



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
STÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIF



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie et Ecologie végétale

قسم : بيولوجيا و علم البيئة النباتية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biologie et génomique végétale*

Intitulé :

Effet du stress salin sur l'expression de deux facteurs de transcription chez la luzerne annuelle *Medicago truncatula* : cas du NAC969 et du BHLH32

Présenté et soutenu par : BOUHABILA Imed Eddine

Le : 18/06/2016

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : M^{elle}. YKHLEF Nadia - Professeur à UFM Constantine 1

Encadreur : M^r. TEMAGOULT Mahmoud - M.A.A à UFM Constantine 1

Examinatrice : M^{me}. BENABDOUN Faiza Meriem - M.C.B à UFM Constantine 1

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciement :

Au terme de ce travail, qu'il me soit permis d'exprimer mes plus vifs remerciements à :

Mr TEMAGOULT Mahmoud, maitre-assistant à l'Université Constantine1 pour avoir accepté de diriger ce travail et avoir bien voulu y consacrer son temps, ses conseils et sa précieuse aide tout au long de la conduite de cette étude.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à la présidente Pr.YKHLEF Nadia et au membre du jury BENABDOUN Faiza Meriem qui me feront l'honneur d'évaluer mon travail.

Toute ma gratitude à ma famille, mes collègues de promotion ainsi qu'à d'autres étudiants.

E'ffet du stress salin sur l'expression de deux facteurs de transcription chez la luzerne annuelle *Medicago truncatula* : cas du NAC969 et du BHLH32

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet et la variabilité de la réponse chez trois génotypes de luzerne annuelle *Medicago truncatula* au stress salin. Les génotypes étudiés sont : génotype sauvage : 108R, mutant bhlh32 (Mutant par insertion TNT1), mutant nac969 (Mutant par insertion TNT1).

Différents paramètres ont été étudiés : Le rendement quantique maximal, Le rendement quantique effectif du Φ PSII et le poids sec des feuilles et racines.

Les résultats obtenus montrent que le stress salin a induit l'expression des facteurs de transcription.

L'étude de l'effet du stress salin sur des mutants correspondant aux gènes étudiés montre que le mutant bhlh32 tolère mieux que le 108R (génotype sauvage) et le mutant nac969.

Mots clefs :

Medicago truncatula, stress salin, facteurs de transcription.

The effect of salt stress on the expression of two transcription factors in the annual alfalfa *Medicago truncatula* : case NAC969 and BHLH32

Abstract :

The objective of this work is to study the effect and variability response in three species of the annual Alfalfa of *Medicago truncatula* salt stress. The genotypes studied are wild genotype: 108R, bhlh32 mutant (Mutant insert Tnt1) nac969 mutant (Mutant insert Tnt1). Various parameters were studied: The maximum quantum efficiency, the effective quantum efficiency of Φ PSII and dry weight of leaves and roots.

The results obtained show that the salt stress induced the expression of transcription factors. The study of the effect of salt stress on mutants corresponding to the genes studied showed that the mutant bhlh32 tolerate better than the 108R (wild genotype) and the mutant nac969.

Keywords:

Medicago truncatula, salt stress, transcription factors.

تأثير الإجهاد الملحي على التعبير عن اثنين من عوامل النسخ في البرسيم السنوي فصّة برميلية: حالة NAC969 وBHLH32

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير وتنوع الاستجابة في ثلاثة مورثات للبرسيم السنوية للإجهاد الملحي. التراكيب المستخدمة في الدراسة هي: النمط الجيني البري: R108، متحول bhlh32 (إدراج متحولة Tnt1)، متحول nac969 (إدراج متحولة Tnt1).

تمت دراسة معايير مختلفة: أقصى كفاءة الكم، وكفاءة الكم الفعالة من Φ PSII والوزن الجاف للأوراق وجذور. أظهرت النتائج المتحصل عليها أن الإجهاد الملحي يسببها التعبير عن عوامل النسخ. أظهرت دراسة تأثير الإجهاد الملحي على المسوخ الموافق الجينات المدروسة أن bhlh32 متحولة تتحمل أفضل من R108 (النمط الجيني البرية) و nac969 متحولة.

كلمات البحث:

فصّة برميلية، الإجهاد الملحي، عوامل النسخ.

Liste des abréviations

°C : degré Celsius.

F₀ : Fluorescence initiale.

F_m : Fluorescence maximal.

F_v/F_m : Rendement quantique maximum.

NAC : No Apical Meristem Protein.

BHLH : Basic Helix-Loop-Helix.

PSII : Photosystème II.

ΦPSII : Rendement quantique effectif du PSII.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

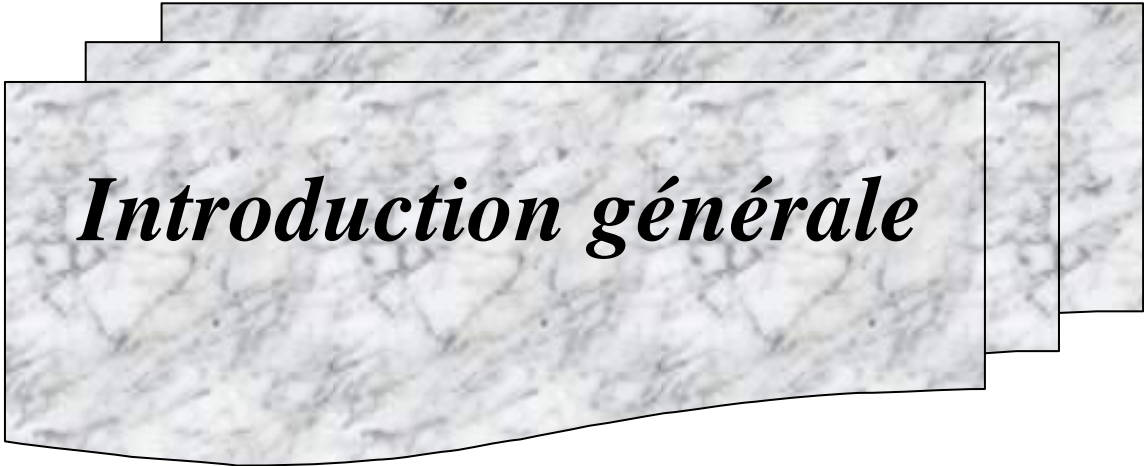
Liste des figures		Pages
Figure 01 :	Développement de la luzerne annuelle <i>M.truncatula</i>	08
Figure 02 :	Relation phylogénétiques entre espèces de légumineuses	09
Figure 03 :	Taxonomie du genre <i>Medicago</i>	09
Figure 04 :	Distribution géographique du genre <i>Medicago</i> dans le monde	11
Figure 05 :	La prégermination des plantes <i>M.truncatula</i>	15
Figure 06 :	Les graines de <i>M.truncatula</i> au stade de germination	16
Figure 07 :	Induction du NAC969/ACTINE suite à l'application d'un traitement en NaCl 180 mM pendant 3 heures	21
Figure 08 :	Induction du BHLH32/ACTINE suite à l'application d'un traitement en NaCl 180 mM pendant 3 heures	21
Figure 09 :	Effet du stress appliqué sur le poids sec foliaire chez les trois génotypes étudiés	23
Figure 10 :	Effet du stress appliqué sur le poids sec racinaire chez les trois génotypes étudiés	23
Figure 11 :	Effet du stress appliqué sur le rendement quantique maximal de la photosynthèse chez les trois génotypes étudiés	24
Figure 12 :	Effet du stress appliqué sur le rendement quantique effectif du PSII chez les trois génotypes étudiés	25

Chapitre I : Revues bibliographiques		Pages
	Introduction	01
I	Le stress salin	02
I.1	Généralités	02
I.1.1	La notion du stress	02
I.1.2	Présentation du stress salin	02
I.1.3	Effets du stress salin sur la plante	02
I.1.4	Réponses des plantes au stress salin	04
II	La régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes	05
II.1	Définition de l'expression des gènes	05
II.2	Les différents modes de régulation de la transcription	05
II.2.1	Niveau de régulation de l'expression	05
II.2.2	La régulation transcriptionnelle	06
II.2.3	La régulation post transcriptionnelle	06
II.2.4	La régulation traductionnelle	06
II.3	La régulation de l'expression des gènes chez les plantes soumises au stress salin	06
III	La plante modèle <i>Medicago truncatula</i>	07
III.1	Généralités	07
III.1.1	Botanique	07
III.1.2	Systematique	08
III.1.3	Distribution géographique du genre <i>Medicago</i>	10
III.1.4	Intérêts et utilisations potentielles	11
III.1.5	Les espèces spontanées rencontrées en Algérie	12
IV	Outils de recherche développés pour la plante modèle <i>Medicago truncatula</i>	12
IV.1	Le <i>Medicago truncatula</i> Gene Expression Atlas (MtGEA)	12
IV.2	La Noble Foundation	13
IV.3	Les banques de mutants	13
IV.4	Les banques EST	13
IV.5	Le Legume Information System	13
Chapitre II : Matériel et méthodes		
I	Matériel végétal	15
II	Méthodes	15
II-1Partie 01	Mesure du taux d'expression des facteurs de transcription BHLH32 et NAC969 en condition de stress salin chez le génotype sauvage <i>Medicago truncatula</i> 108R	15
II-1-1	La prégermination des graines	15
II-1-2	La mise en culture hydroponique	16
II-1-3	L'application du stress	16
II-1-4	L'extraction des ARN totaux	16
II-1-5	Le dosage au des extraits ARN (<i>Nanodrop Thermo 2000</i>)	17
II-1-6	La synthèse des ADNc	17

II-1-7	La PCR en temps réel	18
II-2Partie 02	Analyse de la réponse physiologique au stress salin chez les mutant <i>nac969</i> et <i>bhlh32</i>	19
II-2-1	La prégermination des graines	19
II-2-2	La mise en culture	19
II-2-3	L'application du stress	19
II-2-4	Les paramètres mesurés	19
II-2-4-1	L'estimation de l'état de la nutrition carbonée par mesure de la fluorescence chlorophyllienne	19
II-2-4-2	L'accumulation de la biomasse par mesure du poids sec	20

Chapitre III : Résultats et discussion

Partie 01	Effet du stress appliqué sur l'expression du facteur de transcription <i>NAC969</i>	21
	Effet du stress appliqué sur l'expression du facteur de transcription <i>BHLH32</i>	
Partie 02	Analyse de la réponse physiologique au stress salin chez les mutants <i>nac969</i> et <i>bhlh32</i>	23
III-2-1	Le poids sec de la partie aérienne	23
III-2-2	Le poids sec de la partie racinaire	23
III-2-3	Le rendement quantique maximal de la photosynthèse	24
III-2-4	Le rendement quantique effectif du Φ PSII	25
	Conclusion	
	Références	
	Annexes	



Introduction générale

INTRODUCTION

La salinité des sols représente l'un des principaux stress abiotiques limitant la croissance et le développement des plantes cultivées. Cette salinité peut être naturelle ou induite par les activités agricoles comme l'irrigation (avec de l'eau de faible qualité) ou l'utilisation de certains types d'engrais. Ainsi, chaque année, près de 10 millions d'ha de terres cultivables sont perdus dans le monde du fait de l'accumulation, au cours du temps, de petites quantités de sel contenues dans l'eau d'irrigation.

L'Algérie, qui offre toutes les variantes du climat méditerranéen, n'échappe pas à ce phénomène, où la sécheresse observée depuis longtemps a conduit manifestement au processus de salinisation des sols sur 3,2 millions hectares affectés. Ces deux contraintes naturelles : sécheresse et salinité, ont modifié la stabilité des écosystèmes et sont en grande partie les causes de la désertification des sols.

Les plantes soumises à des conditions défavorables de l'environnement réagissent par des modifications physiologiques et morphologiques contrôlées à la base par des mécanismes moléculaires de modifications de la transcription des gènes.

L'effet d'une concentration élevée en sel au niveau transcriptionnel chez les plantes peut être observé après quelques minutes d'exposition. Les modifications moléculaires qui s'en suivent auront pour but de définir le comportement de la plante à court, à moyen et à long terme.

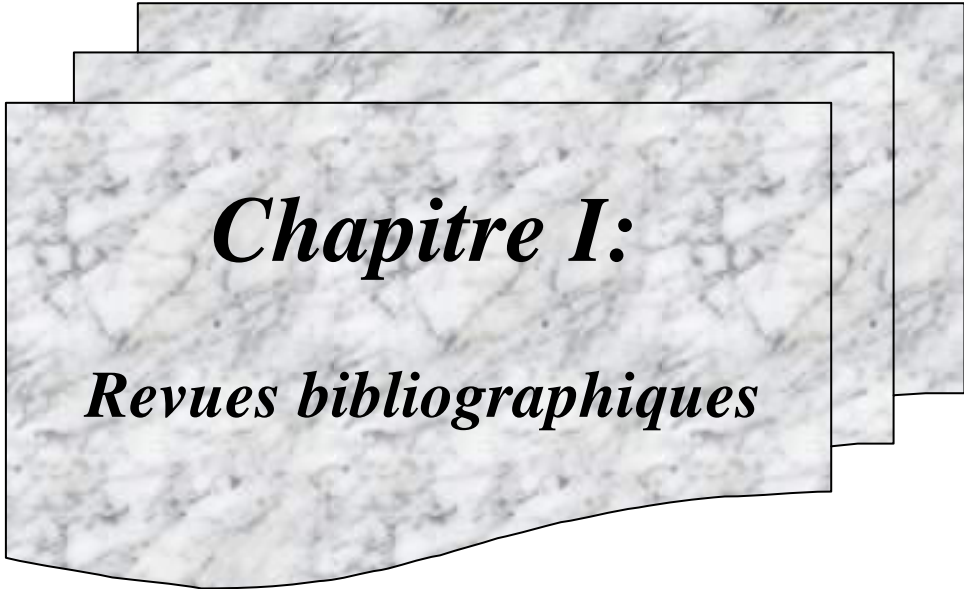
L'une des principales voies de la régulation de la transcription des gènes se fait par l'intervention des facteurs de transcription qui sont des protéines à faible poids moléculaire et qui sont classés en plusieurs familles suivant les motifs qu'ils comportent et la cible sur laquelle ils agissent. Parmi les familles de facteurs de transcription les plus étudiés en cas de stress on trouve la famille des NAC (*No Apical Meristem Protein*) et la famille BHLH (*Basic Helix-Loop-Helix*) qui jouent un rôle dans la régulation de plusieurs processus de plantes.

Objectif du travail :

Le présent travail vise à explorer le rôle de deux facteurs de transcription qui sont le NAC969 et le BHLH32 en condition de stress salin chez la luzerne annuelle *Medicago truncatula* en utilisant deux approches :

Une approche génétique directe : par mesure de l'expression de ces deux gènes en condition de stress salin.

Une approche génétique inversée : en utilisant des génotypes mutants pour ces gènes.



Chapitre I:
Revue bibliographique

I. Le stress salin :

I. 1. Généralités :

I. 1.1. La notion du stress :

Un stress est l'ensemble des perturbations biologiques provoquées par une agression quelconque sur un organisme. Selon Levitt (1980), c'est un facteur de l'environnement induisant une contrainte potentiellement néfaste sur un organisme vivant. Les stress environnementaux sont répartis selon leur origine en deux catégories :

• Stress biotiques :

Ils sont nombreux et ont pour origine les virus, les organismes phytophages et les pathogènes. Afin d'y faire face, la plante met en place un système de défense qui fait intervenir une chaîne de réactions. Les protéines végétales défensives produites font office de rempart contre les agents nuisibles.

• Stress abiotiques :

Parmi les conditions environnementales qui peuvent causer un stress abiotique, on distingue : les inondations, la sécheresse, les basses ou hautes températures, la salinité excessive des sols ou des eaux, la présence d'un minéral inadéquat dans le sol. Cas des métaux lourds, l'excès de lumière qui stimule la photo inhibition, le cas de faible éclairage, les radiations UV, les composés phytotoxiques comme l'ozone qui est un haut réacteur oxydant, la pollution de l'air, les produits oxydés formés à partir des réactions de pesticides.

I. 1. 2. Présentation du stress salin :

Le stress salin est défini comme une concentration excessive en sel. Le terme stress salin s'applique surtout à un excès des ions, en particulier Na^+ et Cl^- .

I. 1. 3. Effets du stress salin sur la plante :

La salinité est une contrainte majeure qui affecte la croissance et le développement des plantes :

a) Effets sur la croissance et le développement :

La plupart des plantes sont plus sensibles à la salinité durant leurs phases de germination et de levée. Parmi les causes de l'inhibition de la germination en présence de sel, la variation de l'équilibre hormonal a été évoquée (Ungar, 1978 et Kabar, 1986 in Bouchoukh, 2010). Bien que les halophytes possèdent une teneur très élevée en sel dans leurs tissus au stade adulte, leurs graines ne sont pas aussi tolérantes au sel au stade germination.

Le stade germination est souvent limité par la salinité du sol et se montre le plus sensible que les autres stades.

La salinité affecterait de plusieurs manières la croissance de la plante :

✓ La concentration élevée de NaCl diminue également l'absorption de Ca^{2+} qui est relativement tolérante au sel, l'augmentation de la concentration en Na^+ s'accompagne d'une réduction de la concentration en Mg^{2+} , K^+ , N, P et Ca^{2+} dans la plante (Levitt, 1980). Ce déséquilibre nutritionnel est une cause possible des réductions de croissance en présence de sel lorsque des ions essentiels comme K^+ , Ca^{2+} ou NO_3^- deviennent limitant (Soltani, 1988 in Haouala et al, 2004).

✓ Les effets osmotiques du stress salin peuvent également limiter la croissance des racines, ce qui limite les possibilités d'absorption des éléments nutritifs du sol.

b) Effets sur la nutrition :

Les effets nutritionnels de la salinité incluent les deux actions primaires du sel sur les plantes : la toxicité directe due à l'accumulation excessive des ions dans les tissus et un déséquilibre nutritionnel provoqué par l'excès de certains ions. Des concentrations salines trop fortes dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale des plantes

L'accumulation des ions Na^+ dans la plante limite l'absorption des cations indispensables tels que K^+ et Ca^{2+} . Il y aurait une compétition entre Na^+ et Ca^{2+} pour les mêmes sites de fixation apoplasmique. L'interaction entre les ions Na^+ et Ca^{2+}

c) Effets sur la biochimie de la plante :

La salinité réduit la vitesse de la photosynthèse suite à une diminution de la conduction stomatique de CO_2 (Santiago et al, 2000). La diminution de la vitesse photosynthétique est due à plusieurs facteurs comme la déshydratation des membranes cellulaires ce qui réduit leur perméabilité au CO_2 , la toxicité du sel, la réduction de l'approvisionnement en CO_2 à cause de la fermeture des stomates. La sénescence accrue induite par la salinité et le changement dans l'activité des enzymes causé par le changement dans la structure cytoplasmique. Chez diverses espèces plus ou moins résistantes, un taux élevé des sucres totaux résultant du blocage de la glycolyse ou du saccharose provenant d'une grande hydrolyse de l'amidon.

I. 1.4. Réponses des plantes au stress salin :

En général, des concentrations élevées de NaCl affectent la physiologie de la plante et le métabolisme à différents niveaux (de déficit d'eau, toxicité d'ions, nutriments déséquilibré, et le stress oxydatif (Vinocur et Altman, 2005), et au moins deux réponses principales peuvent être attendues : une réponse protectrice rapide ensemble avec une réponse d'adaptation à long terme. Cette tolérance au sel est généralement associée à des modifications de traits morphologiques et physiologiques, tels que les changements dans l'architecture de la plante et de croissance (pousses et racines), les variations d'épaisseur des feuilles de la cuticule, la régulation stomatique, la germination, et le taux de la photosynthèse (Edmeades et al, 2001).

Ces modifications sont liées à des modifications diverses cellulaires, y compris les variations de la membrane et la stabilité des protéines, une augmentation de la capacité antioxydante et l'activation des voies de signalisation hormonales, notamment ceux qui dépendent de l'hormone du stress" acide abscissique (Vinocur et Altman, 2005). Un grand nombre de gènes à partir d'une variété de voies biochimiques participer à des réponses conférant une tolérance au sel. Ces voies comprennent notamment ceux qui sont impliqués dans la transduction du signal ; dans le métabolisme du carbone et la production d'énergie ; dans la protection de stress oxydatif ; dans l'absorption, l'exclusion, le transport et la compartimentation des ions sodium ; et des modifications des éléments de structure de parois et membranes cellulaires.

En outre, comme la régulation du métabolisme pour optimiser la croissance dans l'environnement changeant est un trait essentiel, des études ont été réalisées pour identifier des métabolites dont l'accumulation peut augmenter la tolérance des plantes légumineuses à la salinité. Par exemple, des changements de lipides en réponse à un traitement de sel ont été caractérisés dans les membranes soja profondes (Surjus et Durand, 1996) ainsi que l'effet du stress de sel d'acide aminé, un acide organique, et la composition en hydrates de carbone des racines, des bactéroïdes, et cytosol de luzerne (*Medicago sativa*; Fougère et al, 1991). En réponse au stress salin, le tréhalose a également été proposé comme un osmoprotectant dans *Lotus japonicus* (Lopez et al, 2006) alors qu'une augmentation de la proline et le contenu de la glycine bêtaïne, ainsi que dans la protéase et les activités ATPase a été décrite dans l'arachide. (Trinchant et al, 2004) ont étudié les réponses à long terme de plantes de luzerne nodulées au stress salin, avec un intérêt particulier pour la proline et l'accumulation de bêtaïne, cloisonnement, et le métabolisme. Trigonelline, une

bétaïne de la pyridine, qui fonctionne également comme un régulateur du cycle cellulaire, accumule dans des feuilles de sel de soja souligné et la luzerne (Tramontano et Jouve, 1997). Cependant, peu d'études métaboliques ont été exécutées dans *Medicago truncatula*. L'accumulation de proline a été montrée pour induire une tolérance à un stress de sel, et *Medicago truncatula* des plantes transgéniques sur-exprimant la delta (1) -pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS), et qui accumule donc des niveaux élevés de proline, affiche une amélioration de l'osmotolérance (Armengaud et al, 2004; Verdoy et al, 2006).

II. La régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes :

II. 1. Définition :

Dans les organismes multicellulaires l'expression de gènes différents est à l'origine d'une spécialisation cellulaire.

L'expression des gènes eucaryotes est régulée au niveau chromatinien, au niveau transcriptionnel, au niveau post-transcriptionnel, au niveau traductionnel et au niveau post-traductionnel.

II. 2. Les différents modes de régulation de la transcription :

Il existe de différents modes de transcription, qui sont englobés en 4 niveaux on peut citer :

II. 2.1. Niveau de régulation de l'expression :

a/ Domaines de la chromatine :

- hétérochromatine : état condensé, transcriptionnellement inactive, constitutive ou facultative.
- euchromatine : transcriptionnellement active, sensible à la DNase, organisée en boucles de 40-100 kpb fixées à la matrice nucléaire (MAR: matrix associated regions).
- domaines fonctionnels, séquences isolatrices et régions de contrôle.

b/ Modifications des histones :

- Les modifications des histones déterminent la structure de la chromatine :
- Acétylation: histones acétyl-transférases (HAT), désacétylase (HDAC) , méthylation et phosphorylation....
- « code histone »

c/ Structure de l'ADN.

d/ Méthylation de l'ADN.

II. 2.2. La régulation transcriptionnelle :

a/ Séquence cis régulatrices :

- Promoteur.
- Séquences activatrices ou modératrices.
- Insulateur.

b/ Séquence trans régulatrices.

II. 2.3. La régulation post transcriptionnelle :

- Epissage alternatif.
- Modification éditoriale de l'ARNm.
- Modification du site de coupure-polyadénylation.
- Modification de la stabilité des ARNm.

II. 2.4. La régulation traductionnelle :

- Inhibition de la lecture de l'ARN par RE en 5'.
- Inhibition des facteurs de traduction (initiation, élongation, terminaison).
- Régulation par les micros ARN.

II. 3. La régulation de l'expression des gènes chez les plantes soumises au stress salin :

Des études moléculaires ont été utilisées pour identifier les gènes candidats à être des régulateurs d'osmotolérants et de la salinité, des gènes régulateurs putatifs particuliers tels que les facteurs de transcription (Hasegawa et al, 2000). Dans la luzerne, MsAlfin1 a été identifié comme un sel de transcription inductible qui code pour une protéine principalement exprimée dans les racines (Winicov, 1993). La surexpression de ce facteur de transcription putatif améliore la croissance des racines dans des conditions salines et de contrôle (Winicov et Bastola, 1999; Winicov, 2000).

Le manque de formation des racines et de la croissance des racines des lignes de luzernes transgéniques exprimant MsAlfin1 dans une orientation anti sens soutient également un rôle crucial pour ce gène dans le développement de la racine (Winicov, 1999). Le facteur de transcription C2H2 (ZPT2-1) a été identifié chez la luzerne et caractérisé en ce *Medicago truncatula* (Frugier et al, 1998, Frugier et al, 2000). Ce gène, exprimé dans les tissus vasculaires des racines et des nodules est également induit par le stress salin (Merchan et al, 2003) et *Medicago truncatula* lignées transgéniques anti sens des nodules

incapables de fixer l'azote développés suite à un blocage de la différenciation bactéroïde (Frugier et al, 2000).

Ces lignes anti sens MtZpt2-1 étaient également moins en mesure de se remettre d'un stress salin par rapport à une plante de type sauvage (Merchan et al., 2003), ce qui suggère que ce facteur de transcription peut être impliqué dans les réponses de nodules et d'adaptation de la racine à l'osmose, au sel et aux autres contraintes.

En outre, en utilisant soit les plantes possédant MtZpt2-1 anti sens ou la surexpression de ce facteur de transcription, trois gènes cibles putatifs peuvent être identifiés, dont l'un correspond à un marqueur connu lié au stress abiotique (le froid). Ces résultats suggèrent en outre un rôle pour un TFIIIA comme facteurs de transcription et leurs réseaux de cibles réglementés dans l'adaptation des racines des légumineuses au stress salin.

Quelques analyses génomiques ont été effectuées pour examiner les réponses au stress salin dans les légumineuses. Une de ces études visant à identifier les gènes impliqués dans la régulation des adaptations profondes lors de la récupération de *Medicago truncatula* face au stress salin. Deux bibliothèques SSH ont été faites et analysées afin de construire un microarray dédié, qui a permis à des études d'expression raffinées dans les plantes soumises au stress salin et autorisées à reprendre la croissance. Gènes régulateurs nouveaux associés à la récupération de la racine du stress salin où identifiée, affectant potentiellement différents mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle.

III .La plante modèle *Medicago truncatula* :

III. 1. Généralités

III. 1.1. Botanique

La luzerne est une dicotylédone. A la levée vont d'abord émerger deux cotylédons. La première feuille est unifoliée (Teuber et Brick, 1988), les feuilles suivantes sont composées de trois folioles rattachées à la tige par un pétiole. Elles sont dites trifoliolées. Au cours de son développement la première tige grandit en produisant des feuilles alternées (figure 01).

Le bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée se développe ensuite pour donner une tige secondaire (Foord, 1985).

Deux autres tiges secondaires démarrent à sa suite depuis le niveau des cotylédons. Les luzernes de type non dormant produisent plus de tiges secondaires à partir du niveau des cotylédons que les types dormants dont la croissance est stoppée en hiver.

C'est cet ensemble de tiges qui va former le collet (Simonds 1935). Les jeunes plantes qui ne sont pas récoltées produisent également des tiges secondaires depuis les bourgeons axillaires des premières feuilles trifoliées (Mauries M., 1994).

La luzerne développe dans le même temps une racine pivotante principale et des racines secondaires plus ou moins ramifiées. Les types résistants au froid ont des systèmes racinaires plus fasciculés en raison de leur origine falcata.

Le développement des tiges suit un ordre précis ; des tiges primaires, secondaires et tertiaires. Les feuilles sont en général de types trifoliés mais il existe des variétés dites multi foliées à 4, 5, 6 ou 7 folioles portées par un pétiole (Teuber et Brick, 1988).

Les fleurs apparaissent entre le 6^{ème} et le 14^{ème} entre-neoud en fonction des conditions du milieu et de leur déterminisme génétique (Mauries M, 1994).

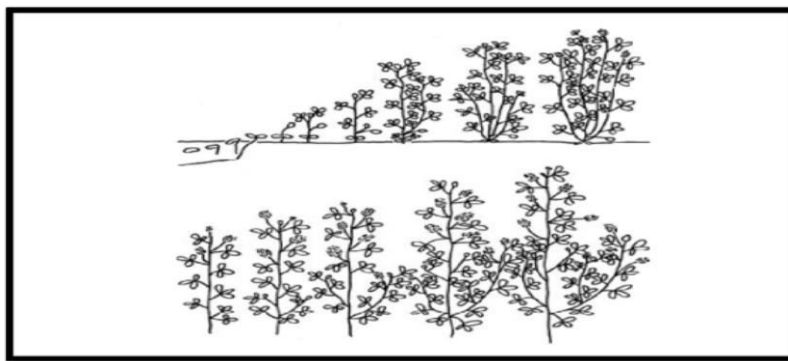


Figure 01 : Développement de luzerne annuelle *M.truncatula*

III.1. 2. Systématique :

Le genre *Medicago* appartient à l'ordre des Fabales, superfamille des Légumineuses, famille des Fabaceae et sous-famille des Faboideae. Le genre *Medicago* est placé dans la tribu des Trifolieae qui comprend la majorité des Légumineuses fourragères tempérées comme la luzerne cultivée et le trèfle, et qui est phylogénétiquement proche de la tribu des Vicia incluant les Légumineuses à graines comme (Figure 02).

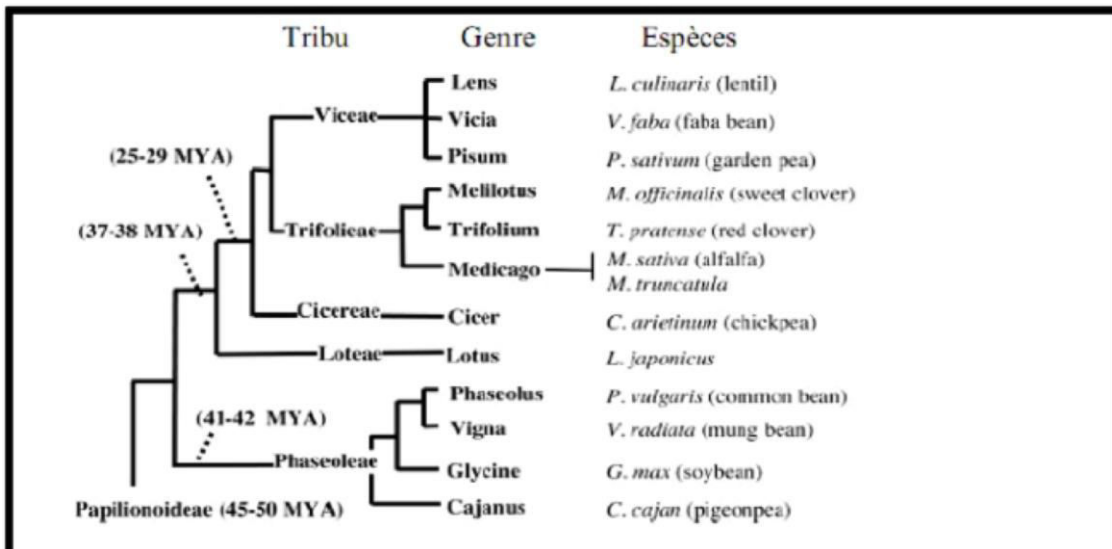


Figure 02 : Relation phylogénétiques entre espèces de légumineuses (Choi et al,2004)

Le genre *Medicago* est particulièrement proche des genres *Melilotus* et *Trigonella* et a été classé en quatre sous-genres sur la base de la morphologie des gousses. Ces sous-genres comprennent au total 55 espèces dont 21 sont pérennes, 33 sont annuelles et une est de pérennité non définie. Le sous-genre *Spirocarpos*.

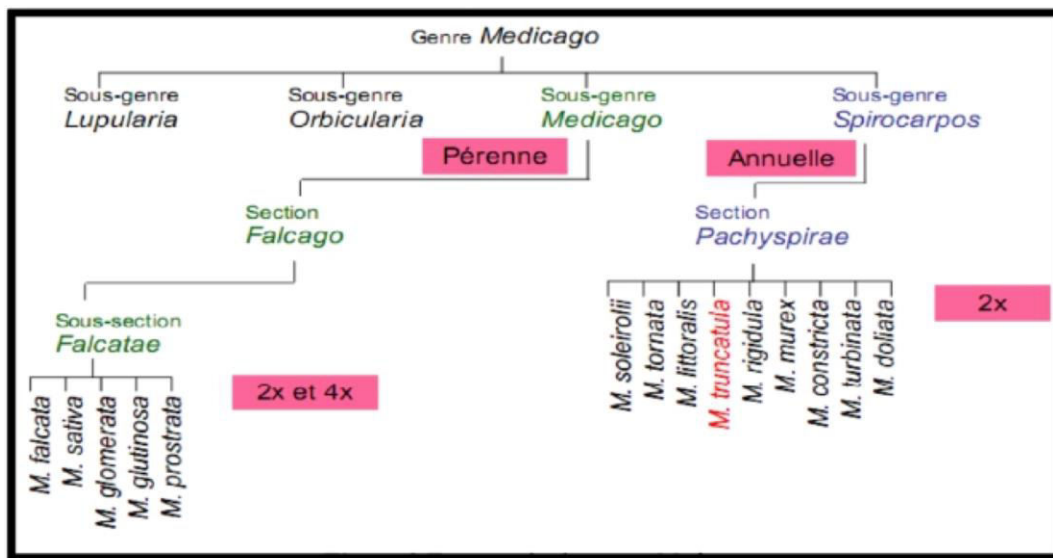


Figure 03 : Taxonomie du genre *Medicago*

<u>Règne :</u>	
<u>Embranchement :</u>	Spermatophytes
<u>Sous- embranchement :</u>	Angiospermes
<u>Classe :</u>	Dicotylédones
<u>Ordre :</u>	Fabales
<u>Famille :</u>	Fabaceae
<u>Sous-famille :</u>	<i>Faboideae</i>
<u>Tribus :</u>	<i>Trifolieae</i>
<u>Genre :</u>	(L.)

Position systématique : (Small et Jomphe , 1989)

III. 1.3. Distribution géographique du genre *Medicago* :

L'origine des espèces du genre *Medicago* ne fait pas l'unanimité selon les auteurs.

En effet, pour (Lapeyronie 1982), elles sont distribuées dans le bassin méditerranéen (le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le proche Orient), certaines ont été introduites en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord. D'après Derek et Ernest, 1997, elles sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique et se sont répandues dans d'autres continents sous forme de mauvaises herbes (Halmi, 2010).

XIX siècle, les luzernes (les espèces du genre *Medicago*) ont conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne, ensuite elles ont envahi d'autres parties du monde, en particulier les continents américain et australien à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine (Halmi, 2010).

Les luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides (Halmi, 2010).

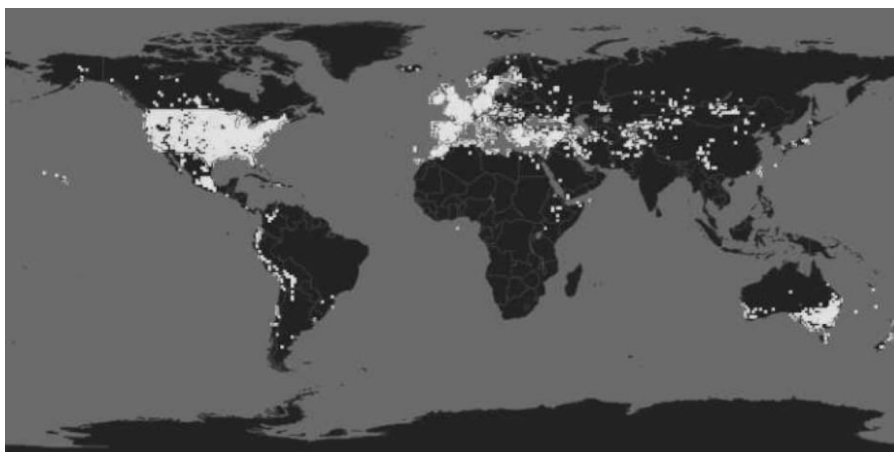


Figure 04 : Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde

Source : Prolea, 2002.

III. 1.4. Intérêts et utilisations potentielles

L'une des principales propriétés des espèces de luzernes annuelles est leur capacité à se ressemer naturellement d'une année à l'autre, en préservant un stock de semences dans le sol, grâce à un taux de graines dures important. Cette qualité permet d'obtenir une installation pérenne et spécialement adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes.

C'est en Australie que l'utilisation de ces espèces a pris son essor. Elles sont actuellement utilisées sur plus de 15 millions d'hectares. Ce système reste néanmoins réservé à des zones de production extensive (Prosperi, 1993).

Ainsi, ces luzernes annuelles ou pérennes peuvent trouver leur place dans différents contextes. Certaines de ces espèces, parmi les plus productives telles que *Medicago scutellata*, peuvent se révéler performantes dans ces conditions.

Elles peuvent, contrairement aux pois et vesces, être coupées ou pâturées plusieurs fois sans altérer ou diminuer fortement leur potentiel de production (Prosperi ; 1993).

Un autre intérêt de ces légumineuses se trouve dans leur utilisation pour l'enherbement des jachères, de vergers et de vignobles afin de limiter l'érosion des sols, le développement d'adventices et l'utilisation des herbicides. En plus, elles permettent une meilleure gestion de l'eau et de l'azote.

Un intérêt scientifique de *Medicago truncatula* présente des caractéristiques permettant et facilitant les analyses génétique et moléculaire (autogamie, faible niveau de ploïdie, génome de petite taille, aptitude à la culture en laboratoire, à l'embryogénèse somatique et à la transgénèse).

Par ailleurs, le temps de génération de graine à graine est relativement court (10 à 12 semaines en conditions contrôlées) et la production importante, ce qui assure une disponibilité rapide du matériel (Brunel ; 2010).

III.1. 5. Les espèces spontanées rencontrées en Algérie

Le genre *Medicago* en Algérie est représenté par de nombreuses espèces spontanées dont les plus importantes sont décrites par QUEZEL et SANTA

IV. Outils de recherche développés pour la plante modèle *M.truncatula* :

IV. 1. Le *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas (MtGEA) :

L'Atlas (MtGEA) serveur web *Medicago truncatula* Gene Expression est une plate-forme centralisée pour l'analyse du transcriptome de *Medicago*. Actuellement, les données d'expression génique des hôtes de serveur web à partir de 156 Affymetrix GeneChip *Medicago* matrices génomiques dans 64 expériences différentes, couvrant un large éventail de conditions de développement et de l'environnement. Le serveur permet flexibles, des analyses multiples de données de transcription et fournit une série d'informations supplémentaires sur les gènes, y compris les différents types d'annotations et des liens vers la séquence du génome, qui aident les utilisateurs à formuler des hypothèses sur la fonction des gènes. Les données de transcription peuvent être accessibles en utilisant la sonde Affymetrix numéro d'identification, la séquence d'ADN, nom du gène, description fonctionnelle en langage naturel, GO et KEGG termes d'annotation et InterPro numéro de domaine. Transcriptions peuvent également être découverts grâce à la co-expression ou de l'analyse de l'expression différentielle. Outils flexibles pour sélectionner un sous-ensemble d'expériences et de visualiser et de comparer les profils d'expression des gènes multiples ont été mises en œuvre. Les données peuvent être téléchargées, en partie ou en totalité, sous une forme tabulaire compatible avec les logiciels d'analyse et de visualisation commune. Le serveur Web sera mis à jour sur une base régulière pour incorporer de nouvelles données d'expression génique et l'annotation du génome

IV. 2. La Noble Foundation :

La noble Foundation a été créée en Ardmore, Oklahoma, États-Unis en 1945. Aujourd'hui, son activité est menée par trois divisions :

La division Exploitation Agricole, La division Biologie et la division Amélioration du fourrage. Elle est reconnue internationalement pour ses contributions à la communauté scientifique et en particulier ses efforts pour faire progresser *Medicago truncatula* comme modèle génomique pour l'étude des légumineuses.

Le site web de la fondation met en accès libre à la disponibilité des chercheurs une importante source de documentation bibliographique, le *Medicago truncatula* handbook, qui est une synthèse sur les différents aspects de la recherche sur *Medicago truncatula*, sa biologie et les protocoles des techniques couramment utilisées.

IV. 3. Les banques de mutants :

De larges programmes de mutagenèse ont été développés par l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique) et le CNRS (Centre National de Recherche scientifique) qui utilisent principalement trois techniques : l'irradiation Gamma, la mutagenèse insertionnelle utilisant l'ADN-T et le transposon Tnt-1 du Tabac et la mutagenèse par le Tilling. Tous ces programmes ont porté sur la souche australienne Jemalong A17 et mettent à la disposition de la communauté scientifique 200 lignées mutantes par le transposon Tnt-1, 50 par irradiation Gamma, 1500 par ADN-T et environ 10000 lignées obtenus par tilling.

IV. 4. Les banques EST :

Le développement rapide du modèle *Medicago truncatula* s'est accompagné par une très grande quantité d'EST (Expressed Sequence Tags) déposées en trois ans dans les bases de données publiques. Les deux premiers lots d'EST ont été produits à partir d'une banque d'ADNc issus de pointes racinaires enrichies en poils absorbants. et d'une banque issues de jeunes nodosités (Gyogyey et al, 2000).

Depuis 1999, la Noble Foundation a généré un total de 129696 clones d'EST de 14 bibliothèques distinctes de *M.truncatula*, ce qui représente plus de 50% du total des ESTs de la communauté de recherche *Medicago*.

IV. 5. Legume Information System (LIS) :

Le LIS (Legume Information System) a été développé par le centre national de ressources génomique végétales localisé sur le centre INRA de Toulouse, France, en collaboration avec le service de recherche agricole de l'USDA (ARS) au États-Unis. C'est une ressource

qui intègre des données de génomique et de transcriptomique comparative de plusieurs espèces de légumineuses. L'interface virtuelle permet une navigation simplifiée et intuitive des données.



Chapitre II:
Matériel et méthodes

I - Matériel végétal :

Le matériel végétal sur lequel nous avons travaillé est constitué de trois génotypes de luzerne annuelle *Medicago truncatula* :

Génotype sauvage : 108R.

Mutant bhlh32 (Mutant par insertion TNT1).

Mutant nac969 (Mutant par insertion TNT1).

Les trois génotypes ont été fournis par l'*Institut des Sciences du Végétal* – CNRS Gif sur Yvette.

II – Méthodes :

Les expérimentations réalisées dans le cadre de notre travail ont porté sur deux facteurs de transcription dont l'implication dans la réponse de la plante modèle *Medicago truncatula* au stress salin a été reportée dans des travaux d'analyse globale de transcriptome par des puces *Affymetrix* ([http : mtgea.org](http://mtgea.org)).

II-1 Partie 01 : Mesure du taux d'expression des facteurs de transcription BHLH32 et NAC969 en condition de stress salin chez le génotype sauvage *Medicago truncatula*108R :

II-1-1 Prégermination des graines :



Figure 05 : La prégermination des plantes *M.truncatula*

- Scarification des graines :

Les graines ont été scarifiées manuellement en provoquant une blessure au niveau du tégument à l'aide d'un scalpel.

- Stérilisation :

Les graines ainsi scarifiées ont été stérilisées par immersion dans une solution d'eau de Javel diluée au 1/3 pendant 20 min.

- Lavage :

Après stérilisation, les graines ont été lavées six fois à l'eau distillée stérile.

Après, les graines ont été mises à gonfler pendant 2 heures dans de l'eau distillée stérile et sous agitation.

- Mise en germination :

Les graines ont été transférées après gonflement dans des boîtes de Petri sur substrat gélosé (1.5 % agar) et mises pendant 48 heures à 4°C, puis à 24°C pendant 24h et à l'obscurité.

II-1-2 Mise en culture hydroponique :

Les graines ainsi germées ont été transférées en culture hydroponique sur solution nutritive commerciale dans des boîtes Petri pendant 4 jours. (Voir figure 06)



Figure 06 : Les graines de *Medicago truncatula* au stade de germination

II-1-3 L'application du stress :

Après quatre jours de culture hydroponique, les plantules ont été réparties en deux lots :

Un lot témoins : constitué de plantules n'ayant subi aucun traitement en sel.

Un lot stressé : constitué de plantules dont la solution nutritive a été additionnée de NaCl à une concentration finale de 180 mM.

La durée du traitement appliqué est de 3 heures.

II-1-4 L'extraction des ARN totaux :

Après application du stress, les racines des différents lots de plantes ont été lavées à l'eau distillée et ont fait l'objet d'une extraction d'ARN au trizol selon la méthode de Chomczynski et Mackey (1995)

- Broyage de 100mg environs de racines dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier et un pilon.
- Transfert de la poudre végétale dans un tube Eppendorf contenant 1ml de trisol
- Ajouter 200 µl chloroforme (1/5 du volume de Trizol).
- Vortexer pendant 15 sec.
- Incuber 5 min à température ambiante.
- Centrifuger à 12.000 g pendant 15 min.
- Transferer le surnageant dans un nouveau tube.
- Ajouter 500 µl d'isopropanol.
- Centrifuger à froid pendant 10 min à vitesse maximale.
- Jeter le surnageant.
- Laver le culot avec 500 µl d'éthanol à 70 %.
- Centrifuger à froid pendant 2 min et à vitesse maximale.
- Secher le culot pendant 10 min.
- Dissoudre le culot dans 50-100 µl de DEPC-H₂O.
- Incuber à 60° C pendant 10 min pour faciliter la dissolution des ARN.
 - **Application de la DNase :**
 - Dissoudre le culot dans 20µl : 2µl Tp 10x + 2µl DNase + 1µl Ribolock + 15µl H₂O
 - Incuber à 37°C pendant 1h
 - Incuber à 70°C pendant 10 min pour dégrader la DNase.
 - **Purification sur colonne RNA Mini-Preps Kit (BIO BASIC CANADA.INC):**
 - On prend 04 colonnes, puis on verse 100µl d'Ethanol
 - On fait une centrifugation à 30 secondes.
 - On ajoute 500µl de la solution GT.
 - Centri pendant 30 sec.
 - On ajoute 500µl de la solution NT.
 - Une centri à 30 secondes, puis on fait une centri à vide.
 - Ajouter 30µl de H₂O ultra pure stérile.
 - Incuber à 60°C pendant 2 min.

II-1-5 Le dosage au des extraits ARN (Nanodrop Thermo 2000)

La quantification des extraits ARN obtenus a été réalisé sur 2µl de la solution par un spectrophotomètre de type Nanodrop Thermo 2000.

II-1-6 La synthèse des ADNc :

La synthèse des ADNc a été réalisé sur 1.5 µg d'ARN matrice selon les étapes suivantes :

- Mesurer la quantité de solution ARN nécessaire pour avoir 1.5 µl et compléter à 15 µl avec de l'eau ultra pure stérile.
- Chauffer les ARN à 70°C pendant 3 min afin de dénaturer les structures secondaires.
- Pour chaque 15 µl d'ARN matrice ajouter 15 µl de Mix 2X :
 - Tampon RT 5X: 6 µl
 - dNTP 10 mM : 6 µl
 - Oligo dT : 0.6 µl
 - RNase Inhibitor : 0.5 µl
 - Reverse transcriptase : 1 µl
 - H₂O : 0.9 µl
- Incuber les tubes au bain-Marie à 42°C pendant 1h
- Transférer les tubes à 70° C pendant 10 min.
- Ajouter 60 µl d'H₂O ultra pure stérile.
- Conserver à 4°C

II-1-7 La PCR en temps réel :

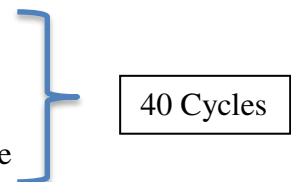
Afin de mesurer le taux d'expression des différents gènes testés, nous avons utilisé un thermocycleur de type *Eurobio QTower 2.0*. La quantification se fait par la mesure de la fluorescence émise par un agent intercalant de l'ADN : le *Cybergreen* à 470 nm.

Pour chaque échantillon, la réaction de PCR en temps réel a été réalisée dans volume final de 10 µl composé de :

- Master Mix 2X : 5 µl
- Amorce F : 2 µl
- Amorce R : 2 µl
- ADNc matrice : 1 µl

Programme d'amplification utilisé

- Préchauffage à 94 pendant 5 min.
- Dénaturation à 94°C pendant 15s.
- Hybridation des amorces à 60°C pendant 15s.
- Elongation à 72°C pendant 15s. => Mesure de la fluorescence



Mesure de la température de fusion de 60 à 94°C.

La quantification relative des niveaux d'expression des facteurs de transcription étudiés (NAC969 et BHLH32) a été réalisée par mesure des différences de Ct (*Threshol Cycle*) par rapport au gène de l'actine (gène de ménage).

II-2 Partie 02 : Analyse de la réponse physiologique au stress salin chez les mutant *nac969* et *bhlh32*.

II-2-1 La prégermination des graines :

- Scarification des graines :

Les graines ont été scarifiées manuellement en provoquant une blessure au niveau du tégument à l'aide d'un scalpel.

- Stérilisation :

Les graines ainsi scarifiées ont été stérilisées par immersion dans une solution d'eau de Javel diluée au 1/3 pendant 20 min.

- Lavage :

Après stérilisation, les graines ont été lavées six fois à l'eau distillée stérile.

Après, les graines ont été mises à gonfler pendant 2 heures dans de l'eau distillée stérile et sous agitation.

II-2-2 La mise en culture :

Les graines germées des trois génotypes étudiées ont été mises en culture dans des pots contenant un mélange sable : perlite $\frac{1}{4}$: $\frac{3}{4}$ et irriguées avec une solution nutritive commerciale (voir annexe).

II-2-3 L'application du stress :

Après 21 jours de développement, les plantes des trois génotypes étudiés ont été réparties en deux lots :

Un lot témoins : constitué de plantules n'ayant subi aucun traitement en sel.

Un lot stressé : constitué de plantules dont la solution nutritive a été additionnée de NaCl à une concentration finale de 180 mM.

La durée du traitement appliqué est de 10 jours.

II-2-4 Les paramètres mesurés :

II-2-4.1 L'estimation de l'état de la nutrition carbonée par mesure de la fluorescence chlorophyllienne :

La fluorescence chlorophyllienne a été mesurée à l'aide d'un fluo mètre portatif modèle FMS, Les mesures sont effectuées sur les feuilles attachées. Les données sont stockées dans l'appareil de mesure et ensuite transférées vers un ordinateur pour leur traitement. la lecture s'effectue de manière à placer la feuille à l'obscurité, des clips sont positionnés au moins 20 mn avant la mesure. Il s'agit de pinces, dont la partie se trouvant en contact avec

la face supérieure de la feuille comporte une fenêtre de lecture pouvant être obstruée au moyen d'une plaque métallique coulissante, la plaque métallique est tirée et la mesure peut être exécutée. Cet appareil consigne automatiquement les paramètres suivants :

- Fluorescence initiale (F0) : c'est la valeur minimale de la fluorescence lorsque tous les accepteurs d'électrons du photosystème II (PSII) sont complètement oxydés. La Fluorescence initiale F0 a pour origine les chlorophylles qui forment les antennes collectrices du PSII.
- Fluorescence maximale (Fm) : elle correspond à la valeur maximale de la fluorescence obtenue pour la même intensité lumineuse. Cette valeur est obtenue lorsque toutes les premières quinones accepteurs d'électrons sont complètement réduites ;
- Rendement quantique maximum : il est exprimé par le rapport $(Fm-F0)/Fm = Fv/Fm$, dans lequel Fv est la fluorescence variable (Denden et al; 2005).
- le rendement quantique effectif des PSII : $\Phi_{PSII} = (Fm' - Fs)/Fm'$ la capacité d'utilisation de l'énergie lumineuse pour le transport non cyclique des électrons.

II-2-4.2 L'accumulation de la biomasse par mesure du poids sec :

Après mesure de la fluorescence chlorophyllienne, les parties aériennes et racinaires de chaque plante ont été mises à sécher dans l'étuve à 60°C pendant 48h puis pesées afin de déterminer le poids sec de chacune de ces parties.



Chapitre III:
Résultats et discussions

CHAPITRE III : Résultats et discussion

Partie 01 :

Expression relative des facteurs de transcription NAC969 et BHLH32 :

Effet du stress appliqué sur l'expression du facteur de transcription NAC969 :

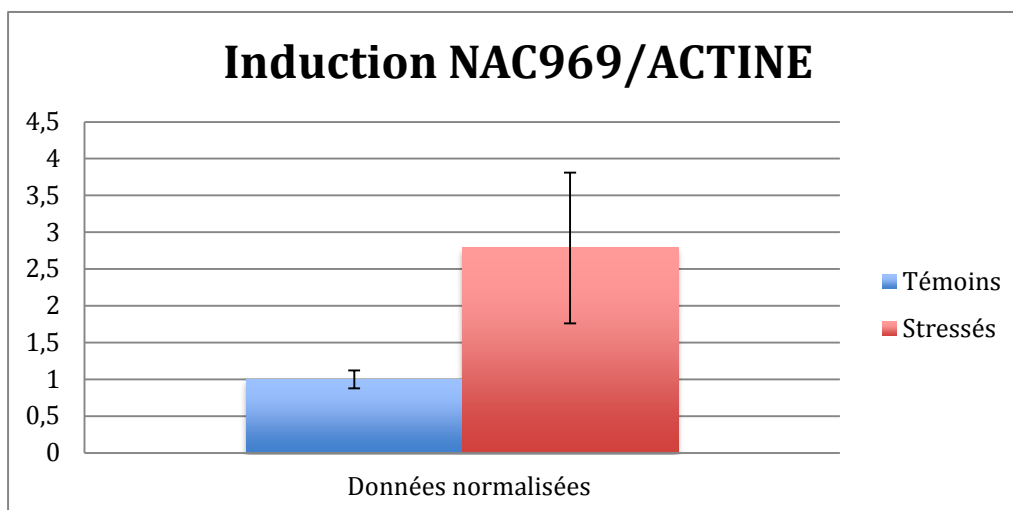


Figure 07 : Induction du NAC969/ACTINE suite à l'application d'un traitement en NaCl 180 mM pendant 3 heures.

La mesure de l'expression relative du gène NAC969 par rapport au gène de l'ACTINE par PCR en temps réel montre que le stress salin appliqué (3h 180 mM NaCl) provoque une augmentation du nombre de transcrits par rapport aux échantillons témoins.

La normalisation des résultats obtenus montre que cette augmentation équivaut à 2,8 le taux d'induction de base de ce gène (voir figure 07).

Effet du stress appliqué sur l'expression du facteur de transcription BHLH32 :

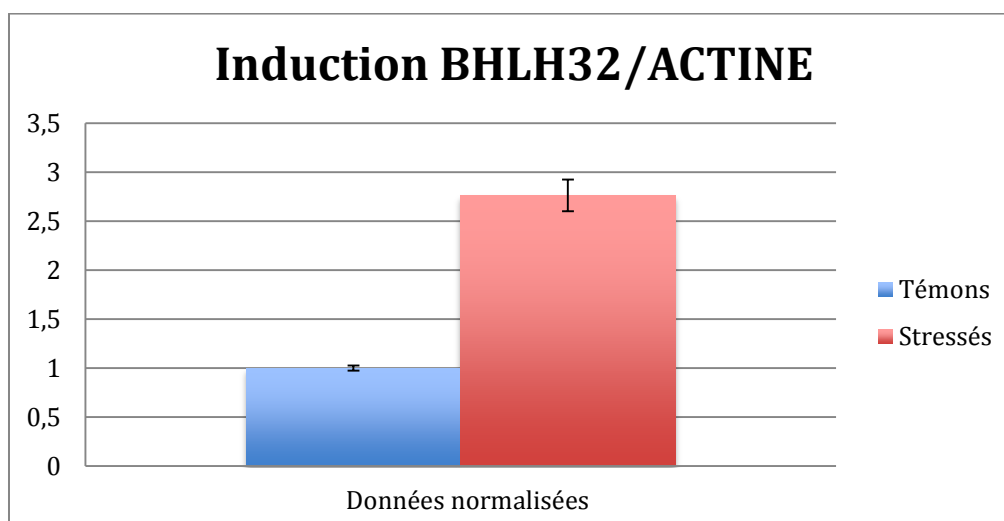


Figure 08 : Induction du BHLH32/ACTINE suite à l'application d'un traitement en NaCl 180 mM pendant 3 heures

La mesure de l'expression relative du gène BHLH32 par rapport au gène de l'ACTINE par PCR en temps réel révèle que le stress salin appliqué durant 3 heures de temps pour 180mM NaCl provoque une augmentation du nombre de transcrits par rapport aux échantillons de départ (témoins).

La normalisation des valeurs obtenues montre que cette augmentation égale à 2,8 le taux d'induction de base de ce gène (voir figure 08).

La PCR en temps réel est une technique de mesure basée sur l'amplification de séquences nucléotidiques par l'utilisation d'amorces spécifiques. La lecture des résultats est basée sur l'observation de cycles correspondants à la détection des signaux de fluorescences émis par la séquence cible en cours d'amplification. La comparaison de la valeur du cycle correspondant à la première détection du signal d'amplification de la séquence cible avec celle d'un gène connu pour son insensibilité transcriptionnelle aux facteurs extérieurs, qu'on appelle gène de ménage (housekeeping gene), permet d'évaluer de façon relative le taux d'expression du gène étudié.

Les valeurs des Ct enregistrées montre que la concentration en NaCl appliquée sur les plantes (3h 180 mM) a causé une augmentation du nombre de transcrits des deux gènes étudiés. Cette augmentation renseigne sur une induction des gènes NAC969 et BHLH32 suite à l'exposition des plantes au stress salin.

Les plantes soumises à des conditions défavorables de l'environnement développent des réponses moléculaires en modifiant le taux d'expression de certains gènes afin de pouvoir mettre en place les mécanismes nécessaires à la tolérance. Ainsi, certains gènes sont induits, d'autres sont surexprimés, alors que certains d'autres sont réprimés.

L'induction observée chez les facteurs de transcription étudiés (NAC969 et BHLH32) montre que ces deux gènes jouent un rôle essentiel dans l'élaboration de la réponse de la plante *Medicago truncatula* face au stress salin. Ce rôle essentiel est aussi bien visible si on considère les faits que cette augmentation de la transcription a été observée après quelques heures de l'application du stress (3 heures). Les résultats obtenus confirment ceux déjà obtenus sur des puces d'analyse globale de transcriptome (puce Affymetrix).

Partie 02 :**Réponses physiologiques chez *Medicago truncatula* en cas de stress salin suite à la suppression des deux facteurs de transcription NAC969 et BHLH32 :**

Effet du stress salin appliqué sur l'accumulation de la biomasse chez les différents génotypes utilisés :

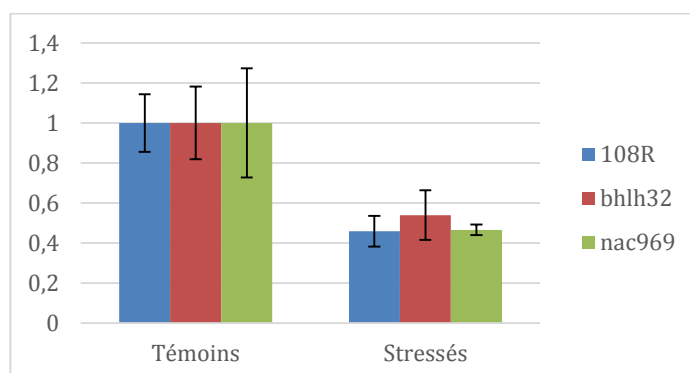
2-1 Le poids sec de la partie aérienne :

Figure 09 : Effet du stress appliqué sur le poids sec foliaire chez les trois génotypes étudiés

Les résultats obtenus montrent que le traitement appliqué a causé une diminution du poids de la partie aérienne chez tous les génotypes étudiés.

La plus importante diminution de poids sec a été observée chez le génotype R108 et qui est de 55% par rapport aux témoins alors que chez le génotype bhlh32 on a observé la perte la plus faible et qui est de 47%. Le génotype nac969 quant à lui, présente une diminution de 54%.

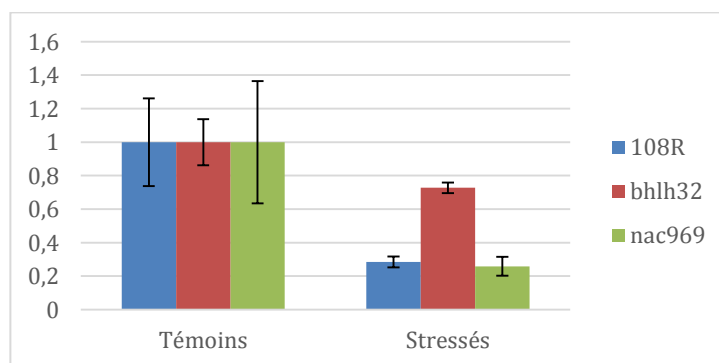
2 -2 Le poids sec de la partie racinaire :

Figure10 : Effet du stress appliqué sur le poids sec racinaire chez les trois génotypes étudiés

La plus importante diminution de poids sec a été observée chez le génotype *nac969* et qui est de 75% par rapport aux témoins alors que chez le génotype *bhlh32* on a observé la perte la plus faible et qui est de 28%. Par ailleurs le génotype 108R présente une diminution de 72%.

Effet du stress salin appliqué sur la nutrition carbonée chez les différents génotypes utilisés :

2 – 3 Le rendement quantique maximal :

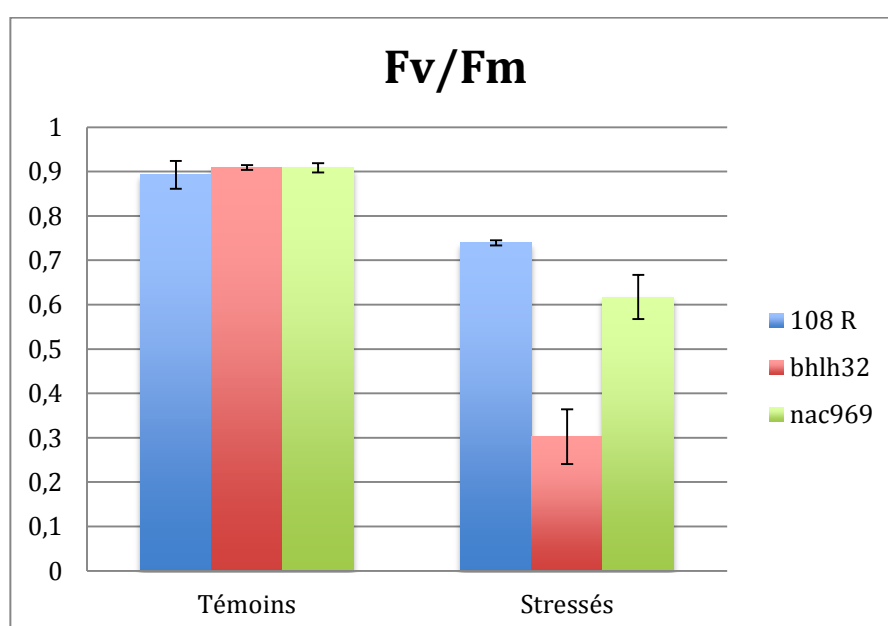


Figure11 : Effet du stress appliqué sur le rendement quantique maximal de la photosynthèse chez les trois génotypes étudiés

En condition non stressée, les valeurs enregistrées pour ce paramètre se situent entre 0.89 et 0.9 chez tous les génotypes étudiés.

Après application du stress, on observe une diminution du rendement quantique maximal chez tous les génotypes. La plus grande diminution a été observée chez le génotype *bhlh32* qui a enregistré une valeur de 0.3 alors que le génotype 108R présente la plus faible diminution notée avec une valeur de 0.73. Par ailleurs, le génotype *nac969* montre un rendement de 0.61.

2 – 4 Le rendement quantique effectif du Φ PSII :

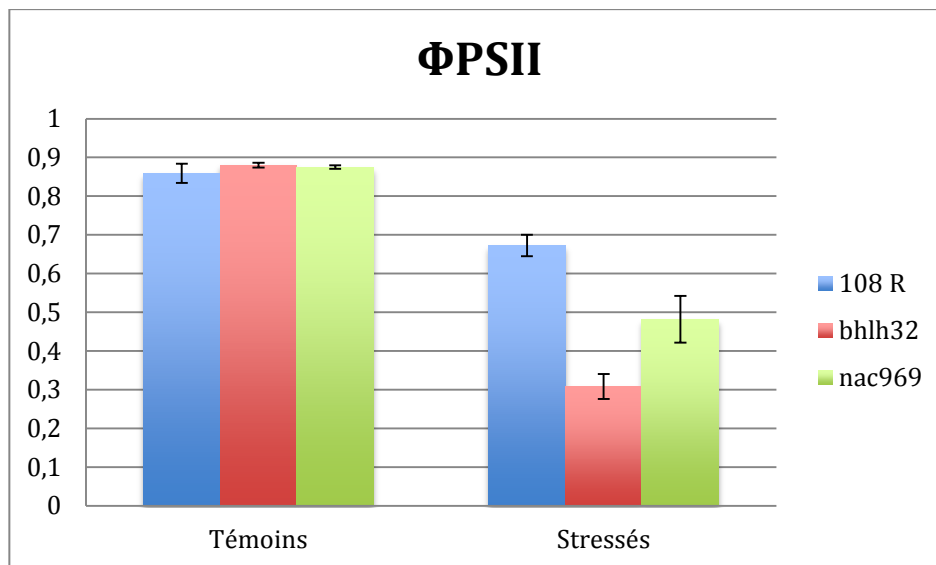


Figure 12 : Effet du stress appliqué sur le rendement quantique effectif du PSII chez les trois génotypes étudiés

Avant d'appliquer le stress sur les génotypes les résultats enregistrés pour le rendement quantique du PSII se trouvent entre 0,85 et 0,87 chez tous les espèces.

Après l'application du stress on remarque une réduction du rendement quantique effectif chez tous les génotypes. La plus importante diminution a été remarquée chez le génotype bhlh32 pour une valeur de 0,3. Alors que le génotype 108R montre la plus faible diminution établie avec une valeur de 0,67. Le dernier génotype qui est le nac969 donne une diminution pour une valeur de 0,48.

Discussion :

Les conditions défavorables de l'environnement exercent un stress sur les plantes qui y sont exposées. L'effet de ce stress se traduit au niveau de la plante par un ensemble de perturbations physiologiques affectant le métabolisme du végétal à différents niveaux.

Afin de mesurer l'effet causé par un stress sur la plante, plusieurs paramètres d'étude peuvent être utilisés. Parmi ces paramètres, les plus importants sont ceux qui se situent en relation directe avec la croissance et le développement de la plante. Dans cette case, on peut citer l'accumulation de la biomasse et la nutrition carbonée (photosynthèse).

L'accumulation de la biomasse fait appel à la nutrition carbonée par le biais de la photosynthèse. L'effet du stress salin sur la plante se traduit par un ensemble de perturbations physiologiques dues à deux principales actions :

Une déshydratation causée par un stress osmotique suite à l'accumulation des ions dans l'environnement immédiat de la racine et une toxicité causé essentiellement par l'accumulation dans la plante des ions Na^+ . Ce Na^+ ne constitue pas un macro élément nutritif essentiel chez la plupart des plantes supérieures. A forte concentration dans le sol, ce cation devient même toxique pour la plante. A des concentrations plus faibles, la plante peut l'utiliser avec profit en tant qu'osmoticum vacuolaire.

Lorsque la plante se développe en présence de Na^+ , l'accumulation de Na^+ dans le cytoplasme au-delà d'un certain seuil devient toxique, mais ce seuil n'est pas clairement déterminé. Le Na^+ n'assurerait pas la même fonction (Bhandal et Malik, 1988).

Par conséquent, une concentration élevée de Na^+ dans le cytoplasme inhiberait l'activité de nombreuses enzymes et protéines, entraînant des dysfonctionnements de la cellule.

De plus, comme la synthèse de protéines nécessite une concentration élevée en K^+ pour la fixation des ARNt aux ribosomes (Blaha et al, 2000), la traduction serait également affectée.

L'adaptation de la plante à la présence de sel dans le sol et au stress salin implique des processus très variés, intervenant à différents niveaux, de la cellule à l'organisme entier, comme par exemple une modification de l'activité métabolique conduisant à l'accumulation d'osmolytes organiques, ou des modifications morphologiques et développementales des feuilles (Munns et Tester, 2008). Au sein de ce réseau de réponses très complexe (Abdelly et al, 2008 ; Jellouli et al, 2008).



Conclusion générale

Conclusion :

Le présent travail a porté l'utilisation de quelques paramètres pour l'étude de la réponse de trois génotypes de luzerne annuelle au stress salin.

Les paramètres concernés sont : Le rendement quantique maximal, le rendement quantique effectif du Φ PSII et le poids sec des feuilles et racines.

Le suivi de l'évolution de la réponse après l'application du stress salin montre que les trois génotypes subissent une diminution du rendement quantique maximal, du rendement quantique effectif du Φ PSII.

L'étude de deux paramètres de la fluorescence chlorophyllienne qui sont Fv/Fm, le rendement du Φ PSII, montre que le stress salin appliqué a affecté le mécanisme de l'expression des facteurs de transcription NAC969 et BHLH32.

Ainsi, que la mesure de la biomasse indique que le stress salin a perturbé le mécanisme de la photosynthèse de tous les génotypes.

Ces résultats montrent que les génotypes étudiés de luzerne annuelle sont sensibles au stress salin. Et la tolérance envers ce stress varie de génotype d'un autre.

La surexpression en condition de stress salin des facteurs de transcription étudiés montre leur implication dans les processus de réponse de la plante *Medicago truncatula* aux concentrations élevées en NaCl.

Afin de confirmer ce résultat, une étude physiologique a été menée sur des mutants correspondant aux gènes étudiés. Cette étude à porter sur le poids sec et la fluorescence chlorophyllienne.

Bien que les résultats obtenus par mesure du poids sec ne permettent pas de confirmer notre hypothèse, l'étude des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne quant à elle confirme le rôle important que jouent ces facteurs de transcription dans la tolérance de *Medicago truncatula* au stress salin.



Références

Références bibliographiques :

- **Abdelguerfi, A 1994** : « Auto écologie de quelques légumineuses spontanées d'intérêt fourrager et pastoral en Algérie » in « Facteurs limitant la fixation symbiotique dans le bassin méditerranéen », Montpellier, les colloques de l'INRA.
- **Assmann S. M, Snyder J. A, Etle Y. J; 2000**: ABA-deficient (aba1) and ABA-insensitive (abi1-1, abi2-1) mutants of Arabidopsis have a wild-type stomatal reponse to humidity. *Plant Cell Environ.* 23: 387-395.
- **Attia F, 2007** : Effet du stress hydrique sur le comportement écophysologique et la maturité phénologique de la vigne : Etude de cinq cépages autochtones de midi-pyrenees. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse
- **Baker N.R. and E. Rosenqvist; 2004**: Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55:1607-1621.
- **Bounaqba S., 1998** : Analyse des déterminants de la tolérance à NaCl chez le blé tendre, le triticale et l'orge. Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne dans le diagnostic de l'état fonctionnel du photosystème II. Doctorat de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Univ. Tunis II.
- **Brunel S, 2008** : Caractérisation écophysologique de différents génotypes de *medicago truncatula* au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe. Thèse de doctorat en sciences agronomiques d'angers.
- **Christensen M.G, Teicher H.B. & Streibig J.C; 2003**: Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening. *Pest Manag. Sci.* 59: 1303-1310 p.
- **Clarkson, N.M. et Russel, J.S. 1976**: Effect of water stress on the phasic development of annual *Medicago* species. *Aust. Agric.*
- **Fougère et al, 1991** : *Medicago sativa*



Annexes

Annexes

La solution nutritive utilisée : solution commerciale.

Arrosage 45 jours d'un rythme ½.

Dosage des Extraits ARN au Nanodrop :

Composition de la solution nutritive :

Azote total : 20%

Phosphore : 20%

Potasse : 20%

Magnesium : 0.25%

Fer : 400 ppm

Zinc : 300 ppm

Manganèse : 300 ppm

Cuivre : 50 ppm

Bor : 15 ppm

Préparation : 1g/l.

Effet du stress salin sur l'expression de deux facteurs de transcription chez la luzerne annuelle *Medicago truncatula* : cas du *NAC969* et du *BHLH32*

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

Résumé :

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet et la variabilité de la réponse chez trois géotypes de luzerne annuelle *Medicago truncatula* au stress salin. Les géotypes étudiés sont : géotype sauvage : 108R, mutant *bhlh32* (Mutant par insertion TNT1), mutant *nac969* (Mutant par insertion TNT1).

Différents paramètres ont été étudiés : Le rendement quantique maximal, Le rendement quantique effectif du Φ PSII et le poids sec des feuilles et racines.

Les résultats obtenus montrent que le stress salin a induit l'expression des facteurs de transcription. L'étude de l'effet du stress salin sur des mutants correspondant aux gènes étudiés montre que le mutant *bhlh32* tolère mieux que le 108R (géotype sauvage) et le mutant *nac969*.

Mots clés : *Medicago truncatula*, stress salin, facteurs de transcription

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biotechnologie végétale – Chaab Errsas

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : M^{elle}. YKHLEF Nadia - Professeur à UFM Constantine.

Encadreur : M^r. TEMAGOULT Mahmoud - M.A.A à UFM Constantine

Examinatrice : M^{me}. BENABDOUN Faiza Meriem - M.C.B à UFM Constantine.

Date de soutenance : 18/06/2016