondries, Nucl : nucléique, Per : peroxymoses,
 Sec : Voies de sécrétion

6.1.1. Le Superoxyde dismutase (SOD)

Les SOD sont les premières enzyme à intervenir dans la cascade des ERO. Ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des ions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et oxygène (Powers et Lennon, 1999). Les SOD se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : SOD à Manganèse (Mn-SOD) dans les mitochondries, à ions cuivre ou à zinc (Cu/Zn-SOD) dans le cytoplasme et les mitochondries (Faridovich, 1995). Il a été nouvellement montré que la (Cu/Zn-SOD) était également présente dans l'espace inter membranaire (Sturtz *et al.*, 2001).

6.1.2. La Glutathion peroxydase (GPx)

Elle agit en synergie avec SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation de H_2O_2 et de la réduire en H_2O et O_2 , elle réduire aussi les peroxydes lipidiques ou les hydro peroxydes organiques (Mullineaux *et al.*, 1998 ; Arora *et al.*, 2002)

6.1.3. Les Catalases (CAT)

Sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en H₂O et O₂ (Arora *et al.*, 2002).

6.1.4. Les peroxydases (POX)

Sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons (Arora *et al.*, 2002).

6.1.5. Le malondialdéhyde (MDA)

Le MDA est l'un des produits terminaux formés lors de la décomposition (oxydation) des acides gras polyinsaturés (PUFA) médiée par les radicaux libres. Les taux élevés de MDA signent donc un stress oxydatif portant notamment sur l'oxydation des lipides (Chebab *et al.*, 2009).

La détection spectrophotométrique du malonedialdéhyde (MDA) par le test à l'acide thiobarbiturique (TBA) est la méthode la plus ancienne et la plus populaire pour mesurer la peroxydation lipidique. Cependant, la MDA reste un indice peu représentatif de la présence d'une peroxydation lipidique puisqu'elle ne représente qu'un pourcent des produits de décomposition des peroxydes lipidiques (Pincemail *et al.*, 1999). Nombreux laboratoires dans le monde reposent sur le dosage du MDA pour évaluer l'augmentation ou la diminution du MDA afin d'évaluer les effets des traitements antioxydants.

6.1.5. 1 Intérêt du dosage du malonedialdéhyde (MDA)

Le malonedialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides et dont la concentration 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 (Funes *et al.*, 2006 ; Ladhar *et al.*, 2007). 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. Ils entraînent alors la peroxydation des acides gras polyinsaturés en provoquant une désorganisation membranaire qui aboutit à la lyse cellulaire. (Bonnefont *et al.*, 1994).

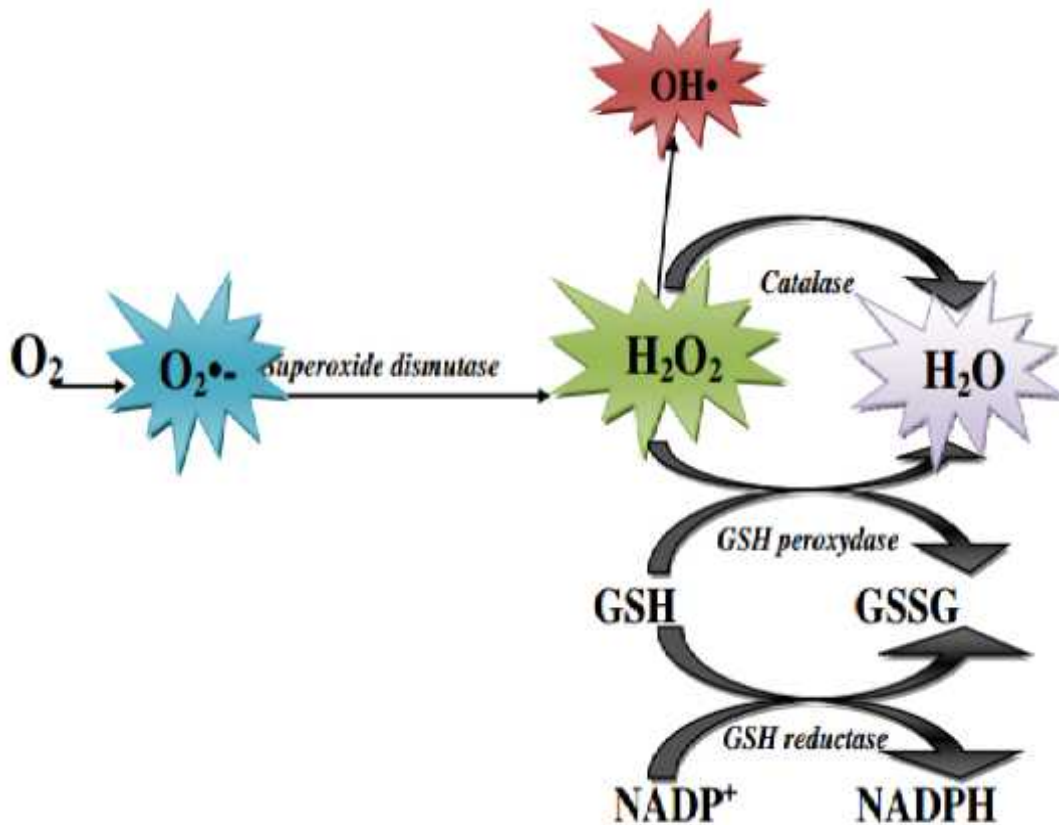


Figure 04: Schéma de système de défense antioxydant enzymatique

6.2. Les antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doit vent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligo éléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le cytochrome C et les vitamines E et C (Blandine, 2006).

6.3. Antioxydants d'origine végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont: les tocopherols, les carotenoides et polyphenols...etc.

Les Antioxydants naturels peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres.

Leurs prise a été largement rapportée pour protéger contre le développement de maladies coronariennes.

De nombreuses preuves existent montrant que les polyphénols peuvent prévenir l'oxydation des (LDL) lipoprotéine de basse densité (Koechlin et Ramonatxo, 2006).

6.4. Mécanisme d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition. Indépendamment de leur localisation, les antioxydants peuvent agir à deux niveaux : en prévenant la formation de radicaux libres oxygénés ou en épurant les radicaux libres oxygénés. En complément de cette double ligne de défense, l'organisme est en outre capable de réparer ou d'éliminer les molécules endommagées par l'attaque radicalaire (Gardès, 2003).

Les antioxydants préventifs ont une action stabilisatrice en décomposant par exemple les peroxydes en des produits stables de terminaison ce qui empêche directement la formation des radicaux libres. Ils peuvent aussi chélater les catalyseurs des réactions d'oxydation tels que les ions métalliques ou bien réagir avec l'oxygène. Les piègeurs des ERO rentrent en compétition avec des radicaux déjà existants et contribuent à bloquer la phase de propagation. On différencie deux types de piégeage:

- le premier par libération d'un atome d'hydrogène, souvent par une structure aromatique (cas des dérivés du phénol : tocophérols, polyphénols, flavonoïdes...)
- et le deuxième par libération d'un électron (Huang et al., 2005).

La combinaison de ces antioxydants préventifs et piègeurs peut générer des effets synergiques.

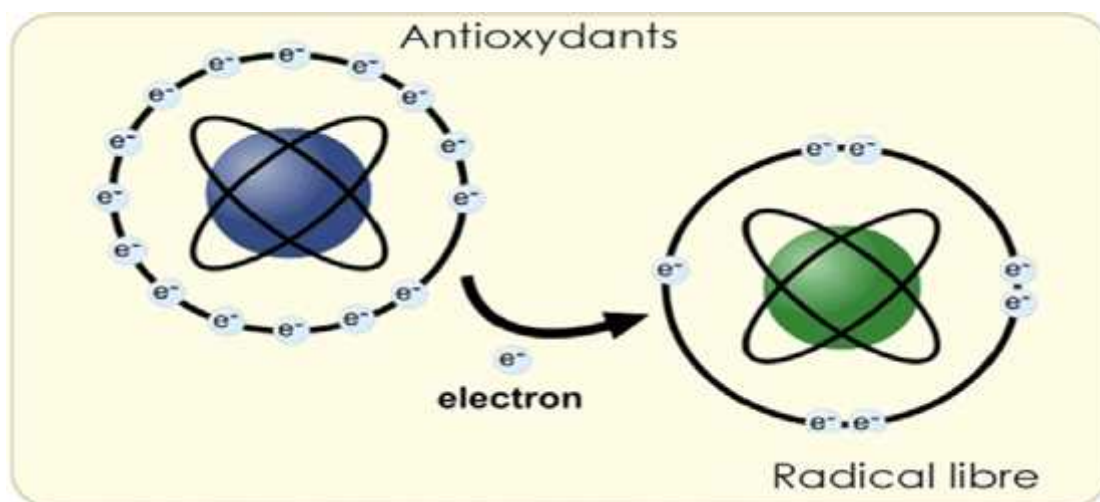


Figure 05: Schéma de système de Mécanisme d'action des antioxydants

7. Les polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 9000 structures connues différentes (**Bahorun, 1997**). Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins (**Akowauh et al., 2004**). Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (**Martin et Andriantsitohaina, 2002**).

Ces corps jouent un rôle fondamental car sont des éléments importants de qualités sensorielles (couleur et caractères organoleptiques) et nutritionnelles des végétaux, tels que les légumes, les fruits, les céréales ou les fruits secs, ainsi que dans les boissons, le café, le cacao ou le thé. que consomme l'homme environ un gramme de polyphénols chaque jour, soit dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de caroténoïdes ou vitamine E (**Scalbert et al., 2005**).

Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al., 2005**).

7.1. Structure chimique et classification des polyphénols

La structure chimique est identique à tous les polyphénols : un ou plusieurs noyaux aromatiques hydroxylés. Les polyphénols sont classés en différents groupes et en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des éléments qui les relient.

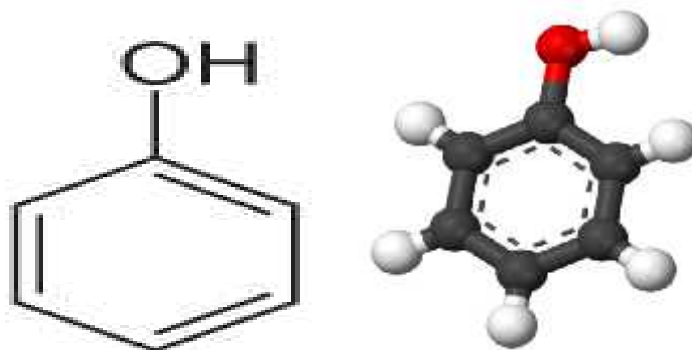


Figure 06: Structure du phénol (C₆H₆O)

On distingue les phénols simples (parmi eux les acides phénoliques), les flavonoïdes, les lignanes et les stilbènes (Boros et al., 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 selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base (Tab 03).

Tableau 03: Principales classes des polyphénols (Macheix et al., 2005).

Squelette carboné	Classe
C_6	Phénols simples
$C_6 - C_1$	Acides hydroxybenzoïques
$C_6 - C_3$	Acides hydroxycinnamiques Coumarines
$C_6 - C_4$	Naphtoquinones
$C_6 - C_2 - C_6$	Stilbènes
$C_6 - C_3 - C_6$	Isoflavonoïdes, Flavonoïdes <ul style="list-style-type: none"> • Flavonols • Anthocyanes • Flavanones • Flavanols
$(C_6 - C_3)_2$	Lignanes
$(C_6 - C_3)_n$	Lignines

7.2. Biosynthèse des polyphénols

7.2.1. La voie de Shikimate

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques, elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Yao et al., 1995).

7.2.2. La voie des phénylpropanoïdes

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose. (Yao *et al.*, 1995).

7.3. Effets biologiques et antioxydants des polyphénols

Les polyphénols ont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure et chimique. Ces derniers ont également un rôle dans le contrôle de la croissance et le développement des plantes en interagissant avec les diverses hormones végétales de croissance. Ils participent directement aux réactions de stress environnementaux, comme les attaques par les ravageurs et contribuent au processus de guérison de la plante par la lignification des tissus endommagés (Manach *et al.*, 2004).

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques dans la qualité alimentaire, impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques.

La capacité d'une espèce végétale à résister les stress biotiques et abiotiques est souvent corrélée avec la concentration en composés phénoliques (Bahorun, 1997).

Les polyphénols sont capables d'agir comme des antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Leurs structures leur confèrent une activité antioxydante aussi importante. Les groupes hydroxyle des polyphénols sont bien des donneurs d'atomes d'hydrogènes ; ils peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactifs de l'azote, enfin de réaction, le cycle de génération de nouveaux radicaux est interrompu. Suite à l'interaction avec les espèces réactives initiales, la forme radicalaire de l'antioxydant est produite, ayant une plus grande stabilité chimique que le radical initial. L'interaction des groupes hydroxyle de composés phénoliques avec les électrons du noyau benzénique donne aux molécules des propriétés particulières, le plus notamment la capacité à générer des radicaux libres, où le radical est stabilisé par la délocalisation. Le pouvoir antioxydant des polyphénols est également attribué à leur capacité à chélater les métaux ioniques impliqués dans la production de radicaux libres. Cependant, les polyphénols peuvent agir comme des prooxydants (Laughton *et al.*, 1989 ; Halliwell, 2008).

Les polyphénols peuvent agir selon divers mécanismes

(Handique et Baruah, 2002 ; Chrebil, 2006 ; Rolo *et al.*, 2009) :

-Inhibition enzymatique

-Chélation des ions métalliques

-Piégeage des radicaux libres

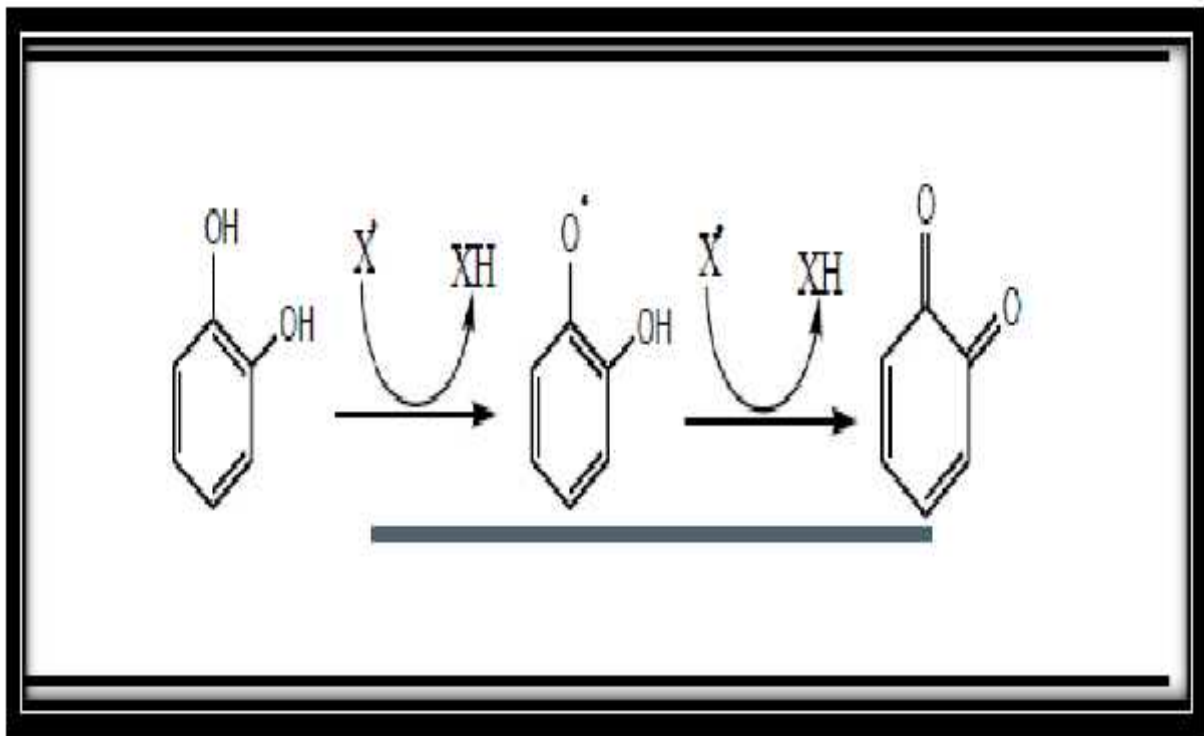


Figure 07: Piégeage des ERO par les polyphénols

CHAPITRE II:
Matériel et
méthodes

1. Matériel végétale

L'étude a porté sur dix variétés de blé dur (*Triticum durum Desf.*) d'origine diverses, introduites et locales. (Institut Technique des Grands Culture I.TG.C, El khroub-Algérie).

Variétés	Origines	Abréviations
Vitron	Espagne	V1
Gta dur	Mexique (Cimmyt)	V2
Waha	Syrie	V3
Cirta	Algérie (El khroub)	V4
B17	Espagne	V5
Wahbi	Algérie	V6
Otb4(3)	Algérie	V7
Ter(2-1)	Algérie	V8
F43	Algérie	V9
Bousselem	Algérie (Sétif)	V10

Tableau 04: Les dix variétés étudiées de blé dur (*Triticum durum Desf.*) et leurs origines

2. Conduite de l'essai

L'expérimentation à été conduite sous serre (Bio pole, Chaabat Erssas), Université des Frères Mentouri Constantine.

Cette étude à été réalisée en pots, portant sur dix variétés de blé dur dans des conditions expérimentales semi contrôlées (sous serre).

Les dix variétés de blé dur ont été germées dans vingt pots en plastiques contenant un mélange de 2/3 sol et 1/3 sables sachant que pour chaque variété un pot témoin et un stressé. L'étude de la réponse des dix variétés de blé dur face au stress hydrique a été réalisée au début de stade montaison, l'application du stress est dix jours.



Figure 08: Les dix variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) sous serre

3. Mise en Expérimentations

Dans cette étude ont pratiqué le dosage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et la peroxydation lipidique à travers le dosage de malondialdéhyde (MDA), ainsi le dosage des protéines totales et des polyphénols totaux. Pour s'assurer que les résultats sont fiables, le dosage de chaque technique a été réalisé en deux répétitions pour chaque variété témoin et à trois répétitions pour chaque variété stressée.

3.1. Dosage de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Loreto et Velikova, 2001)



Figure 09: Dosage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

3.1.1. Technique de dosage

- La solution végétale (0.1 g de feuilles et 5 ml d'acide Trichloracétique TCA à 1 %)
- La solution végétale est broyée dans un bain à glace.
L'homogénat est centrifugé à 12000 g pendant 15 min.
- 0.5 ml 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**

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



Figure 10: Dosage de malondialdéhyde (MDA)

3.2.1. Technique de dosage

- 50 mg de poids secs de feuilles sont broyées dans un mortier-pilon broyées puis homogénéisés dans 2 ml d'acide Trichloracétique (TCA) à 1 %.
- L'homogénat est centrifugé à 15000 g pendant 10 min à 4°C.
- 0,6 ml du surnageant.
- 1,6 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.**

3.3. Dosage des protéines totales (Lowry et al., 1951)



Figure 11: Dosage des protéines totales

3.3.1. Réactif utilisés

- Solution A : réactif de Folin-Ciocalteus dilué de moitié dans la soude 0,1N ;

- Solution B : carbonate de sodium (2 %, m/v) préparé dans la soude 0,1N ;

- Solution C1 : sulfate de cuivre (0,5 %, m/v) préparé dans de l'eau distillée ;

- Solution C2 : tartrate double de sodium et de potassium (1%, m/v) préparé dans de l'eau distillée ;

- Solution D : préparée extemporanément à partir de 100 µl de solution C1, 100 µl de solution C2 et 10 ml de solution B.



Figure 12: Préparation des solutions A,B,C1,C2,D

3.3.2. Technique de dosage

- La solution végétale (0.1 g de feuilles broyées avec 5 ml d'eau distillée)
- 200 μ l de préparation protéique ont été dilués dans 2 ml de solution D.
- 200 μ l de solution A ont été ajoutés à ce mélange.

Le milieu réactionnel a été agité et laissé reposer pendant 30 min à l'obscurité pour permettre le développement de la coloration. La densité optique de l'essai a été mesurée à 600 nm.

La densité optique obtenue a été ensuite convertie en mg de protéine par ml grâce à une droite d'étalonnage du sérum albumine bovine qui a été utilisé comme protéine de référence préparée dans les mêmes conditions.

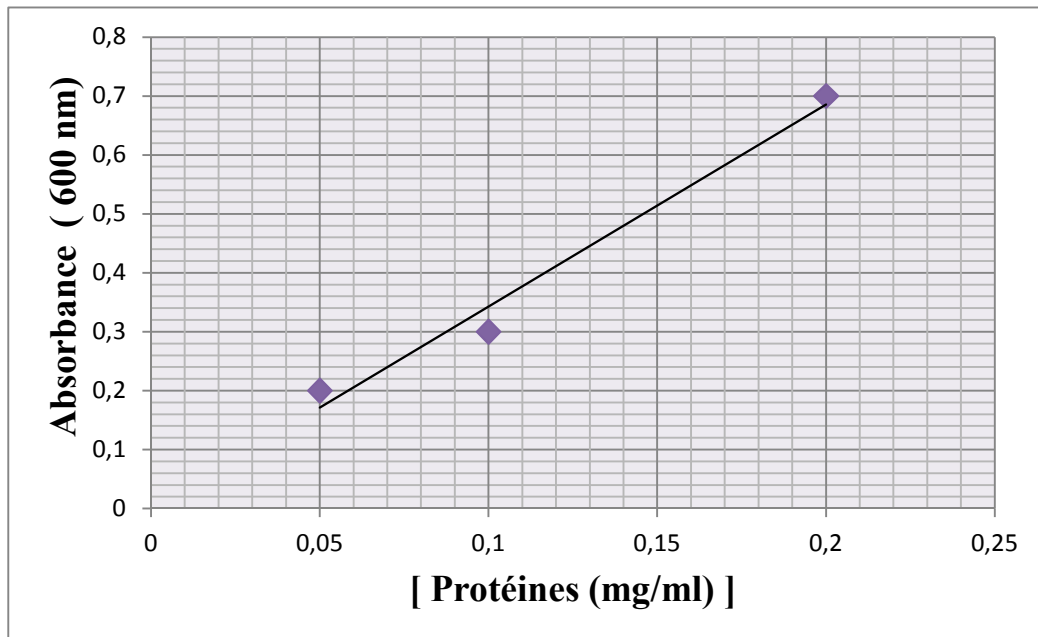


Figure 13: Courbe d'étalonnage de BSA pour le dosage des protéines totales.

3.4. Dosage des polyphénols totaux (Singleton et Rossi, 1965)



Figure 14: Dosage des polyphénols totaux

3.4.1. Technique de dosage

- La solution végétale (0.1 g de feuilles broyées avec 2 ml d'eau distillée chaude).
- Réactif de Folin Ciocalteu (1 ml).
- Le bicarbonate (CO_3Na_2) à 4,25% (20 ml).
- On porte au bain-marie à 70°C pendant 20 minutes.
- Après refroidissement on détermine la densité optique à 760 nm.
- Les résultats obtenus sont exprimés en mg par ml, en utilisant la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

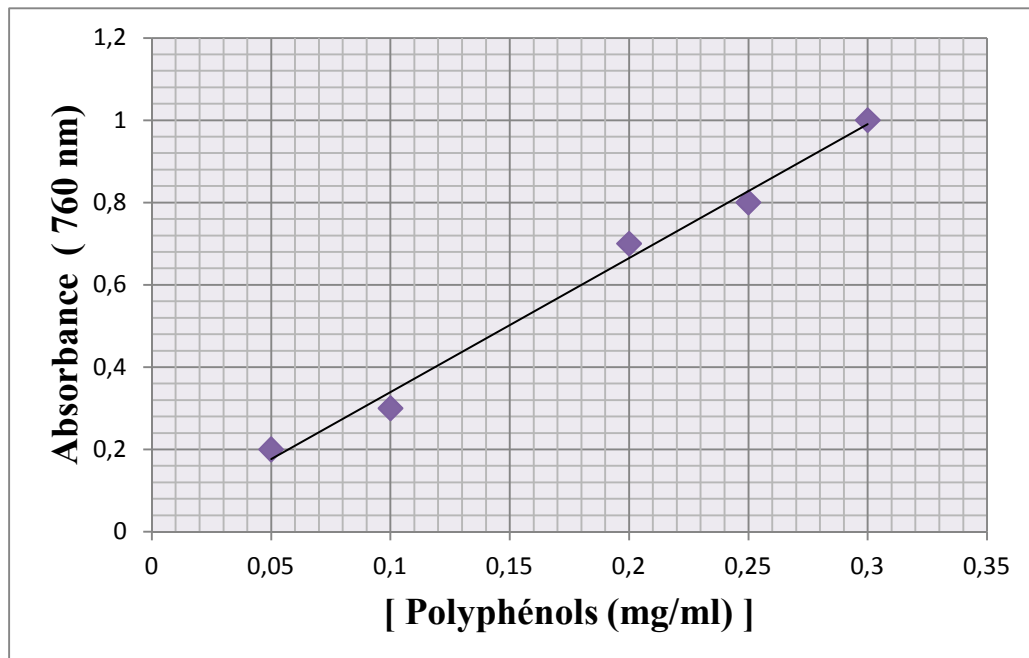


Figure 15 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

4. Analyse statistique des données

L'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur de classification a été utilisée à l'aide du logiciel Excel Stat (2014).

CHAPITRE III :
Résultats et
discussion

Tableau 5 : Les résultats des concentrations différentes étudiées avec des Statistiques descriptifs

Génotypes	Polyphénols		Protéines		H ₂ O ₂		MDA	
	T	S	T	S	T	S	T	S
Vitron	0.040	0.045	0.370	0.255	8.413	8.733	5.662	11.546
Gta dur	0.040	0.050	0.343	0.313	7.675	12.408	4.417	18.656
Waha	0.040	0.045	0.310	0.187	7.000	8.875	8.447	15.630
Cirta	0.040	0.050	0.320	0.257	7.400	10.216	5.192	17.545
B17	0.070	0.080	0.297	0.328	8.325	8.883	2.945	32.756
Wahbi	0.040	0.050	0.341	0.252	11.338	10.775	3.545	27.323
Otb4(3)	0.060	0.060	0.250	0.243	6.575	4.841	5.812	20.685
Ter(2-1)	0.070	0.080	0.258	0.249	9.525	9.591	2.980	18.471
F4/3	0.040	0.050	0.332	0.286	7.588	13.991	29.767	30.446
Bousselem	0.060	0.060	0.286	0.160	7.025	5.975	3.283	32.731
Minimum	0.040	0.040	0.250	0.154	6.250	4.275	2.077	11.625
Maximum	0.070	0.080	0.400	0.344	11.575	14.175	30.550	36.735
Moyenne	0.050	0.056	0.311	0.253	8.086	9.429	7.249	23.080
Ecart-type	0.0131	0.0134	0.043	0.050	1.456	2.660	8.153	7.220
Pr > F	NS	***	*	***	***	***	***	***

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le stress a augmenté la concentration d'H₂O₂ chez les géotypes étudiés.

La plus grande concentration est bien marquée chez la variété stressée **F43** avec une valeur maximale de 13,991 (g/mol) par rapport aux témoins.

Tandis que la variété stressée **Otb4(3)** présente une valeur minimale de 4,841(g/mol) par rapport aux témoins, avec une moyenne de 9,429 (g/mol) entre les dix variétés stressées et une moyenne de 8,086 (g/mol) entre les dix variétés témoins (Fig16).

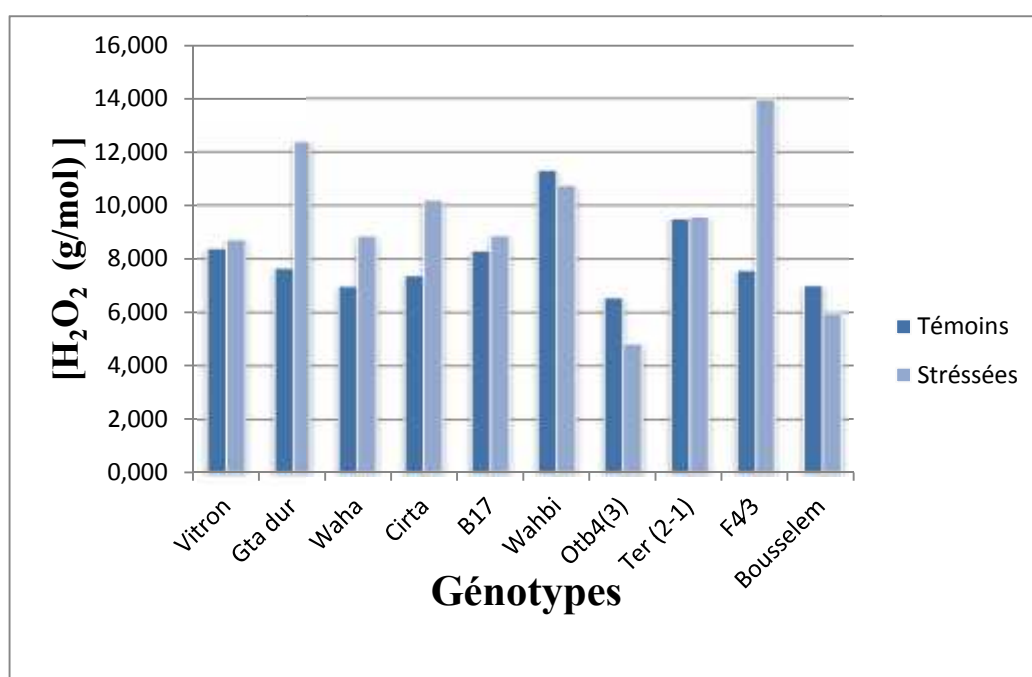


Figure 16 : La concentration de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez les dix variétés étudiées

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré une très grande signification chez les variétés témoins et stressés $P < 0,001$ (Tab5).

Le H₂O₂ joue le rôle d'une molécule signal qui alerte la cellule de la présence d'un stress environnemental (Rentel et Knight, 2004 ; Maksymiec, 2007).

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peut fonctionner comme un messenger secondaire à des faibles concentrations mais il devient toxique à fortes concentrations (Dat et al., 2000).

Le malonedialdéhyde (MDA)

Les premières cibles des ERO 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. 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 (Pamplona *et al.*, 2000).

Le MDA joue un rôle d'indicateur de stress abiotique par conséquent il peut être utilisé comme bio marqueur du stress oxydatif (Funes *et al.*, 2006 ; Ladhar *et al.*, 2007).

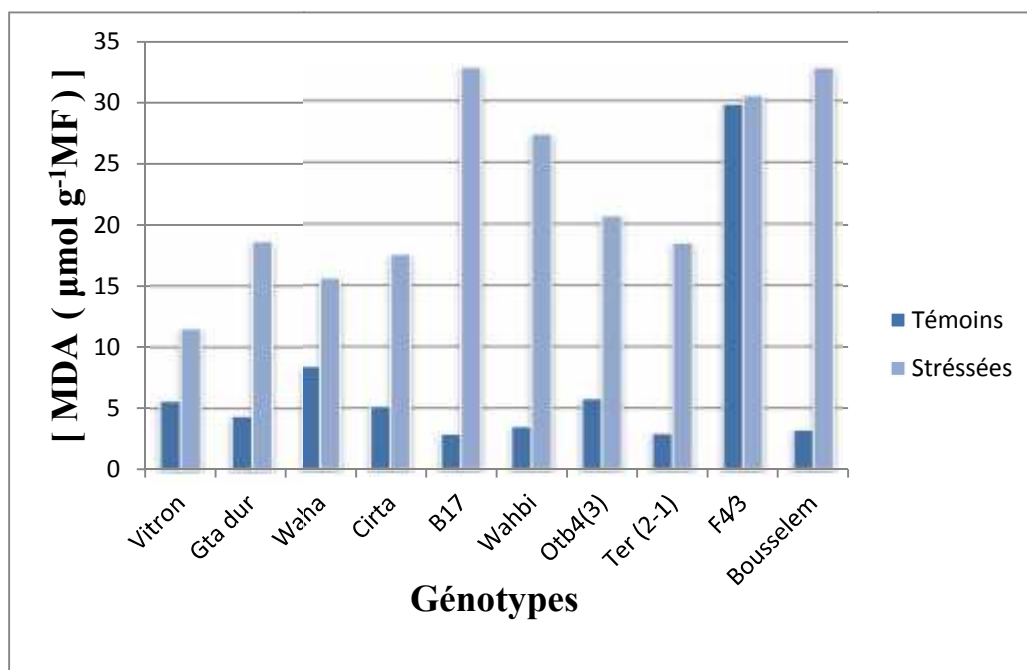


Figure 17 : La concentration de malonedialdéhyde (MDA) chez les dix variétés étudiées

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré une très grande signification chez les dix variétés témoins et stressés $P < 0,001$ (Tab5).

Le stress a augmenté la concentration du malonedialdéhyde (MDA) chez les génotypes étudiés (Fig 17).

La valeur maximale est noté chez la variété stressée **B17** de 32,756 ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$) par apport aux témoins. Tandis que la variété stressée **Vitron** présente une valeur minimale de 11,54 ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$) par apport aux témoins.

La moyenne est de 23,080 ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$) entre les variétés stressées et de 7,249 ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$) entre les variétés témoins.

Les protéines totales

Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques par l'action des ERO. L'oxydation des protéines conduit à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures : perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases... (Stadtman et Levine, 2000).

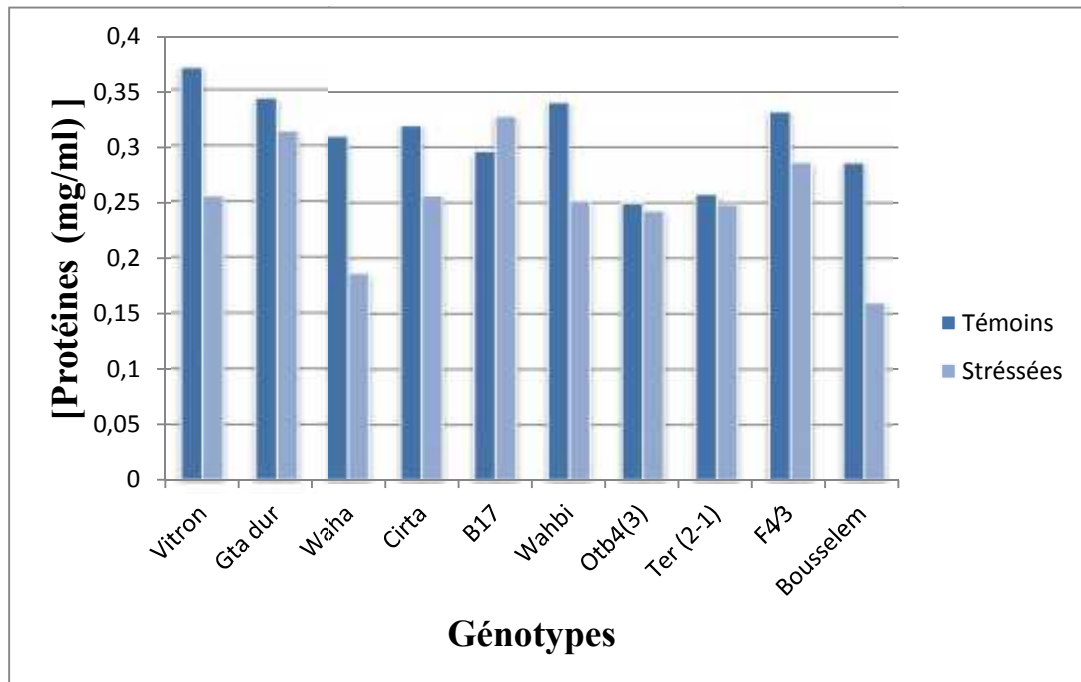


Figure 18 : La concentration des protéines totales chez les dix variétés étudiées

Dans cette étude le stress a diminué la concentration des protéines chez les génotypes étudiés (Fig18).

Cette diminution est marquée chez la variété stressée **Bousselem** avec une valeur minimale de 0,160 (mg/ml) par rapport aux témoins, par contre la variété stressée **B17** a marqué une valeur maximale de 0,328 (mg/ml) par rapport aux témoins.

La moyenne est de 0,253 (mg/ml) entre les dix variétés stressées et de 0,311 (mg/ml) entre les dix variétés témoins.

L'analyse de la variance (ANOVA) a été très significative chez les dix variétés témoins et stressés $P < 0,001$ (Tab 5).

Les polyphénols totaux

La figure 19 montre que dans les feuilles, la concentration des polyphénols varie d'une variété à une autre; En effet : Elle a augmenté chez les génotypes étudiés après le stress appliqué. Cette augmentation est bien marquée chez les deux variétés stressées **B17** et **Ter (2-1)** avec une valeur maximale de 0,080 (mg/ml) par rapport aux témoins.

Tandis que les deux variétés stressées **Vitron** et **Waha** présentent une valeur minimale de 0,045 (mg/ml) par rapport aux témoins, avec une moyenne de 0,056 (mg/ml) entre les dix variétés stressées et une moyenne de 0,050 (mg/ml) entre les dix variétés témoins.

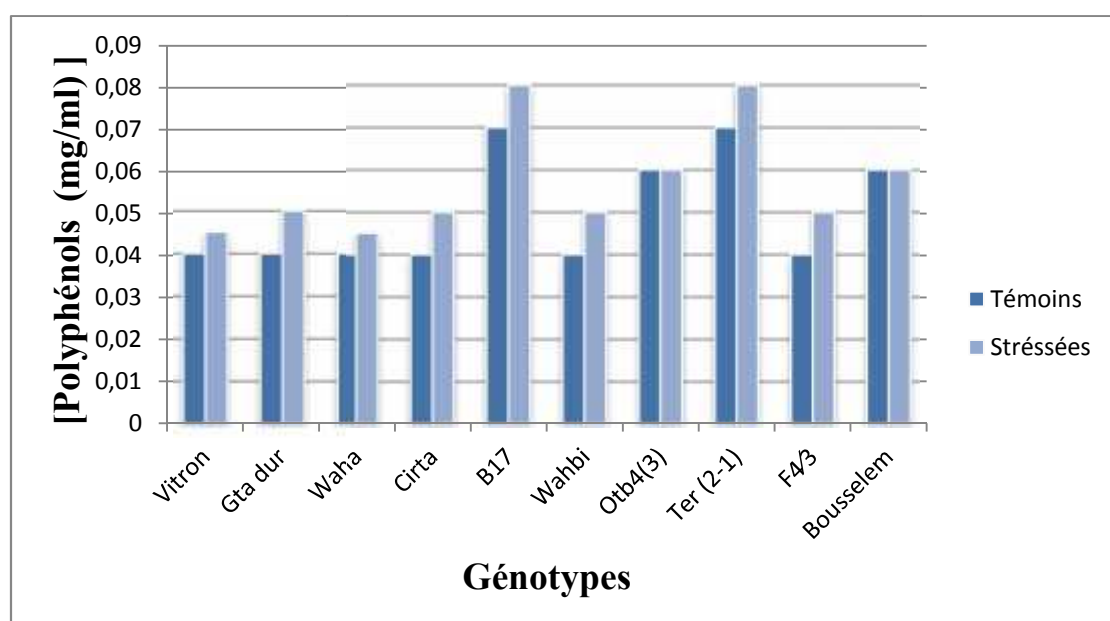


Figure 19 : La concentration des polyphénols totaux chez les dix variétés étudiées

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré une très grande signification chez les variétés stressées $P < 0,001$. Contrairement aux variétés témoins qui ont été non significatif $P > 0,05$

Les polyphénols expriment les propriétés anti-oxydantes 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 antioxydants 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**).

Discussions générales

Le stress a provoqué une perturbation dans tous les paramètres étudiés chez les dix variétés étudiées en effet Les variétés **B17**, **Ter (2-1)**, **Bousselem**. Ont montré une très grande tolérance par rapport aux autres variétés.

Nos résultats montrent une augmentation très élevée des concentrations de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) chez variétés stressées par rapport aux témoins notamment chez la variété **F43**. La variation de l'activité des peroxydases est observée chez plusieurs espèces cultivées sous différents stress abiotiques et biotiques, ces stress provoquent une augmentation des peroxydases (**Khales et Baaziz, 2006**).

La concentration de malondialdéhyde (MDA) a été augmentée chez les variétés stressées par rapport aux témoins. Plus au moins chez la variété **B17**. L'augmentation de la concentration de MDA au niveau des feuilles confirme que les ERO produites ont généré une peroxydation lipidique (**Zeriri et al., 2012**).

Récemment, (**Daud et al., 2015**) constate aussi que le niveau de MDA augmente chez le Cotton(*Gossypium hirsutum*L.) stressé.

Le concentration du MDA invariable semble être une caractéristique des plantes tolérantes au stress hydrique et le degré des dégâts oxydatifs cellulaires des plantes exposées aux stress abiotiques est fonction de la capacité des plantes à se protéger contre les agents oxydatifs (**Shalata et Tal, 1998 ; Shalata et al., 2001 ; Ashraf et al., 2004**).

Concernant les protéines nos résultats montrent une diminution des concentrations protéiques des variétés stressées par rapport aux témoins. Sauf la variété **B17** qui a résisté l'oxydation lipidique par l'accumulation des protéines.

D'après (**Mahi et al., 2015**) la concentration des protéines d'*Atriplex halimus*, diminuent au niveau des feuilles lors d'un stress oxydatif. Cette diminution est aussi montrée chez le Cotton (*Gossypium hirsutum*L.) stressé (**Daud et al., 2015**).

La concentration des polyphénols des variétés stressées est peut élevée que celle des témoins mais spécifiquement réclamer chez les deux variétés stressées **B17** et **Ter (2-1)**.

Plusieurs travaux ont montré que la tolérance au déficit hydrique est fortement liée à l'efficacité des enzymes antioxydants.

(**Rout et Shaw, 2001 ; Arbona et al., 2003 ; Muscolo et al., 2003**).

Selon (**Zhu et Scandalios., 1994 ; Noctor et al., 1998**), la tolérance au déficit hydrique semble être liée à une augmentation de la capacité antioxydative impliquée dans la détoxification des espèces d'oxygènes réactives (ERO).

Macheix et ses collaborateurs en 1990 signalent que la concentration des polyphénols est très variable d'une espèce à une autre et d'une variété à une autre.

A ce propos plusieurs auteurs (**Abdel et al., 2006 ; Jonnala, 2010 ; Chaib et al., 2015**) ont montrées la richesse des feuilles du céréales en polyphénols lesquels possèdent grand pouvoir antioxydant.

Les polyphénols sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxyde et peroxyles.

(Anderson et al., 1996 ; Hu et al., 2005).

Les Polyphénols bloquent l'auto oxydation et la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En définitive, ces derniers pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des lipides (**Milane, 2004**).

En conclusion, l'impact du stress hydrique est plus important chez les feuilles (**Hichem et al., 2009**), Ils relient la meilleure tolérance à la capacité de ces dernières à accumuler des polyphénols, qui selon ces auteurs, participent efficacement à la restriction des dommages oxydatifs causées par la formation des molécules de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Muscolo et al., 2003**).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La tolérance au stress oxydatif généré sous déficit hydrique demeure la résultante de nombreux mécanismes adaptatifs fonctionnels durant la vie de la plante.

Pour que la plante survive elle nécessite des modifications morphologiques, métaboliques et moléculaires. Ces changements doivent aider à la fois à minimiser les effets nocifs des stress.

La réponse des plantes au changement de stress varie selon l'intensité du stress et les caractéristiques de la plante même.

Les résultats de cette étude ont montré que le déficit hydrique à influencer sur les différents paramètres biochimiques étudiés chez les variétés étudiées. La feuille semble être affectée par le stress oxydatif. Ceci pourrait être expliqué par l'accumulation et la répartition des espèces réactives d'oxygène (ERO) au sein de la plante par la production importante d'espèces réactives d'oxygène (ERO) et en particulier le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui semblent avoir une concentration très élevée dans la cellule.

Dans cette étude la production de MDA est différente d'une variété à une autre.

La Peroxydation lipidique est corrélée avec l'augmentation de la concentration de malonedialdéhyde (MDA). Contrairement à l'oxydation des protéines qui sont corrélée avec la diminution des protéines.

Le stress hydrique provoque une augmentation importante en polyphénols au niveau des feuilles des dix variétés de blé dur, Cette tolérance se manifeste à une forte concentration en molécules antioxydantes.

En fin, on peut dire que les dix variétés de blé dur utilisent les mêmes stratégies pour tolérer les différents stress abiotiques.

Comme perspectives on propose de :

- Faire une étude approfondis sur les trois variétés étudiées : **B17, Ter (2-1), Bousselem.**
- Faire un croisement multiple entre les variétés **B17 x Ter (2-1)** et **B17 x Bousselem** pour obtenir des variétés qui reflète sur le rendement sous les conditions de la sécheresse.

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

Références bibliographiques

A

Abdel-Aal ES. M., Young J.C., Rabalski I., 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, and red cereal grains. *Agric. J., Food Chem*, 544696.

Abeledo L.G., Savin R., Gustavo A. et Slafer., 2008. Wheat productivity in the Mediterranean Ebro Valley: Analyzing the gap between attainable and potential yield with a simulation model. *Europ. J. Agronomy*. 28: 541-550.

Akowauh G.A., Zhari I., Norgyati I., Sadikun A., Khamsah S.M., 2004. The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry*.87: 559-566.

Anderson C.M., Hallberg A., Hogberg T., 1996. Advances in the developpement of pharmaceutical antioxidant drug.. *Food Chemistry*. 28: 65-180. *Arabidopsis. Plant Physiology* 135: 1471–1479.

Antwerpen P-V., 2006. Contribution à l'étude du pouvoir antioxydant de divers agents d'intérêt thérapeutique : Ciblage du système myeloperoxydase /peroxyde d'hydrogène / chlorure Thèse de Doctorat .Université libre de Bruxelles. 122

Arbona V., Flors V., Jacas J., García-Agustín P. et Gómez-Cadenas A., 2003. Enzymatic and Non-enzymatic Antioxidant Responses of Carrizo citrange, a Salt-Sensitive Citrus Rootstock, to Different Levels of Salinity, *Plant Cell Physiol*, vol. 44, no 4: 388-394.

Arora A., Sairam R., Srivastava G.; 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**, 1227-1230.

Ashraf M et. Harris P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, *Plant Science*, vol. 166, no 1: 3-16.

Azevedo Neto A., Prisco J., Eneas-Filho J., De Abreu C., Gomes- Filho E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and saltsensitive maize genotypes. *Environ Exp Bot*. 56: 87-94.

B

- Bahorun T, 1997.** Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritias.83-94.
- Bartosz G, 2003.** Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments on Toxicology. 9 : 5-21.
- Beaugrand J, 2004.** Bases cytologiques et moléculaires de la dégradation enzymatique du son de blé tendre. Thèse de Doctorat. Univ de reins Champagne – Ardenne. Coll.INRA.
- Bennefont Rousselot D., Therond P. et Delattre J., 2003.** Radicaux libres et antioxydants. Ed :Flammarion Médecine-Sciences.59-81.
- Berlett B. S et Stadtman E. R., 1997.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative Stress. The Journal of biological chemistry 272: 20313-20316. Deprivation Stress: a Review. Annals of Botany 91(2): 179-194.
- Bérubé R., Malenfant J., Gauvin, D., Biais M., Gagnon E., Dumas R., Racine M.C., Bourque J., Bélanger A., 2000.** Quantitation of androgenic and estrogenic steroids in rat and monkey sérum using gas chromatography and négative chemical ionization mass spectrometry. Proc 48th ASMS Conférence on Mass Spec-trometry and Allied Topics, Long Beach, CA.605.
- Blandine G , 2006.** Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes : (*Rhantherim adpressum* et *Ononis anfastissimma*).Thèse de doctorat.Université de Constantine.
- Bohnert, H .J., Nelson , D.E. et Jensen, R.G., 1995.** Adaptations to environmental stresses.Plant Cell 7: 1099-1111.
- Boros B., Jakabova S., Dornyei A., Horvath G., Pluhar Z ., Kilar F., Felinger A., 2010.** Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography–mass spectrometry in Thymus species. Journal of Chromatography A. 1217 : 7972–7980.
- Boudiaf K, 2006.** Etude des effets anti-xanthine oxydoreductase et anti -radicalaires des extraits des graines de Nigella sativa. Mémoire de magister –Université de Sétif.
- Boyd B., Ford C., Koepke Michael C., Gary K., Horn E., McAnalley S. et McAnalley B., 2003.** Étude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. GlycoScience & Nutrition. 4-6-7.

C

Chaib Gh., Bouchelaleg A. et Talbi R., 2015. Etude phytochimique de quelques variétés de blé tendre (*TRITICUM AESTIVUM*) et d'orge (*HORDEUM VULGARE*) et leurs activités biologiques. European Scientific Journal October 2015 edition vol 11. No: 30. ISSN: 1857 – 7881.

Chaise L., Ferla A. J., Honore A. et Moukhli R., 2005. L'impact du changement climatique sur l'agriculture en Afrique. Atelier Changement Climatique. ENPC.

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

Chebab S., Belli N., Leghouchi E., Lahouel M., 2009. Stress oxydatif induit par deux pesticides : l'endosulfan et le chlorpyrifos. Environnement, Risques.

Chellali B., 2007. Marché mondial des céréales : L'Algérie assure sa sécurité alimentaire. <http://www.lemaghreb.dz.com/admin/folder01/une.pdf>.

Mefti M., Abdelguerfi A. et Chebouti A., 2000. Etude de la tolérance à la sécheresse chez quelques populations de (*Medicago truncatula* L.) Gaertn. Options Méditerranéennes HEAM.173-176.

Chrebil L., 2006. Acylation des flavonoïdes par les lipases de *Candida antarctica* et de *Pseudomonas cepacia* : études cinétique, structurale et conformationnelle. Thèse de Doctorat : Institut national polytechnique de LORRAINE.

D

Dat J., Vandenaabeele., 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

Daud M.K, Quiling H, Lei M, Ali B. et Zhu S.J., 2015. Ultrastructural, metabolic and proteomic changes in leaves of upland cotton in response to cadmium stress, Chemosphere, vol. 120: 309-320.

E

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

F

Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdelly C., 2008. Phenolic composition of (*Cynara cardunculus* L.) organs, and their biological activities. *C.R.Biologies*. 331: 372-379.

Faridovich I, 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64:97-112.

Favier A, 2003. Le stress oxidant : Intérêt conceptuel et experimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, *Mécanismes biochimiques*. 108-115.

Feillet P, 2000. Le grain de blé : composition et utilisation. INRA. Paris.

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

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

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

Funes V Alhama J, Navas JI, Inpez Barea J, Peinado J., 2006. Ecoroxicological etrects of metal pollution in two mollusk species Iiom the Spanish South Adantic littoral *Environmental Pollution*. 139:214-223.

G

Gardes-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène : comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? L'actualité chimique.

Garrel C., Ceballos-Picot I., Germain G. et Al-Gubory K.H. ., 2007. Oxidative stress inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂alpha-induced luteal cell death in vivo. *Free radical research* 41 : 251-9.

Godon B, 1985. Protéines végétales. Ed. Lavoisier. 162- 235.

Gutteridge JM et Halliwell B, 1992. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radic Biol Med.* 12: 93-95.

H

Halliwell B, 2008. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics.*476: 107–112.

Handique J.G et Baruah J.B, 2002. Polyphenolic compounds : an overview. *Reactive &Functional Polymers* 52, 163–188. *Journal of the American Oil Chemists Society.*73:1617 1625.

Haton C, 2005. Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale.Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France.43.

Hernández J.A et Almansa 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.

Hernandez J.A., Ferrer M.A., Jimenez A., Ros-Barcelo A., et Sevilla F., 2001. Antioxidant systems and O₂/H₂O₂ production in the apoplast of (*Pisum sativum L*). leaves: its relation with NaCl induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiol.* 127: 817-31.

Hichem H.,Mounir D. et Naceur E.A., 2009. Differential responses of two maize (*Zea mays L.*) varieties to salt stress: Changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages, *Industrial Crops and Products*, vol. 30, no 1: 144-151.

Hopkins, 2003. Physiologie végétale. Ed. Révision scientifique de Charles. Marie Evard . 23-453.

Larcher W, 2001. Physiologie plant ecologie. 4 the edition .Ed. Based on the translation of the third edition. 350.

Hu Z.Z., Narayanaswamy M., Ravikumar K.E., Vijay-Shanker K. et Wu C.H., 2005. Literature mining and database annotation of protein phosphorylation using a rule-based system. 2759–2765.

Huang D., Ou B., Prior RL., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 53 (6): 1841-56.

J

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

Jacques B et André R, 2004. *Biochimie métabolique* Ed ellipses.Paris: 217-219-220-223-225.

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

Jonnala R.S, 2010. Phenolics in the bran of waxy wheat and triticale.

K

Kangasjarvi J.,Talvinen J., Utriainen M., Karjalainen R., 1994. Plant defence system induced by ozone. *Plant Cell Environ.*17:783-794.

Kawaguchi R., Girke T., Bray E.A., Bailey-Serres J., 2004. Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 38: 823-39

Khales A. et Baaziz M, 2006. Etude des peroxydases d'écotypes d'*Opuntia ficus indica* L. en relation avec le développement dans des conditions de stress salin. In *Actes du Deuxième Congrès International de Biochimie*, Baaziz, M.,Hakkou, A. et Serghini, A.133-136.

Koechlin et Ramonatxo C, 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutritionclinique et métabolisme*. 20 : 165–177.

L

Ladhar Chaabouni R, Gargoun R, Hamza Chaffai A., 2007. Effect of cadmium on some biomarkers in the clam *Merâllothionein* quantification by using two techniques. *International Journal of Environment and Pollution*. 10:593-601.

Lapointe J., Bilodeau J.F., 2003. Antioxidant défenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle. *BiolReprod* 68:1157-1164.

Lapointe J., Kimmins S., Maclaren L.A., Bilodeau J.F., 2005. Estrogen selectively upregulates the phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in the oviducts. *Endocrinology* 146:2583-2592.

Larbi A., Mekliche A., Abed R., Badis M., 1998. Effet du déficit hydrique sur la production de deux variétés de blé dur (*Triticum turgidum L. var. durum*) en région semi-aride. *CIHEAM - Options Méditerranéennes*. 295-297.

Laughton M. J., Halliwell B., Evans P. J., Robin J. et Hault, S. 1989. Antioxidant and prooxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochemical Pharmacology* 38 (17) : 2859-2865.

Lawlor D.W et Cornic G, 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environ* 25: 275-294.

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.

M

Macheix J.J., Fleuriet A. et Billot J., 1990. Fruit phenolics. CRC press, Boca Raton. 1-28.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., 2005. Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne. 4-5.

Mahi Z., Dedaldechamp F., Maurousse L., Lemoine R. et Belkhodja M., 2015. Etude de la Peroxydation Lipidique (MDA) et l'Activité Antioxydative (POD) Chez Deux halophytes: (*Atriplex halimus L.* et *Atriplex canescens*) Pursh Nutt sous l'Effet du Sel , *International Journal of Innovation and Applied Studies* ISSN 2028-9324 Vol. 10 No 1 : 450-458.

Maksymiec W, 2007. Signaling responses in plants to heavy metals. *Acta Physiol.Plant* 29 : 177-187.

Manach C., Scalbert A., Morand C, Remesy C., Jimenez L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79(5): 727-747.

Marfak A, 2003. Thèse de doctorat Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools : 6-7-10.

Martin S et Andriantsitohaina R, 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. 51 : 304–315.

Martinez et Cayuela M., 1995. Oxygen free radicals and human disease. *Biochem.*77:147-161.

Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Van Breusegem F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends plant Sci* .9: 490.

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

Muscolo A, Sidari M et. Panuccio M. R ., 2003. Tolerance of kikuyu grass to long term salt stress is associated with induction of antioxidant defences, *Plant growth regulation*, vol. 41, no 1: 57-62.

N

Noctor G et Foyer C.H, 1998. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 49, no 1: 249-279.

Noctor G., Arisi A., Jouanin L., Kunert K., Rennenberg H. et Foyer C., 1998. Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49(321).623-647.

P

Pamplona R., Portero-Otín M., Riba D., Requena J. R., Thorpe S. R., López-Torres M., 2000. Low fatty acid unsaturation: a mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 55, 286–291

Parent C., Capelli N. et Dat J., 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies* 331: 255-261.

Pell B., Gat E., Keesing R., Muscettola N. et Smith B. 1997. Robust periodic planning and execution for autonomous spacecraft. In *Procs. of IJCAI-97*.

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

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O., 1999. L'évaluation du stress oxydatif photosynthétique des tissus. Foyer C.H., editor. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. USA : CRC Press Ed. 77-104.

Podsdek A, 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A

Powers S.K., Lennon S.L. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. Proc Nutr Soc. 58: 1025-1030.

Prats J et Grandcount M.C, 1971. Les céréales 2^{ème} éd. Coll d'enseignement Agricole. 288.

R

Rahnama H., Ebrahimzadeh H, 2005. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedling. Biol Plant 49(1): 93-97.

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.

Rentel M et Knight M.R, 2004. Oxidative stress-induced calcium signaling in Arabidopsis. Plant Physiol. 135 : 1471-1479.

Rentel MC, Knight MR. 2004. Oxidative stress-induced calcium signaling in review. *LWT*. 40:1-11.

Ribereau G P, 1968. Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, 254 .

Rolo-Naranjo A., Rebollido-Rios R., Melchor-Rodriguez K., Codorniu-Hernández E., 2009. Pseudo-phase portrait applied to pattern recognition in flavonoid–protein interactions. Applied Mathematics and Computation 215: 156–167.

Rout N.P et Shaw B.P, 2001. Salt tolerance in aquatic macrophytes : possible involvement of the antioxidative enzymes , Plant Science, vol. 160, no 3: 415-423.

S

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 45: 287–306.

Shalata A et Tal M, 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative (*Lycopersicon pennellii*), *Physiologia Plantarum*, vol. 104, no 2: 169-174.

Shalata A., Mittova V., Volokita M., Guy M. et Tal M., 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative (*Lycopersicon pennellii*) to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system, *Physiol Plant*, vol. 112, no 4: 487-494.

Shimizu H, 2004. Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population :the Hisayama study, *Stroke*,35 (9) : 2072-2077.

Simonian N. A et Coyle J. T, 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. Annual review of pharmacology and toxicology 36 : 83-106.

Singleton V.L., Rossi J.A., Jr., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*.16 : 144-158.

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

Sorg O, 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 327: 649-662.

Stadtman E. R., et Levine, R. L,2000. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899 :191-208.

Sturtz L.A., Diekert K., Jensen L.T., Lill R., Culotta V.C., 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*.276: 38084-38089.

T

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

U

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

V

Vansant G, 2004. Radicaux libres et antioxydants : principes de base. Ed Institut Danone.

W

Wang W.X., Vinocur P., Altman A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures : towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*. 218: 1-14.

Wardman Pet Caneias Fenton L.P, 1996. Chemistry an introduction Radiation Res.145: P/5326531.

Y

Yao K., De Luca V. et Brisson N., 1995. Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell*. 7: 1787-1799.

Yun H.Y., Dawson V.L., Dawson T.M., 1997. Nitric oxide in health and disease of the nervous System. *Mol Psychiatry* 2:300-310.

Z

Zeriri, I., Tadjine, A., Grara, N., Belhaouchet, N., Berrebbah, H. et Djebar, M.R.,

Zhu D et Scandalios J.G, 1994. Differential Accumulation of Manganese-Superoxide Dismutase Transcripts in Maize in Response to Abscisic Acid and High Osmoticum”, *Plant Physiol.*, vol. 106, no 1: 173-178.

Zeriri I., Tadjine A., Grara N., Belhaouchet N., Berrebbah H. et Djebar M.R., 2012. Potential toxicity of an insecticide of the family of carbamates on a bioindicator model of the pollution the earth worm *Octodriluscom planatus (Oligochaeta Lumbricidae)*. *Annals of Biological Research*. 3 (11):5367-5373.

Annexes

Annexes

Statistiques Descriptives

		H ₂ O ₂	Témoin					
Variab	Observatio	Obs. avec	Obs. sans	Minimu	Maximu	Moyenn	Ecart-	
e	ns	données	données	m	m	e	type	
		manquantes	manquantes					
T	20	0	20	6,2500	11,5750	8,0863	1,456	
							0	

Statistiques Descriptives :

		H ₂ O ₂	Stressé					
Variab	Observatio	Obs. avec	Obs. sans	Minimu	Maximu	Moyenn	Ecart-	
e	ns	données	données	m	m	e	type	
		manquantes	manquantes					
S	30	0	30	4,2750	14,1750	9,4292	2,660	
							7	

Analyse de la variance

Témoin					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	9	36,5659	4,0629	10,9410	0,0004
Erreur	10	3,7134	0,3713		
Total corrigé	19	40,2793			
Stressé					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	9	198,6459	22,0718	66,3646	< 0,0001
Erreur	20	6,6517	0,3326		
Total corrigé	29	205,2976			

**Statistiques
Descriptives**

MDA		Témoin					
Variable	Observations	Obs. avec données manquante s	Obs. sans données manquante s	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart- type
6 365	19	0	19	2,0770	30,5500	7,2496	8,1539

**Statistiques
Descriptives**

MDA		Stressé					
Variable	Observations	Obs. avec données manquante s	Obs. sans données manquante s	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
8,06	29	0	29	11,6250	36,7350	23,0800	7,2202

Analyse de la variance

Témoin					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	9	1183,2854	131,4762	87,9564	< 0,0001
Erreur	9	13,4531	1,4948		
Total corrigé	18	1196,7385			

Stressé					
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	9	1366,9078	151,8786	31,1129	< 0,0001
Erreur	19	92,7491	4,8815		
Total corrigé	28	1459,6570			

Statistiques Descriptives		Polyphénols	Témoin				
Variable	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
	19	0	19	0,0400	0,0700	0,0505	0,0131

Statistiques Descriptives		Polyphénols	Stressé				
Variable	Observations	Obs. avec données manquantes	Obs. sans données	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
s	30	0	30	0,0400	0,0800	0,0567	0,0134

Analyse de la variance

Témoin

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	9	0,0031	0,0003		
Erreur	9	0,0000	0,0000		
Total corrigé	18	0,0031			

Stressé

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	9	0,0049	0,0005	29,3939	< 0,0001
Erreur	20	0,0004	0,0000		
Total corrigé	29	0,0052			

Calculé contre le modèle $Y = \text{Moyenne}(Y)$

Année universitaire : 2015/2016

Présenté par : **BENKOLLI Mehdi**
BOUZEGHAIA Bilal

Etude biochimique de dix variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) sous l'effet d'un stress oxydatif généré par un stress hydrique

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Résumé

Dans ce travail on a étudié les caractères biochimiques de dix variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) introduites et locales. Qui sont comparés entre eux pour leurs tolérances et leurs réponses au stress oxydatif généré sous un déficit hydrique.

Les paramètres mesurés sont : le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le dosage de malonedialdéhyde (MDA), ainsi le dosage des protéines totales et des polyphénols totaux.

Une large variabilité est enregistrée entre les variétés. En outre les résultats obtenus montrent que le stress hydrique a entraîné une production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des oxydations lipidiques et protéiques chez les variétés étudiées. Cette variabilité a été évaluée par une analyse statistique.

Ces résultats soulignent également le rôle important des métabolites secondaires (les polyphénols) dans la défense contre le stress oxydatif causé par le stress hydrique, dans la détoxification des espèces réactif de l'oxygène (ERO) en condition de stress.

Ainsi on remarque que les génotypes étudiés qui ont une tolérance efficaces contre le stress hydrique se trouvent chez les génotypes : **B17, Ter (2-1), Bousselem**. Qui ont bien résisté le stress appliqué.

Mots clés : Blé dur, stress hydrique et oxydatif, MDA, H_2O_2 , protéines, polyphénols.

Laboratoire de recherche : laboratoire de nutrition minérale des végétaux

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHIBANI Salih (MCA - UFM Constantine),
Rapporteur : BOUCHAREB Radia (MAA - UFM Constantine),
Examineur : AOUAIDJIA Nawel (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 12/06/2016