

République Algérienne Démocratique et Populaire
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
Département de Biologie et Ecologie Végétale

N° d'ordre : 110/D3C/18

Série : 04/ECOV/2018

Thèse Présentée en Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat
3ème cycle

Filière : Biotechnologie, Biologie et Environnement

Option : Biotechnologie et Génomique Végétales

Etude des enzymes du stress oxydatif chez le blé dur
(*Triticum durum* Desf.) : caractérisation biochimique et
moléculaire

Présenté par : Melle BOUCHEMAL Karima

Soutenu le : 30/10/2018

Devant le jury

Président :

Pr. Nadia. Ykhlef

Professeur Université des Frères Mentouri

Constantine

Rapporteur :

Pr. Abdelhamid. Djekoun

Professeur Université des Frères Mentouri

Constantine

Examineurs :

Pr. Mohamed Reda. Djebar

Professeur Université Badji Mokhtar

Annaba

Pr. Miloud. Hafsi

Professeur Université Ferhat Abbas

Sétif

Pr. Mohamed Abdelhafid Hamidechi

Professeur Université des Frères Mentouri

Constantine

Année Universitaire : 2017/2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَمَا تَوْفِيقِي إِلَّا بِاللَّهِ عَلَيْهِ تَوَكَّلْتُ وَإِلَيْهِ أُنِيبُ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَظِيمُ

Dédicaces

À la mémoire de mon papa chéri, sans qui je ne serais vraisemblablement pas là. Papa, tu as dépensé toute ta vie pour assurer une éducation exemplaire à tes enfants, quoique je puisse dire et écrire, je ne saurais exprimer l'amour et l'estime que j'ai toujours eu pour toi. Que dieu le tout puissant t'accueille dans son vaste paradis.

À ma maman, mon rayon de soleil ; c'est grâce à toi que je suis arrivée jusque-là, tes sacrifices, tes prières et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours tout au long de ma vie. Je te dédie cet humble travail en témoignage de mon profond amour.

À la mémoire de mes très chers grands parents, paix à leur âme.

À mes deux frères chéris Tarek et Okba, pour votre amour, votre soutien incontournable et d'être toujours là à mes côtés, je vous aime.

À toute ma famille et mes amis.

Remerciements

C'est avec beaucoup de gratitude que je remercie mon encadrant, le Professeur A. Djekoun pour m'avoir intégré dans son équipe au sein du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV), où j'ai eu la chance d'effectuer mon master et de poursuivre en thèse. Je lui suis reconnaissante d'avoir dirigé mes travaux par ces nombreux conseils, suggestions et remarques pertinentes dont j'ai bénéficié tout au long de ces années de travail. Merci pour m'avoir laissé énormément d'autonomie et pour m'avoir fait confiance quant à l'avancée des recherches et surtout d'avoir rendu possible de mener à bien et à son terme cette thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury :

Mme N. Ykhlef, professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et d'en présider le jury de soutenance. Merci également pour toutes ces années passées avec nous durant tout le cursus de master jusqu'au doctorat, à nous diriger et orienter, pour le temps conséquent qu'elle nous a accordé, pour ses qualités pédagogiques et scientifiques. Je tiens à lui exprimer mon respect et ma reconnaissance.

Mr M.R. Djebbar, professeur à l'Université Badji Mokhtar-Annaba, Mr M. Hafsi, professeur à l'Université Ferhat Abbas-Sétif et Mr M.A. Hamidechi professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine, qui m'ont fait l'honneur de faire partie du jury, et qui ont accepté de juger ce travail.

Je souhaite remercier aussi vivement Mr D. Khelifi professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine et directeur du laboratoire de GBBV pour son soutien, ses conseils et ses encouragements. Je remercie également les membres de son équipe, en particulier Sarah Bechkri, Asma Medouri, pour leur aide précieuse dans la visualisation de mes gels et Imen Medoukali pour la lecture.

Mes vifs remerciements vont à Mr A. Benbelkacem, Directeur de recherche de l'Institut national de la recherche agronomique d'Algérie (INRAA) pour ses conseils, le partage de ses connaissances et de son savoir-faire, mais aussi pour son aide à l'octroi des variétés de blé dur pour ce travail. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec vous et à bénéficier de vos conseils. Merci beaucoup !!

Je n'oublierai pas les trois mois de stage que j'ai passé dans le Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire d'Amiens en France. Un immense merci à Laurent Gutierrez, de m'avoir accueilli si chaleureusement dans son unité. Je remercie également tous les membres du CRRBM qui ont fait que mon stage se déroule dans les meilleures conditions possibles. Ce fut pour moi une expérience enrichissante, autant sur le plan scientifique que humain. J'ai une pensée toute particulière pour Gaëlle Mongelard. Je te remercie pour le temps que tu m'as consacré et pour le savoir-faire que tu m'as transmis en biologie moléculaire, pour tes conseils, et pour la mise au point des qRT-PCR. Merci pour ta disponibilité, ta patience et gentillesse. Merci pour tout !! Un grand merci à Stéphanie Guénin pour son aide dans la réalisation de mes travaux. Ton implication a été aussi précieuse qu'incalculable dans le traitement des données de la PCR quantitative. Je te remercie pour tous les bons moments partagés à la plateforme, pour ta bonne humeur, ton sourire (ton rire surtout !). Je n'oublie pas de remercier Hervé Demailly qui m'a accompagné à la serre et a participé aux joies du broyage à l'azote liquide !! merci pour ton aide, ta disponibilité et surtout pour ta bonne humeur quotidienne. Merci Mounia Khelifa, de m'avoir

accueillie chez toi, pour ta gentillesse et ton hospitalité. Merci pour ces beaux moments passés avec ta p'tite famille, je garde en souvenir le beau sourire de Dali et Aylan. Un grand merci à ma copine de shopping ! Karine Luce qui m'a fait un peu découvrir la ville d'Amiens. Toujours souriante et positive, merci pour ta gentillesse, ton hospitalité, et surtout pour avoir assumé toutes les tâches administratives. Merci encore à tous ceux dont la bonne humeur et la gentillesse ont permis que mon séjour soit agréable : Christopher, Emilie, Christophe, Aurore, Emile, Roser. Merci aux plus jeunes : Sylvain, Cédric, François, pour avoir partagé leur bureau, leur bonne humeur. Merci pour tous les bons moments passés avec vous. Félicitations pour ceux qui ont soutenus et bonne continuation pour le reste.

Je le redis encore et encore, j'ai eu la chance d'intégrer le labo de GBBV et de faire partie de l'équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes (BAP). Je tiens à remercier toutes les personnes et l'ensemble des membres de cette équipe avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler durant mes années de thèse :

Adra, Merci pour tous ces moments agréables qu'on a passés dans la paillasse du labo ou encore à la serre, merci pour ton aide, tes conseils et ta générosité, toujours prête à rendre service, n'hésitant même pas à interrompre ton travail pour les autres.

Mahmoud, toujours là quand on a besoin de lui !! Merci pour toutes les discussions constructives, les conseils avisés, les astuces et bidouillages en tout genre et surtout merci pour m'avoir aidé dans mes problèmes de calculs, grâce à toi, je suis devenue maintenant presque autonome.

Mr M.N Belbekri et Ryma Bouldjaj, la partie expérimentale a pu se dérouler dans de bonnes conditions grâce à vous. Merci pour votre disponibilité et vos conseils, votre aide précieuse pour mes expériences de physiologie et de biochimie.

Mr Kellou, Rym, Ratiba, Merci pour votre soutien, vos conseils et encouragements. Travailler avec vous a vraiment été enrichissant.

Chafika, qui a intégré le labo y a pas longtemps, Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Mes amis et compagnons de galère : Zoheira, Chourouk, Soumia, Amina, Wassila et Seif. Un grand merci pour tous les bons moments passés ensemble, pour le soutien moral entre doctorants, votre bonne humeur et pour les fous rires partagés, j'espère qu'il y en aura d'autres !! Un petit clin d'œil à mon amie Soum, notre « english woman » merci pour les modifications que t'as apporté à la grammaire de mon article.

Mes remerciements vont aussi aux membres de l'équipe de Cytogénétique : Mme Tourki, Radia, Karim, Meriem pour leur grande générosité, leur bonne humeur, leurs sourires.

Un grand merci à mon ami Fateh Merouane, pour son aide, ses conseils, ses encouragements. Merci à mon amie Dallel Arabet, tu m'as beaucoup soutenu ces derniers mois par ta présence et tes paroles qui m'ont fait beaucoup de bien.

Milles mercis à mes amies et sœurs qui sont là depuis ma première année de fac : Chouchou, Mouniche, Moon et Nany. Merci d'être là dans les moments de joie, mais surtout dans les moments difficiles, vous m'avez beaucoup apporté dans la vie. Merci de m'avoir soutenu et motivé jusqu'à la dernière ligne droite de cette thèse. C'est promis les filles on fera plus de sorties et plus de shopping !

Merci à ma sista Asma, mon amie d'enfance, qui me soutient depuis plus de 26 ans. Merci d'exister !

Je terminerai en adressant un très grand merci à ma famille pour son soutien sans faille et de tous les instants.

Résumé

La tolérance des plantes au déficit hydrique nécessite l'activation de plusieurs voies métaboliques complexes incluant des voies antioxydantes, en particulier des systèmes enzymatiques piègeurs des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans la présente étude, 10 génotypes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) ont été évalués sous conditions de stress hydrique, avec comme objectif de vérifier et de mettre en évidence l'existence de corrélations entre la diversité génétique identifiée par le biais des marqueurs enzymatique à savoir : les superoxydes dismutase (SOD), les catalases (CAT), les peroxydases (POX) et les propriétés de tolérance aux stress hydrique. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'impact du stress oxydatif et évalué la performance de différents cultivars de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et au paraquat. Pour cela, l'activité des enzymes SOD, CAT, GPOX, et les biomarqueurs du stress oxydatif à savoir : le taux de peroxydation lipidique, le taux en H₂O₂, la stabilité membranaire et la teneur en chlorophylle totale ont été mesurés. Une analyse de corrélation entre les enzymes antioxydantes, les marqueurs du stress oxydatif et les paramètres physiologiques qui reflètent le statut hydrique de la plante a été effectuée. Les résultats obtenus indiquent que les 3 types de stress appliqués, diminuent la stabilité membranaire, la teneur en chlorophylle totale et font augmenter la peroxydation lipidique, l'H₂O₂ et l'activité des enzymes antioxydantes. Toutefois, il existe des différences significatives entre les cultivars de blé étudiés dans les degrés de diminution ou d'augmentation des caractères mesurés. L'analyse de corrélation entre les paramètres biochimiques et physiologiques a fait ressortir la singularité de l'enzyme SOD, qui est particulièrement liée à la teneur relative en eau, la conductance stomatique et la teneur en chlorophylle totale. L'étude de la variabilité génétique des 3 systèmes enzymatiques foliaires, objet de la seconde partie de cette thèse, a permis d'affiner les résultats de l'analyse biochimique et physiologique et de mettre en évidence l'influence du stress hydrique sur le métabolisme de ces enzymes, chez des plantes de blé dur cultivées en hydroponie et traitées avec du PEG 6000. Une approche basée sur une PAGE en conditions natives a été développée afin d'évaluer si les variations globales observées résultaient de variations qualitatives (présence/absence) ou quantitatives spécifiques à certaines isoenzymes. Des différences très marquées ont été décelées dans les profils des 3 systèmes enzymatiques étudiés. L'analyse électrophorétique a permis de montrer l'induction de nouvelles isoformes et une augmentation de leur intensité chez les cultivars de blé dur en situation de stress hydrique. Enfin, L'étude de l'expression des gènes codants pour ces enzymes au niveau des cellules foliaires du blé dur a été réalisée par le biais d'une RT-PCR quantitative en temps réel. Les niveaux d'expression de 3 gènes codants pour la CAT (TdCAT1, CATA, CAT3), 3 gènes codants pour la POX (Pox3, TaPrx107, TaPrx115) et 2 gènes codants pour la SOD (TdMnSOD, SOD1.1) étaient différemment affectés par le manque d'eau. Une variation de l'accumulation des transcrits a été observée en réponse au stress hydrique. Cette approche moléculaire a permis d'identifier les gènes CATA, CAT3, TdMnSOD et SOD1.1 comme gènes candidats pour d'éventuelles cibles de génie génétique ainsi que la recherche de marqueurs moléculaires comme outil de sélection pour l'amélioration de la tolérance du blé dur au stress hydrique.

Mots clés : Blé dur, stress hydrique, antioxydants, isoenzymes, stress oxydatif, peroxydase, catalase, superoxyde dismutase, expression génique.

Abstract

Plant drought tolerance requires the activation of complex metabolic including antioxidative pathways, especially reactive oxygen species (ROS) scavenging enzymatic systems. In this study, 10 durum wheat genotypes (*Triticum durum* Desf.) were evaluated under drought stress conditions, in order to highlight the correlations between genetic diversity identified through enzymatic markers : superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX) and water stress tolerance properties. Firstly, in the first assay, we characterized the impact of oxidative stress and assessed the performance of different cultivars of durum wheat under drought, heat and paraquat stress. The activities of enzymatic antioxidants SOD, CAT, GPOX and oxidative biomarkers were measured : lipid peroxidation, H₂O₂ content, membrane stability, and total chlorophyll content. In addition, a correlation analysis between antioxidant enzymes, oxidative markers and physiological parameters related to water status was performed. Results indicated that the 3 treatments decreased membrane stability, chlorophyll content and increased lipid peroxidation, H₂O₂ content and activities of antioxidant enzymes. However, there were significant differences between wheat cultivars in amounts of decrease or increase in the measured traits. Correlation analysis between biochemical and physiological parameters revealed the singularity of SOD enzyme, which is particularly related to the relative water content, stomatal conductance and total chlorophyll content, The second part of this thesis was devoted to the study of the genetic variability of the three foliar enzymatic systems which allowed us to refine the results of the biochemical and physiological analysis as well as to highlight the influence of water stress on the metabolism of these enzymes in wheat plants grown hydroponically and treated with PEG 6000. An approach based on native PAGE has been developed to evaluate whether the observed overall variations, resulted from qualitative (presence/absence) or quantitative variations specific to certain isoenzymes. Marked differences were detected in the profiles of the studied 3 enzymatic systems studied. Electrophoretic analysis showed the induction of new isoforms and an increase in their intensity in durum wheat cultivars under water stress. Finally, the study of the expression of genes coding for these enzymes, in leaf cells of durum wheat was conducted through Real-Time quantitative RT-PCR. Expression levels of 3 genes coding for CAT (TdCAT1, CATA, CAT3), 3 genes coding for POX (Pox3, TaPrx107, TaPrx115) and 2 genes coding for SOD (TdMnSOD, SOD1.1) were differently affected by drought. A variation in transcript accumulation was observed in response to water stress. This molecular approach identified the genes CATA, CAT3, TdMnSOD and SOD1.1 as candidate genes for potential genetic engineering targets and research for molecular markers as a selection tool for improving the tolerance of durum wheat to water stress.

Key words : Durum wheat, water stress, antioxidants, isoenzymes, oxydative stress, peroxidase, catalase, superoxide dismutase, gene expression.

ملخص

يتطلب تحمل النباتات للإجهاد المائي تنشيط العديد من المسارات الأيضية المعقدة بما في ذلك مسارات الأكسدة المضادة، خاصة الأنظمة الإنزيمية المحاصرة لأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS). في هذه الدراسة، تم تقييم 10 أنماط وراثية من القمح الصلب (*Triticum durum* Desf) تحت ظروف الإجهاد المائي، بهدف التحقق من وجود ارتباط بين التنوع الجيني المحدد عن طريق مؤشرات أنزيمية وهي: (SOD), les superoxydes dismutase (SOD), les catalases (CAT), les peroxydases (POX) وخصائص التسامح للإجهاد المائي. في بادئ الأمر، ميزنا تأثير الإجهاد التأكسدي وقيمنا أداء مختلف أصناف القمح الصلب في ظروف الإجهاد المائي، الحراري والكيميائي باستخدام paraquat. لهذا، تم قياس كل من نشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة (SOD, CAT, GPOX) والمؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي بما يخص: معدل البيروكسيد الدهني، معدل H_2O_2 ، الاستقرار الغشائي ومحتوى الكلوروفيل الكلي. تم إجراء تحليل الارتباط بين الإنزيمات المضادة للأكسدة، وعلامات الإجهاد التأكسدي والمعايير الفسيولوجية التي تعكس الوضع المائي للنبات. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن الأنواع الثلاثة من الإجهاد المطبقة تقلل من استقرار الغشاء ومحتوى الكلوروفيل الكلي وتعمل على زيادة البيروكسيد الدهني، بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 ونشاط الإنزيمات المضادة للأكسدة. ومع ذلك، توجد فروق ذات دلالة إحصائية بين أصناف القمح المدروسة بدرجات انخفاض أو زيادة الصفات المقاسة. تحليل الارتباط بين المقاييس البيوكيميائية و الفسيولوجية أظهر تميز إنزيم SOD، والذي يرتبط بشكل خاص بالمحتوى النسبي للماء، والمعاملة الثغرية ومحتوى الكلوروفيل الكلي. دراسة التنوع الجيني للأنظمة الإنزيمية الورقية الثلاث، وهو الهدف من الجزء الثاني من هذه المذكرة، سمح بصقل نتائج التحليل البيوكيميائي والفسيولوجي وتسلط الضوء على تأثير الإجهاد المائي على نشاط هذه الإنزيمات لأوراق القمح الصلب المزروعة في الزراعة المائية والمعاملة بال PEG 6000. وقد طورت منهجية قائمة على PAGE الأصلية لتقييم ما إذا كانت التغيرات الملحوظة الشاملة نتجت عن اختلافات نوعية (وجود / غياب) أو كمية محددة لبعض الإنزيمات المتشابهة. تم الكشف عن اختلافات جد ملحوظة في ملامح الأنظمة الأنزيمية الثلاثة المدروسة. سمح التحليل الكهربائي بإظهار isoformes جديدة وبزيادة شدة كثافتها في أصناف القمح الصلب المعاملة بالإجهاد المائي. وأخيراً، دراسة التعبير عن الجينات المشفرة لهذه الإنزيمات على مستوى الخلايا الورقية من القمح الصلب تم تحقيقها من خلال RT-PCR الكمية في الوقت الحقيقي. مستويات التعبير لثلاثة جينات مشفرة CAT (TdCAT1, CATA, CAT3) و ثلاثة جينات مشفرة POX (Pox3, TaPrx107, TaPrx115)، واثنين من جينات مشفرة SOD (TdMnSOD, SOD1.1)، قد تأثرت بشكل مختلف من نقص الماء. هذا المنهج الجزيئي سمح لنا بتحديد الجينات TdMnSOD, CATA و SOD1.1 كمورثات مرشحة لأهداف محتملة للهندسة الوراثية؛ والبحث عن الواسمات الجزيئية كأداة لتحسين تحمل القمح القاسي للإجهاد المائي.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب، الإجهاد المائي، مضادات الأكسدة، الإنزيمات المتشابهة، الإجهاد التأكسدي، peroxylase, catalase, superoxyde dismutase، التعبير الوراثي

Liste des figures

Figure 1 : Relations phylogénétiques entre le blé dur et ses ancêtres diploïdes sauvages.....	4
Figure 2 : Morphologie du blé dur	6
Figure 3 : Répartition des précipitations dans le nord de l'Algérie	7
Figure 4 : Génération des ROS par transfert d'énergie ou réduction séquentielle univalente de l'oxygène triplet à l'état fondamental.....	9
Figure 5 : Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale	10
Figure 6 : Représentation schématique du système de transport des électrons dans la membrane thylacoïde montrant 3 sites possibles de production des ROS.	11
Figure 7 : Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons dans la membrane interne des mitochondries végétales	12
Figure 8 : Représentation schématique de la synthèse des ROS dans les peroxysomes.	14
Figure 9 : Représentation schématique de la production des ROS dans le réticulum endoplasmique (ER).....	14
Figure 10 : Schéma général de la réponse des plantes aux stress abiotiques	16
Figure 11 : Schéma général illustrant comment les ROS et le Ca ²⁺ peuvent moduler les activités nucléaires en contrôlant les activités et/ou la localisation des protéines cibles.....	18
Figure 12 : Un modèle proposé pour le rôle des ROS dans la voie de signalisation de l'ABA	19
Figure 13 : Concept de la façon dont la sécheresse augmente la génération des ROS durant la photosynthèse	21
Figure 14 : Mécanisme de la peroxydation des acides gras	23
Figure 15 : Lésions de l'ADN et produits formés par l'attaque des ROS	25
Figure 16 : Digramme en ruban de la sous unité TdMnSOD du blé dur	29
Figure 17 : Diagramme en ruban de la sous unité Fe-SOD du Niébé.....	30
Figure 18 : Diagramme en ruban de la sous unité Cu/Zn-SOD du riz.....	30
Figure 19 : Représentation tridimensionnelle de la structure cristallographique de la HRP ..	34
Figure 20 : Le cycle catalytique de la peroxydase de raifort (HRP) avec l'acide férulique comme substrat réducteur	35
Figure 21 : Représentation schématique du cycle catalytique de la catalase	38

Figure 22 : Diagramme en ruban de la sous-unité TdCAT1 du blé dur.....	39
Figure 23 : Dispositif de culture sous serre.....	44
Figure 24 : Phénotype de jaunissement sur des feuilles de blé dur suite au traitement avec le paraquat	44
Figure 25 : Réaction de condensation du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique formant le dérivé coloré : MDA (TBA) ₂	48
Figure 26 : Dispositif de culture en milieu hydroponique	55
Figure 27 : Dispositif de culture sous serre.....	60
Figure 28 : Profil de migration des ARN totaux de blé dur	62
Figure 29 : Principe du SYBR Green I	64
Figure 30 : Modèle graphique de la PCR en temps réel.	65
Figure 31 : Vérification de la pureté de l'amplicon produit grâce à la courbe de fusion « <i>melting curve</i> »	68
Figure 32 : Identification du gène ayant l'expression la plus stable pour les traitements réalisés selon le programme GeNorm	70
Figure 33 : Effet du déficit hydrique sur la teneur relative en eau (RWC) foliaire des 10 génotypes de blé dur.....	83
Figure 34 : Effet du déficit hydrique sur le potentiel osmotique foliaire (π) des 10 génotypes de blé dur.	85
Figure 35 : Effet du déficit hydrique sur la conductance stomatique foliaire (g_s) des 10 génotypes de blé dur.....	86
Figure 36 : Effet du déficit hydrique sur la température foliaire des 10 génotypes de blé dur.....	88
Figure 37 : Effet du déficit hydrique sur le rendement quantique maximale (Fv/Fm) des 10 génotypes de blé dur.....	89
Figure 38 : Représentation descriptive par analyse en composantes principales (ACP) des valeurs des paramètres physiologiques et biochimiques suite à un stress hydrique.	93
Figure 39 : Potentiel osmotique foliaire des 10 génotypes de blé dur traités au PEG 6000 ...	98
Figure 40 : Teneur en chlorophylle totale (Chl a+b) foliaire des 10 génotypes de blé dur traités au PEG 6000.....	99
Figure 41 : Teneur en caroténoïdes (Car) foliaires des 10 génotypes de blé dur traités au PEG 6000	100
Figure 42 : Zymogramme de l'activité SOD des feuilles de blé dur	102
Figure 43 : Zymogramme de l'activité CAT des feuilles de blé dur	104
Figure 44 : Zymogramme de l'activité GPOX des feuilles de blé dur	106

Figure 45 : Dendrogramme de similarité (utilisant la méthode UPGMA) basé sur les profils électrophorétiques des SOD, CAT et GPOX des 10 géotypes de blé dur.....	108
Figure 46 : Niveaux d'expression des gènes candidats.....	114

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, leurs fonctions et leurs localisation cellulaire.....	27
Tableau 2 : Classification des 3 catalases dans différentes espèces végétales.....	40
Tableau 3 : Pédigrée, origine et acronyme des génotypes étudiés.....	42
Tableau 4 : Composition du milieu BD	54
Tableau 5 : Composition du gel d'électrophorèse pour la séparation des CAT (A), SOD (B) et GPOX (C).....	58
Tableau 6 : Liste des gènes étudiés par RT-PCR quantitative.....	66
Tableau 7 : Gènes constitutifs, séquences des amorces sens et antisens et taille des produits amplifiés (en nombre de paires de bases).....	67
Tableau 8 : Activité de la SOD ($U\ g^{-1}\ MF$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat.....	72
Tableau 9 : Activité de la CAT ($\mu mol\ min^{-1}\ g^{-1}\ MF$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat	73
Tableau 10 : Activité de la GPOX ($\mu mol\ min^{-1}\ g^{-1}\ MF$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat	75
Tableau 11 : Concentration du malonaldéhyde (MDA) ($nmol\ g^{-1}\ MF$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat.....	76
Tableau 12 : Teneur en H_2O_2 ($nmol\ g^{-1}\ MF$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat.....	78
Tableau 13 : Libération relative d'électrolytes (%) dans les cellules foliaires du blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat	80
Tableau 14 : Taux de chlorophylle totale des cellules foliaires de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat.....	81
Tableau 15 : Matrice de corrélation de Pearson (n) des variables mesurées des 10 génotypes de blé dur.....	91
Tableau 16 : Variations génétiques spécifiques à l'enzyme SOD chez 10 génotypes de blé dur	103
Tableau 17 : Variations génétiques spécifiques à l'enzyme GPOX chez 10 génotypes de blé dur.....	107
Tableau 18 : Matrice de similarité génétique pour les 3 systèmes enzymatiques basée sur le coefficient de Jaccard entre les différents génotypes étudiés.....	108

Liste des abréviations

·OH : Radical hydroxyle	GSH : Glutathion réduit
¹O₂ : Oxygène singulet	gs : Conductance stomatique
AA : Acide Ascorbique	H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène
ABA : Acide Abscissique	HRP : Horseradish peroxidase
ADN : Acide Désoxyribonucléique	ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures.
ANOVA : Analyse de variance	kDa : Kilo Dalton
AOX : Alternative Oxydase	LEA : Late Embryogenesis Abundant
APS : Ammonium Persulfate	LPO : Lipid peroxidation
APX : Ascorbate Peroxydase	MAPK : Mitogen-activated protein kinases
ARN : Acide Ribonucléique	MDA : Malondialdehyde
AsA : Ascorbate	MgCl₂ : Chlorure de Magnésium
B : Bore	Mn-SOD : Manganèse-Superoxyde Dismutase
BSA : bovine sérum albumine	MPa : Mégapascal.
Ca : Calcium	NaCl : Chlorure de Sodium
Car : Caroténoïdes	NADP⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide phosphate
CAT : Catalase	NBT : Bleu de Nitrotetrazolium
CDS : Coding DNA Sequence	NO : Monoxyde d'azote
CHL : Chlorophylle	O₂ : Dioxygène
Ct : Cycle Threshold	O₂⁻ : Anion superoxyde
Cu/Zn-SOD : Cuivre/Zinc-Superoxyde Dismutase	PAGE : Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
Cys : Cystéine	PEG : Polyéthylène Glycol.
DTT : Dithiothréitol	PMSF : Fluorure de Phénylméthylsulfonyle
EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétate	POX : Peroxydase
EST : Expressed Sequence Tag	PQ : Paraquat
FAO : Food and Agriculture Organization	
Fe-SOD : Fer-Superoxyde Dismutase	
GPOX : Guaiacol Peroxydase	
GPX : Glutathion Peroxydase	
GST : Glutathion S-transférase	

PSI : Photosystème I
PSII : Photosystème II
PVP : Polyvinylpyrrolidone
PVPP : Polyvinylpolypyrrolidone
REL : Relative electrolyte leakage
Rf : Rapport Frontal
RIN : RNA Integrity Number
ROS : Reactive Oxygene Species
rpm : Rotation par minute.
rs : Résistance stomatique
RT-qPCR : PCR Quantitative en Temps Réel
RuBP : Ribulose-1,5-bisphosphate
RWC : Relative Water Content
SA : Acide Salicylique
SDS : Sodium Dodécylsulfate
Si : Silicium
SNP : Nitroprussiate de Sodium
SOD : Superoxyde Dismutase
SOP : Sulfate de Potassium
TBA : Acide Thiobarbiturique
TCA : Acide Trichloroacétique.
TEMED : Tétraméthyl-Ethylène-Diamine
Tris : Tris-hydroxyméthyl-aminométhane.
UPGMA : Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic averages

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I. Synthèse bibliographique.....	4
1. Botanique et importance du blé dur.....	4
2. Le blé dur face à la sécheresse	7
3. Sécheresse et stress oxydatif chez les plantes	8
3.1. Le stress oxydatif.....	8
3.2. Génération des ROS durant le métabolisme cellulaire	9
3.2.1. Formation des ROS dans les chloroplastes	10
3.2.2. Formation des ROS dans les mitochondries	11
3.2.3. Formation des ROS dans les peroxysomes	13
3.2.4. Autres sources génératrices des ROS.....	13
3.3. Mécanisme du stress oxydatif dans la plante.....	15
3.3.1. Perception du stress et signalisation cellulaire par les ROS.....	15
3.3.2. La sécheresse augmente la production des ROS.....	20
3.4. Toxicité des ROS.....	22
3.4.1. Oxydation des lipides	22
3.4.2. Oxydation des protéines	24
3.4.3. Oxydation des acides nucléiques.....	25
4. Système antioxydant enzymatique : dégradation des ROS.....	26
4.1. La superoxydes dismutase (EC 1.15.1.1)	28
4.1.1. Description de l'enzyme.....	28
4.1.2. Structure tridimensionnelle des SOD	28
4.1.3. Gènes codants la SOD.....	31
4.1.4. Localisation subcellulaire et rôles fonctionnels de la SOD.....	31
4.2. La peroxydase de classe III (EC 1.11.1.7).....	33
4.2.1. Description de l'enzyme.....	33
4.2.2. Structure tridimensionnelle des POX.....	33

4.2.3.	Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique des POX	34
4.2.4.	Multiplicité des gènes POX et des isoformes.....	35
4.2.5.	Localisation subcellulaire et rôles fonctionnels des POX.....	36
4.3.	La catalase (EC 1.11.1.6).....	37
4.3.1.	Description de l'enzyme.....	37
4.3.2.	Structure tridimensionnelle de la CAT.....	38
4.3.3.	Gènes codants la CAT et isoformes	39
4.3.4.	Localisation subcellulaire et rôles fonctionnels des CAT	40
Chapitre II. Matériels et méthodes		42
1. Matériel végétal.....		42
2. Méthodes expérimentales		42
2.1.	Etude de l'effet du stress oxydatif sur les activités enzymatiques antioxydantes et des marqueurs du stress oxydatif	42
2.1.1.	Conditions de culture	42
2.1.2.	Application des stress	43
2.1.3.	Mesure des activités enzymatiques	44
2.1.4.	Evaluation des dommages oxydatifs	47
2.1.5.	Suivi physiologique des plantes sous conditions de stress hydrique	50
2.1.6.	Analyses statistiques	52
2.2.	Analyse par électrophorèse native (PAGE) d'isoenzymes de GPOX, CAT et de SOD en conditions de stress hydrique	53
2.2.1.	Conditions de culture	53
2.2.2.	Application du stress	53
2.2.3.	Mesure des paramètres liés à l'état hydrique des plantes.....	55
2.2.4.	Electrophorèse monodimensionnelle en conditions natives (PAGE)	56
2.2.5.	Traitement des données	59
2.3.	Etude de l'expression des gènes de CAT, SOD et POX en réponse au stress hydrique par RT-PCR quantitative	59
2.3.1.	Dispositif expérimental et conditions de culture.....	59
2.3.2.	Echantillonnage des feuilles.....	60
2.3.3.	Extraction des ARN totaux	61
2.3.4.	Analyse qualitative et quantitative des ARN totaux extraits.....	61

2.3.5.	Transcription inverse.....	62
2.3.6.	PCR quantitative en temps réel	62
Chapitre III. Résultats et discussion.....		71
1. Activités enzymatiques et marqueurs du stress oxydatif en réponse à différents stress		71
1.1.	Activité de la Superoxyde dismutase (SOD).....	72
1.2.	Activité de la catalase (CAT)	73
1.3.	Activité de la guaiacol peroxydase (GPOX)	74
1.4.	Teneur en Malondialdéhyde (MDA)	75
1.5.	Teneur en peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	77
1.6.	Libération relative d'électrolytes (REL).....	79
1.7.	Teneur en chlorophylle totale	80
1.8.	Suivi de paramètres physiologiques liés à l'état hydrique des plantes.....	82
1.8.1.	Détermination du RWC.....	82
1.8.2.	Détermination du potentiel osmotique	84
1.8.3.	Détermination de la conductance stomatique.....	86
1.8.4.	Détermination de la température foliaire.....	87
1.8.5.	Détermination du rendement quantique maximale (Fv/Fm).....	89
1.9.	Relation entre le statut oxydant et les paramètres physiologiques étudiés.....	92
2. Analyse des profils de séparation par PAGE des isoenzymes CAT, GPOX et SOD		97
2.1.	Effet du PEG sur le potentiel osmotique	98
2.2.	Effet du PEG sur la chlorophylle totale et les caroténoïdes	99
2.3.	Analyse du profile électrophorétique des SOD	101
2.4.	Analyse du profile électrophorétique des CAT	103
2.5.	Analyse du profile électrophorétique des GPOX	105
2.6.	Analyse du dendrogramme	107
3. Effets du stress hydrique sur l'expression des gènes liés au stress oxydatif.....		113
3.1.	Analyse des profils d'expression des transcrits.....	115
3.1.1.	L'expression relative des gènes CAT.....	115
3.1.2.	L'expression relative des gènes POX.....	117
3.1.3.	L'expression relative des gènes SOD.....	118

Conclusion et perspectives..... 124

Références bibliographiques

Annexes

Valorisation et produits scientifiques

Introduction

Introduction générale

Les contraintes abiotiques, particulièrement la sécheresse est l'un des principaux facteurs majeurs de stress qui prévalent sur les hauts plateaux de l'est algérien, caractérisés par un climat de type méditerranéen où le blé dur est généralement cultivé. Elle est responsable d'une grande partie des pertes de productivité dues à la diminution de la photosynthèse, à la sénescence accélérée des feuilles et à la réduction de la durée de remplissage des grains (Belkharchouche *et al.*, 2015). L'exposition des plantes à la sécheresse engendre des modifications de l'homéostasie cellulaire par la surproduction de formes réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux Hydroxyles ($\cdot OH$), qui sont des molécules très réactives, avec un potentiel oxydant élevé, et qui ont la propriété d'attaquer et altérer les composants moléculaires de la cellule (Parent *et al.*, 2008). En effet, la fermeture des stomates provoquée par le stress hydrique prive les feuilles de dioxyde de carbone ce qui conduit à une accumulation du NADPH (Zlatev *et al.*, 2006). Ces conditions défavorables augmentent le taux des ROS tel que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) par une fuite accrue des électrons vers l'oxygène moléculaire pendant la photosynthèse et la photorespiration, ainsi que l' H_2O_2 issu de la dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ (Foyer *et al.*, 1994).

Pour faire face à ces contraintes, les plantes ont mis en place au cours de l'évolution divers mécanismes adaptatifs notamment par l'ajustement de leurs systèmes métaboliques (Verslues *et al.*, 2006). Au cours de ces mécanismes, on assiste à des modifications de structure ou de fonction qui augmentent la probabilité de la survie des plantes lors de ces conditions, cela se traduit par une production accentuée de molécules antioxydantes. De nombreux travaux montrent que des enzymes telles que des superoxydes dismutases (SOD), des peroxydases (POX) et des catalases (CAT), s'accumulent en conditions de stress hydrique (Reddy *et al.*, 2004). Ces métallo-enzymes représentent un système de défense antioxydatif puissant contre le stress oxydatif, capables d'éliminer les radicaux libres primaires de façon permanente et efficace. Les superoxydes dismutases (Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD), catalysent la dismutation du radical $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Ce dernier n'est pas un radical libre, mais c'est malgré tout un intermédiaire réduit toxique. Sa concentration est régulée par plusieurs enzymes dont les catalases et les peroxydases qui vont le réduire en eau et oxygène (Willekens *et al.*, 1997). La réponse des antioxydants enzymatique est en partie déterminée

génétiquement, la diversité de leurs aspects quantitatifs et qualitatifs fait de ces enzymes des marqueurs potentiels chez plusieurs plantes. Cette variabilité génétique pourrait jouer un rôle dans les réponses des plantes au stress oxydatif et peuvent être employés pour identifier la variabilité des cultivars développés pour la tolérance au stress hydrique.

Le projet de thèse que nous avons choisi de développer vise à une meilleure compréhension du rôle des enzymes antioxydantes, notamment la SOD, la CAT et la GPOX, dans la tolérance du blé dur (*Triticum durum*) au stress hydrique et de vérifier s'il est possible de mettre en évidence, l'existence de corrélations entre l'activité catalytique, la diversité génétique identifiées par le biais de ces marqueurs enzymatiques et les propriétés de tolérance aux stress hydrique chez quelques variétés de blé dur. Trois chapitres composent ce mémoire. Le premier chapitre présente une synthèse bibliographique où nous feront une brève description des caractéristiques botaniques de l'espèce étudiée puis une description approfondie des connaissances sur les stress oxydatifs et des enzymes antioxydantes dans les plantes ainsi que leurs effets sur ces dernières. Une présentation du matériel végétal et des techniques utilisées pour répondre à nos objectifs est effectuée dans le second chapitre. Le troisième chapitre constitue le corps de la thèse. Il regroupe l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion en trois parties :

- 1) **Effet du stress oxydatif sur les activités enzymatiques antioxydantes et des marqueurs du stress oxydatif.** Dans cette partie, l'impact du stress oxydatif sur la réponse du blé dur va être évalué en comparant différentes variétés de blé soumises à différents stress, y compris le stress hydrique. Une caractérisation physiologique et biochimique des feuilles de blés dur est effectuée dans un premier temps en conditions de stress, suivie d'une étude de la corrélation entre les enzymes antioxydantes, les marqueurs du stress oxydatif, et les paramètres physiologiques qui reflètent le statut hydrique de la plante.
- 2) **Analyse par électrophorèse native (PAGE) d'isoenzymes de GPOX, CAT et SOD sous condition de stress hydrique.** Une analyse de la variabilité génétique des différents génotypes de blé par des marqueurs isoenzymatiques sera mise en évidence par le biais d'une PAGE native. L'utilisation des isoenzymes s'avère bien adaptée à la caractérisation de plantes tolérantes au stress hydrique. Cette technique permettra de d'analyser les modifications engendrées par le stress hydrique sur les formes multiples

d'enzymes SOD, CAT et GPOX et la ségrégation de leurs allèles. Les variations observées dans les profils électrophorétiques pourraient être la cause des variations phénotypiques entre les génotypes analysés sous l'effet d'un stress hydrique.

- 3) **Etude de l'expression des gènes codants pour la CAT, SOD et POX en réponse au stress hydrique par RT-PCR quantitative.** Notre étude a été complétée par une analyse moléculaire où l'expression de quelques gènes décrits comme étant des déterminants du contrôle des niveaux des ROS sera évaluée. L'identification des gènes exprimés ou réprimés en réponse au stress hydrique permettra de mieux comprendre leur comportement dans la tolérance du blé dur. Ces gènes candidats peuvent ensuite être utilisés à des fins d'amélioration.

La dernière partie du manuscrit, qui propose une synthèse et une discussion de l'ensemble de ces résultats, suggère quelques perspectives à ce travail.

Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

Chapitre I. Synthèse bibliographique

1. Botanique et importance du blé dur

Le blé est une plante herbacée, monocotylédone qui appartient au genre *Triticum* de la famille des *Gramineae*. C'est une céréale à paille annuelle haute de 0,5 à 1,5m ; cultivée pour sa paille et majoritairement pour ses grains, à inflorescence en épi terminal dense. En fonction du degré de ploïdie, on peut différencier les blés diploïdes (génome AA), les blés tétraploïdes (génome AA et BB) et les blés hexaploïdes (génome AA, BB, et DD) (Feillet, 2000). Le croisement naturel *Triticum monococcum* x *Aegilops* (porteur du génome B) a conduit à l'apparition du blé dur sauvage de type AABB (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) qui a progressivement évolué vers *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* puis vers *Triticum durum* (blé dur cultivé). Le blé tendre serait issu d'un croisement entre *Triticum turgidum* ssp. *dicoccum* (génome AABB) et le diploïde *Triticum tauschii* (aussi appelé *Aegilops tauschii* ou *Aegilops squarosa*, génome DD). (Figure 1).

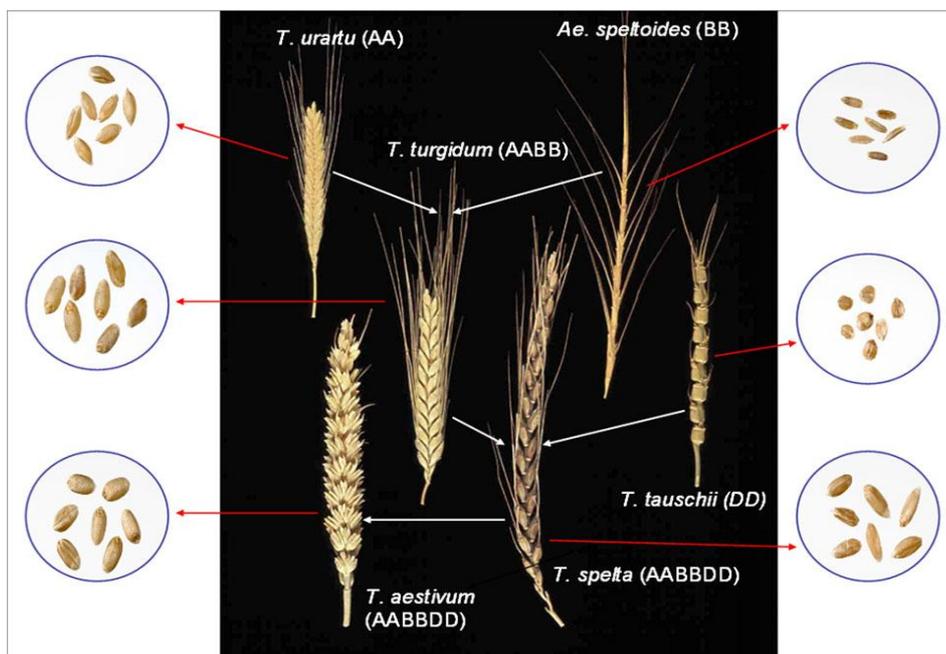


Figure 1 : Relations phylogénétiques entre le blé dur et ses ancêtres diploïdes sauvages. Exemples de grains et d'épi pour chaque espèce (d'après Shewry, 2009).

Originnaire des régions du croissant fertile du proche orient, la culture du blé s'est développée par la suite dans le bassin méditerranéen notamment en Egypte et en Grèce (Lev-Yadun *et al.*, 2000). C'est une plante annuelle, à feuilles alternes, formée d'un chaume creux

portant un épi constitué de 2 rangées d'épillets sessiles et aplatis et d'un système racinaire fasciculé. Chaque épillet compte 2 glumes (bractées) renfermant de 2 à 5 fleurs distiques sur une rachéole (Bozzini, 1988). Chaque fleur peut produire un fruit sec et indéhiscent, à une seule graine, soit le caryopse. La graine entourée de tissus protecteurs, contient un large endosperme et un embryon aplati dont la fonction est d'être un tissu de réserve (Figure 2). Les grains de blé dur sont ambrés et plus gros que ceux des autres catégories de blé. Le blé dur se distingue aussi par la couleur jaune de l'endosperme, qui donne des pâtes alimentaires dorées et un gluten plus ferme qui est à l'origine des pâtes fermes et non collantes.

Le blé est une plante autogame et cléistogame, elle se reproduit par autofécondation et sans ouverture de la fleur. Le cycle de développement du blé comprend 3 grandes périodes : une période végétative, de la germination aux premières manifestations de l'allongement de la tige principale (début de la montaison) ; une période reproductrice, du tallage herbacé à la fécondation et une période de maturation, de la fécondation à la maturité complète du grain (Guo *et al.*, 2015).

Le blé est la 3^{ème} production agricole mondiale et la 2^{ème} production céréalière après le maïs et avant le riz, où elle a atteint les 749 millions de tonnes en 2016 (FAOSTAT). En termes de production commerciale et d'alimentation humaine, le blé dur représente la deuxième espèce la plus importante du genre *Triticum* après le blé tendre. On estime actuellement que la superficie mondiale de blé dur est comprise entre 15 et 20 millions d'hectares dont plus de la moitié est concentrée autour du Bassin méditerranéen et dans les pays du Moyen Orient. En Algérie, environ 3,3 millions d'hectares sont consacrés aux cultures céréalières, dont environ 1,5 million d'hectares sont plantés avec du blé dur (Ministère de l'Agriculture et du développement rural, 2016). Il est cultivé essentiellement pour la semoulerie en vue de la fabrication des pâtes alimentaires. La semoule est également utilisée pour le couscous, le frik et pour la fabrication de diverses sortes de gâteaux et de pains traditionnels. Les principales variétés de blé dur cultivées en Algérie sont issues de la sélection généalogique effectuée à partir d'individus prélevés dans les populations locales, d'introduction ou créés par hybridation. La diversité des variétés de céréales est très grande et leur description fait appel à de nombreux caractères (Ali *et al.*, 2014a). Cependant, la production céréalière nationale qui demeure largement déficitaire est loin de satisfaire la demande en croissance, d'où le recours au marché international pour s'approvisionner et combler l'écart entre la consommation et la production nationale.

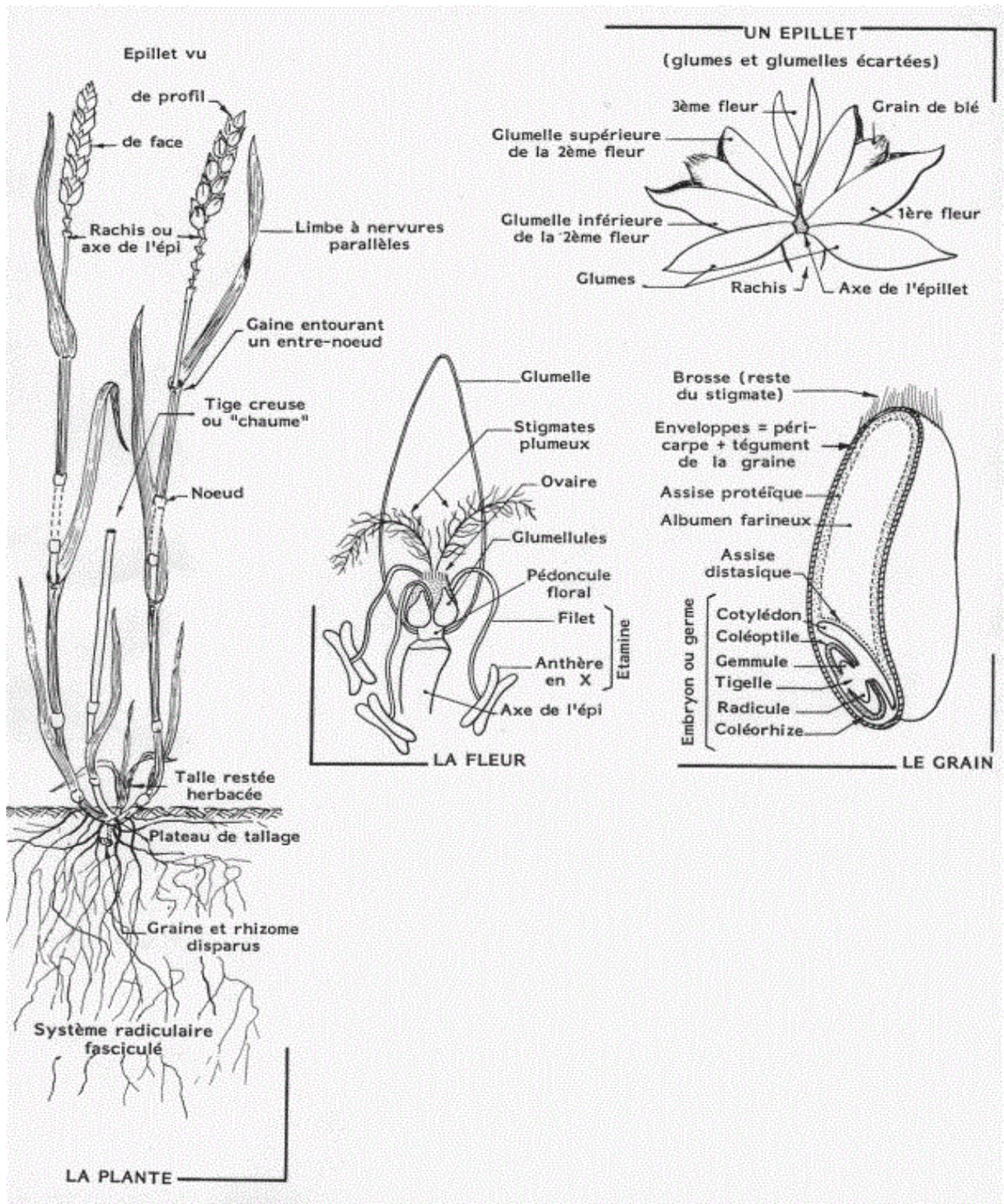


Figure 2 : Morphologie du blé dur (d'après Soltner, 1998).

La plante est constituée d'un système racinaire de type fasciculé et un système aérien formé de talles. Chaque talle est formée d'une tige feuillée ou chaume portant à son extrémité une inflorescence (l'épi) formée de 2 rangées d'épillets. L'épillet est une petite grappe de 2 à 5 fleurs enveloppées de leurs 2 glumelles. Les fleurs sont incluses dans 2 bractées ou glumes (inférieure et supérieure). Le grain, ou caryopse, est constitué d'une enveloppe, de tissus nourriciers (albumen, couche à aleurone) et renferme un embryon.

2. Le blé dur face à la sécheresse

Sur les hauts plateaux algériens, les performances des rendements de la culture du blé dur (*Triticum durum* Desf.) sont limitées par l'action des stress de nature abiotique, essentiellement la sécheresse (Benmahammed *et al.*, 2010). En effet, ces régions avec un climat méditerranéen se caractérisent par des précipitations variables, allant de 250 à 500 mm dont 70 % sont enregistrées pendant la saison froide d'Octobre à Février (Chennafi *et al.*, 2006) (Figure 3). L'insuffisance des précipitations au cours du cycle de développement de la plante associée à la succession des années de sécheresse, ont entraîné à la raréfaction des ressources en eau dans ces régions. Cela se traduit d'une année à l'autre par des variations importantes du rendement du grain, allant vers une défaillance des cultures ($4,0 \text{ t ha}^{-1}$) à différents sites et à différentes saisons de culture (Bahlouli *et al.*, 2005 ; Benmahammed *et al.*, 2010 ; Nouar *et al.*, 2012). De nombreux travaux ont été rapportés sur la réponse des variétés de blé dur cultivées en Algérie face à la sécheresse (Monneveux *et al.*, 2006 ; Hafsi *et al.*, 2008 ; Bousba *et al.*, 2009 et Bousba *et al.*, 2013) dans le but de sélectionner les génotypes à haut potentiel de rendement, associés à des traits phénologiques, physiologiques et moléculaires en corrélation avec la tolérance au stress hydrique.

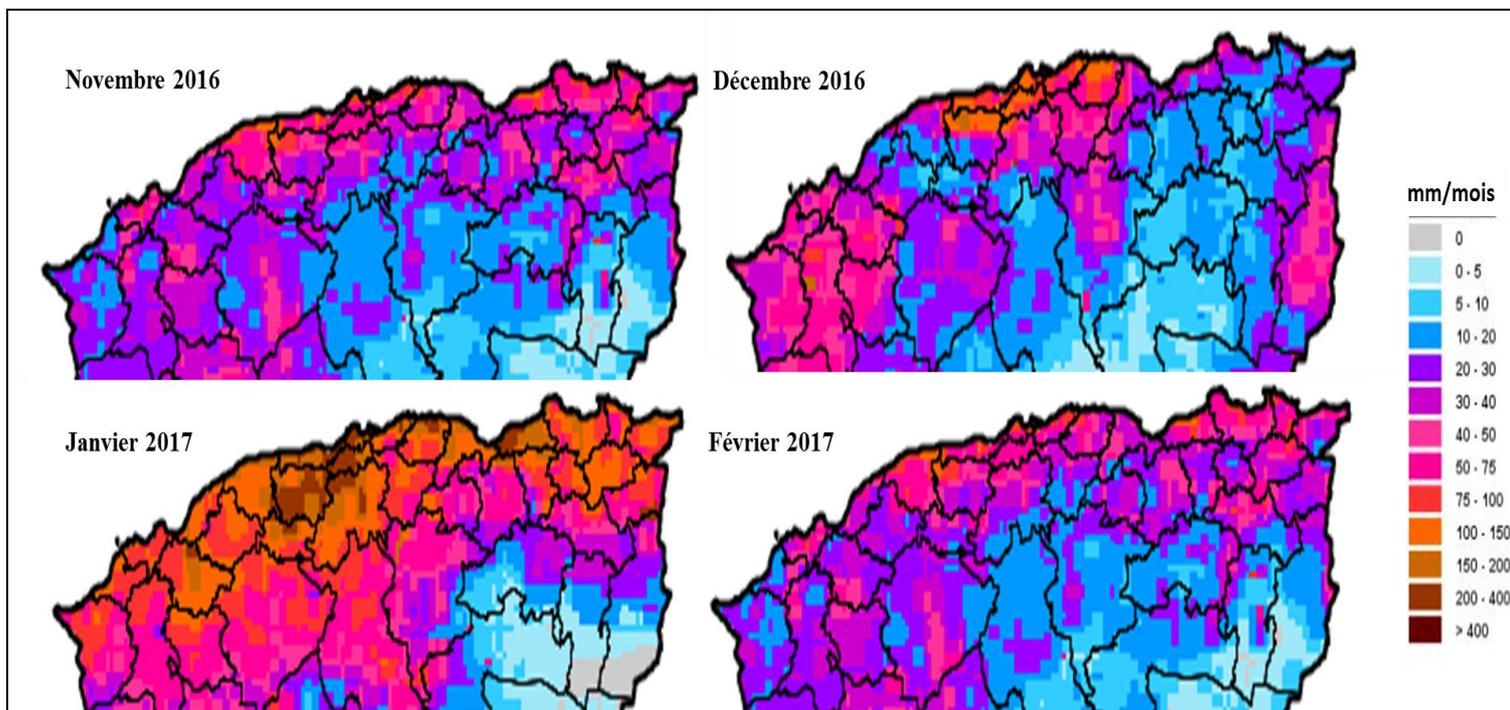


Figure 3 : Répartition des précipitations dans le nord de l'Algérie (Novembre 2016-Février 2017) (FAO, 2017)

L'amélioration de la production du blé dur doit nécessairement passer par la recherche de stratégies et de caractères d'adaptation qui permettent à la plante de tolérer le stress prévalant. En effet, la plante est dotée de mécanismes de tolérance au stress hydrique qui prennent place à différents niveaux de l'architecture de la plante, de la cellule à la plante entière, et sont les mêmes pour toutes les espèces végétales à des degrés variables. L'exploitation de cette diversité peut déboucher sur une meilleure adaptation au milieu associé et à la régularité des rendements (Adjabi, 2011). Ces mécanismes d'adaptation sont le résultat de nombreuses modifications phénologiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques qui interagissent pour permettre le maintien de la croissance, du développement et de la production de la plante. Les effets de leur mise en œuvre sur le rendement sont peu connus et l'amélioration génétique du rendement dans les milieux à fortes contraintes environnementales, reste largement empirique.

Selon le type de stratégie adoptée, on dit que les plantes s'échappent, évitent ou tolèrent le stress dû à la sécheresse, bien que celles-ci ne s'excluent pas mutuellement (Levitt, 1972). La réponse de la plante au stress hydrique dépendra de la stratégie intrinsèque de l'espèce, mais aussi de la durée et de la sévérité de la période du stress. Si le stress est prolongé dans une certaine mesure, il entraînera inévitablement à des dommages oxydatifs en raison de la surproduction de ce qu'on appelle les espèces réactives de l'oxygène. En effet, l'une des causes principales de la réduction de la croissance et de la capacité photosynthétique durant un stress hydrique sévère, est la rupture de l'équilibre entre la production des ROS et la défense antioxydante, entraînant à une accumulation des ROS qui se manifeste par des dommages oxydatifs au niveau des protéines, des lipides membranaires et autres composants cellulaires (Kabiri *et al.*, 2014). A la lumière de cette synthèse bibliographique, nous résumons l'état des connaissances actuelles sur les mécanismes d'induction du stress oxydatif par le déficit hydrique et le comportement de la plante vis-à-vis de l'environnement modifié et de l'accumulation des ROS.

3. Sècheresse et stress oxydatif chez les plantes

3.1. Le stress oxydatif

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), également appelées espèces actives de l'oxygène (AOS), sont le résultat de la réduction partielle de l'O₂ atmosphérique (Figure 4). Le terme « ROS » englobe les substances contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène actives mais ne sont pas nécessairement des radicaux (comme le H₂O₂ qui n'est pas un radical) (Cruz

de Carvalho, 2008). Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui existent indépendamment et contiennent des électrons non appariés, parmi lesquelles on peut trouver le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical perhydroxyle (HO_2^{\cdot}), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), le radical peroxyde (RO_2^{\cdot}) et le radical alkoxyde (RO^{\cdot}). Certains radicaux libres n'ont pas d'atomes d'oxygène (comme les métaux de transition ou les radicaux centrés sur le carbone). Les ROS favorisent le stress oxydatif par oxydation des composés cellulaires. Le terme « stress oxydatif » a plusieurs significations. Tout d'abord, c'est l'état physiologique où la perte des électrons (oxydation) dépasse la quantité des électrons acquise (réduction) entraînant des dommages chimiques oxydatifs des composés cellulaires. Le stress oxydatif est donc associé à un déséquilibre redox (réduction/oxydation) sévère et à long terme, dû au manque d'électrons. Deuxièmement, il s'agit d'un des facteurs de stress associé à plusieurs types de stress d'origine biotique ou abiotique, qui endommage les cellules et déclenche des réactions de signalisation et de défense. Ces deux définitions sont liées et peuvent être combinées (Demidchik, 2014).

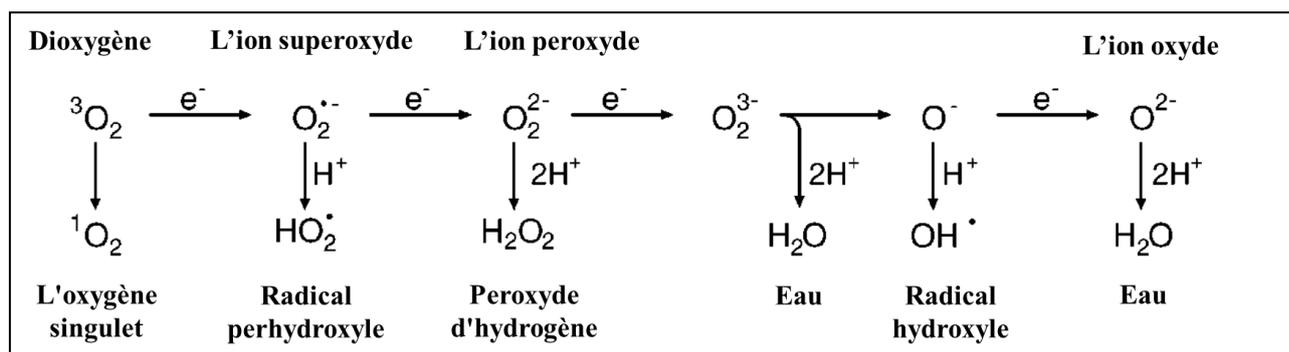


Figure 4 : Génération des ROS par transfert d'énergie ou réduction séquentielle univalente de l'oxygène triplet à l'état fondamental (d'après Appel et Hirt, 2004).

3.2. Génération des ROS durant le métabolisme cellulaire

Dans des conditions normales, les plantes produisent continuellement des ROS comme produits de diverses voies métaboliques, localisées dans différents compartiments cellulaires tels que les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes (Figure 5). Contrairement à l'oxygène singulet et au radical hydroxyle dont la production est maintenue à des niveaux minimaux (Jacob et Heber, 1996), le radical $O_2^{\cdot-}$ et l' H_2O_2 sont synthétisés à des vitesses très élevées dans des conditions normales (Noctor et Foyer, 1998).

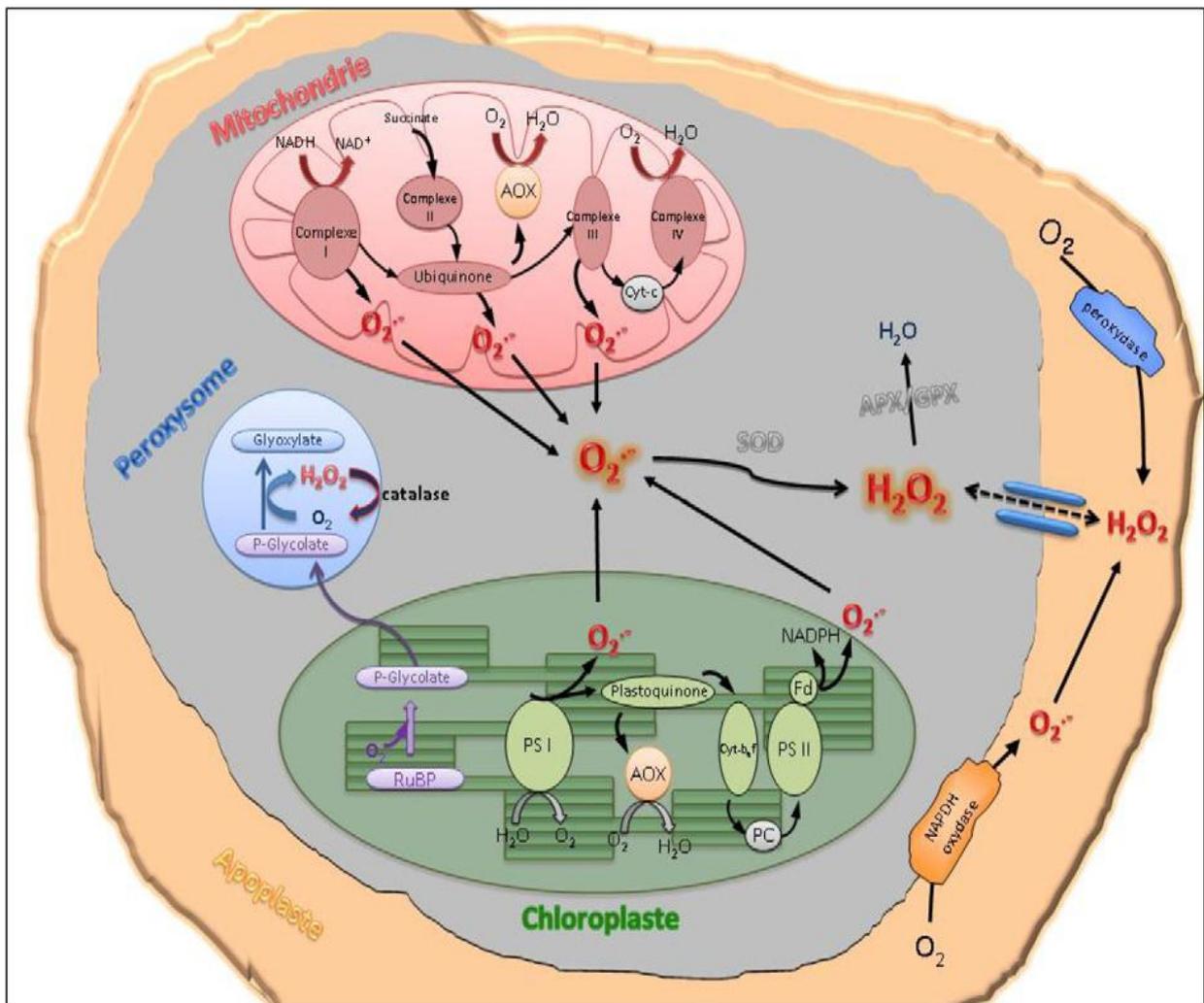


Figure 5 : Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale (d'après Parent *et al.*, 2008).

3.2.1. Formation des ROS dans les chloroplastes

L'un des principaux sites cellulaires responsables de la production de ROS est le chloroplaste (Foyer *et al.*, 1994). Il contient un système de membrane thylacoïde hautement organisé qui abrite tous les composants de l'appareil photosynthétique, fournissant toutes les propriétés structurales pour une récolte optimale de la lumière (Pfannschmidt, 2003).

Au cours de la photosynthèse, l'énergie de la lumière est captée et transférée à deux complexes collecteurs de lumière (photosystème II et photosystème I) dans la membrane thylacoïde des chloroplastes. Une succession de réactions d'oxydoréduction se produit dans la chaîne de transport des électrons à la lumière, jusqu'à ce que les électrons atteignent finalement le CO₂ dans la phase obscure (Baker, 1991). Cependant, il n'est pas rare que, par

ce biais, d'autres accepteurs finaux d'électrons soient utilisés, à savoir l'oxygène. En effet, L'oxygène généré dans les chloroplastes pendant la photosynthèse peut accepter des électrons traversant les photosystèmes, ce qui entraîne à la formation de l' $O_2^{\cdot -}$ et l' 1O_2 .

L'oxygène singlet (1O_2) peut être formé par le transfert d'énergie de la chlorophylle excitée à son état triplet ($^3Chl^*$) vers l' O_2 au niveau du PSII (Asada, 2006). D'autre part, les composants de la chaîne de transport des électrons thylacoïdales du côté de PSI, tels que les centres Fe-S et la thiorédoxine réduite sont auto-oxydables, entraînant à la réduction de l' O_2 (réaction de Mehler) (Figure 6), formant ainsi le superoxyde et l' H_2O_2 (Mehler, 1951 ; Asada, 2006). Il a été estimé qu'environ 10% des électrons photosynthétiques s'écoulent vers la réaction de Mehler. Cette "fuite" d'électrons vers l' O_2 avec la génération des ROS est en effet favorable à la chaîne de transport des électrons car elle maintient en équilibre les porteurs d'électrons et les rend ainsi plus efficaces (Noctor et Foyer, 1998).

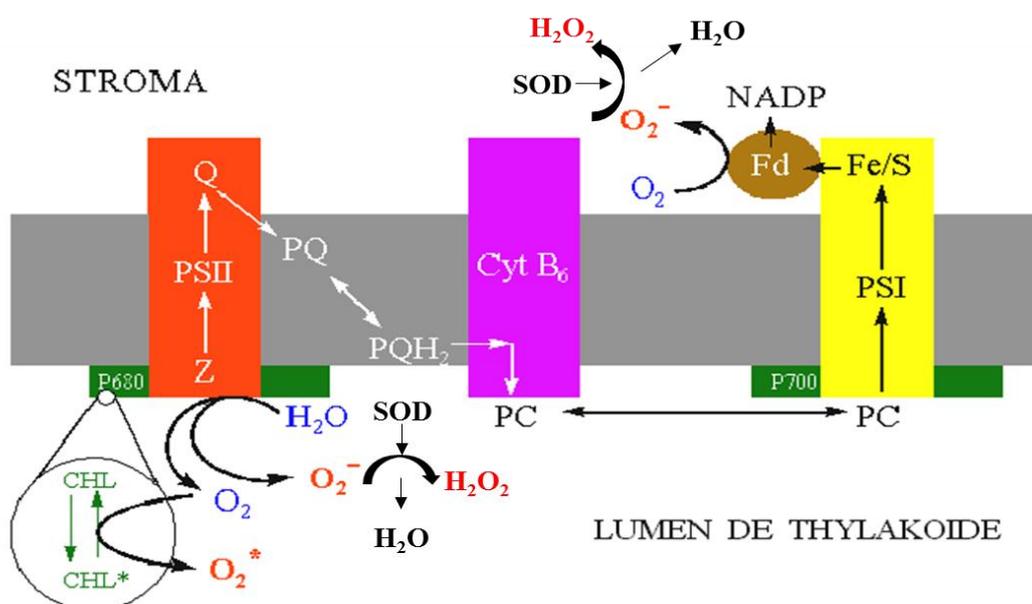


Figure 6: Représentation schématique du système de transport des électrons dans la membrane thylacoïde montrant 3 sites possibles de production des ROS (d'après Elstner, 1991).

CHL = molécule de chlorophylle. CHL* = molécule de chlorophylle à l'état excité. $O_2^{\cdot -}$ = oxygène singlet. P680 = chlorophylle du centre de PSII. Z = donneur primaire. Q = centre photochimique ouvert. PQ = plastoquinone. PQH_2 = plastoquinone réduite. PC = plastocyanine. Cyt B_6 = Cytochrome B_6 . P700 = chlorophylle du centre de PSI. Fe/S = complexe fer/soufre. Fd = ferrédoxine

3.2.2. Formation des ROS dans les mitochondries

La chaîne de transport des électrons mitochondriale est également responsable de la production des ROS dans des conditions normales, bien qu'elle soit bien minime par rapport

aux chloroplastes et peroxysomes (Foyer et Noctor, 2003). Il a été estimé qu'environ 1-2% de l'oxygène consommé, respiré par les mitochondries végétales, sera utilisé pour former du superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Turrens, 2003) et 1-5% pour la production de l' H_2O_2 (Møller, 2001). La génération de ces ROS est susceptible de se produire principalement dans les complexes respiratoires I et III de la chaîne de transport des électrons de la mitochondrie (Figure 7). En effet, le complexe III aussi appelé cytochrome bc1 oxydoréductase, utilise le pouvoir réducteur de la CoQ10 ou l'ubiquinol pour transférer des protons vers l'espace intermembranaire ; les électrons étant alors cédés au cytochrome c, menent à l'oxydation de l'ubiquinol et la formation du superoxyde (Berry *et al.*, 2000). D'autre part, la formation du superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est due également aux propriétés de la forme réduite du cofacteur flavinique (FMN) qui est l'un des constituants du complexe I (NADH déshydrogénase). Ce site a une double fonction catalytique : la réduction de l'ubiquinone (UQ) par le NADH et le transfert des protons (Figure 7).

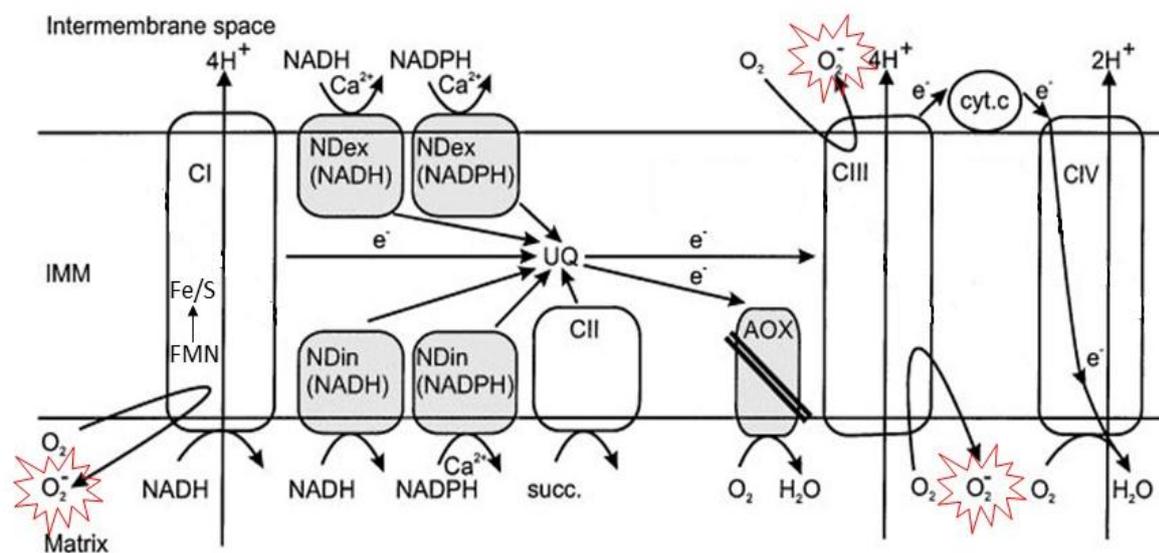


Figure 7 : Représentation schématique de la chaîne de transport des électrons dans la membrane interne des mitochondries végétales (d'après Møller, 2001)

Les enzymes spécifiques aux mitochondries végétales sont indiquées en gris [NAD(P)H = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate déshydrogénase. AOX = Oxydase alternative]. Sont indiqués aussi les 4 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CI, CII, CIII, CIV) ainsi que la production des ROS au niveau des deux sites principaux CI et CIII. [CI = Complexe I (NADH déshydrogénase). CII = Complexe II (succinate déshydrogénase). CIII = Complexe III (cytochrome bc1 oxydoréductase). CIV = Complexe IV (cytochrome c oxydase)]. FMN = flavine mononucléotide. Fe/S = complexe fer/soufre. UQ = Ubiquinone. cyt.c = cytochrome c.

3.2.3. Formation des ROS dans les peroxysomes

Les peroxysomes sont des organelles subcellulaires avec une bicouche lipidique et un métabolisme extrêmement oxydatif, faisant partie des sites intracellulaires majeurs de la production des ROS (Gill et Tuteja, 2010). Comme les mitochondries et les chloroplastes, les peroxysomes produisent des radicaux superoxydes comme conséquence de leur métabolisme normal. Deux sites de production de superoxyde ont été identifiés (del Río *et al.*, 2006). Le premier est dans la matrice du peroxysome, où la xanthine oxydase (XOD) catalyse l'oxydation de la xanthine et de l'hypoxanthine en acide urique. Le deuxième site est situé dans les membranes des peroxysomes dépendant de la NAD(P)H, où une petite chaîne de transport des électrons composée de polypeptides membranaires peroxysomales intégrales (PMP) dont la cytochrome b et les MDAR, qui génèrent du radical superoxyde (Figure 8). Les principaux processus métaboliques responsables de la production de l' H_2O_2 dans les peroxysomes sont la réaction de la β -oxydation des acides gras, la réaction enzymatique des flavines oxydases et la dismutation des radicaux $\text{O}_2^{\cdot-}$.

Au cours de la photosynthèse, il existe une autre voie appelée la photorespiration, qui peut également générer le peroxyde d'hydrogène (Figure 5). En effet, la rubisco, l'enzyme qui catalyse la carboxylation du ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) lors de l'assimilation du carbone, peut également utiliser l' O_2 pour oxygéner la RuBP. Cette réaction donne du phosphoglycolate qui est ensuite transporté des chloroplastes aux peroxysomes où il sera oxydé par la glycolate oxydase produisant ainsi de l' H_2O_2 (Wingler *et al.*, 2000).

3.2.4. Autres sources génératrices des ROS

D'autres sources importantes de la production des ROS dans les plantes qui ont reçu peu d'attention, sont les réactions de détoxification catalysées par le cytochrome P450 dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique (Figure 9). Les ROS sont également générés au niveau de la membrane plasmique et dans les apoplastes de la cellule végétale (voir la figure 5). Les peroxydases dépendantes du pH de la paroi cellulaire, les oxalate oxydases et les amine oxydases ont été proposés comme source d' H_2O_2 dans les apoplastes de la cellule végétale (Bolwell et Wojtaszek, 1997). Les peroxydases dépendantes du pH de la paroi cellulaire sont activées par un pH alcalin qui, en présence d'un réducteur, produisent de l' H_2O_2 . L'alcalinisation des apoplastes et la production des H_2O_2 par les peroxydases pariétales ont été proposées comme une voie alternative dans la production des ROS durant un stress biotique (Bolwell et Wojtaszek, 1997).

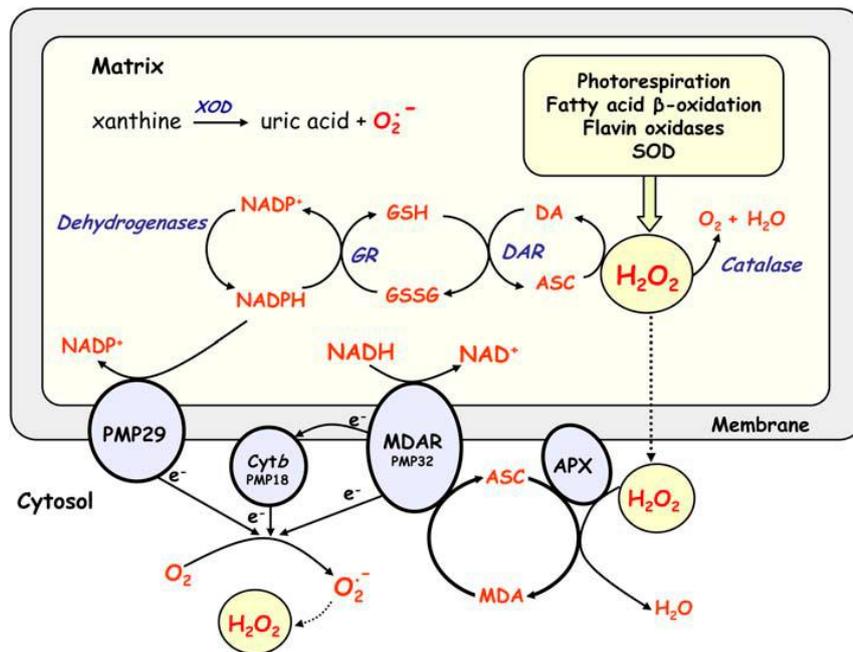


Figure 8 : Représentation schématique de la synthèse des ROS dans les peroxysomes (del Río *et al.*, 2006).
 ASC = Ascorbate (forme réduite). DA = déhydroascorbate (forme oxydée). DAR = déhydroascorbate réductase. GSH = glutathion (forme réduite). GSSG = glutathion (forme oxydée). GR = glutathion réductase. XOD = xanthine oxydase. MDA = monodéhydroascorbate. MDAR = monodéhydroascorbate réductase. APX = Ascorbate peroxydase. Cyt b = Cytochrome b. PMP = polypeptides membranaires peroxysomales intégrales.

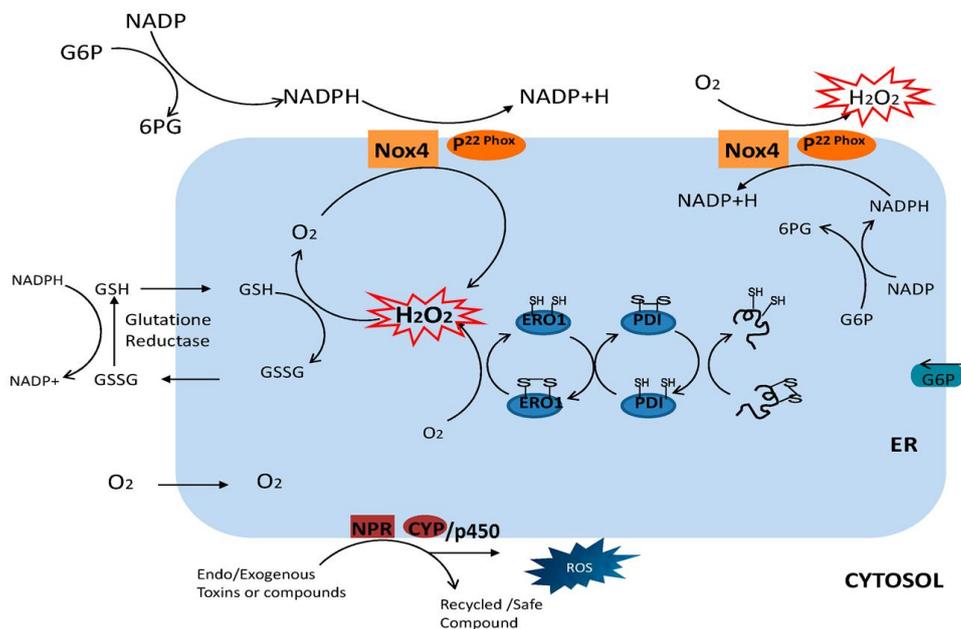


Figure 9 : Représentation schématique de la production des ROS dans le réticulum endoplasmique (ER) (Zeeshan *et al.*, 2016)

La production des ROS est assurée au cours du repliement des protéines par la NADPH oxydase 4 (Nox4), la NADPH-P450 réductase (NPR), la topologie de la GSH ainsi que les mécanismes de détoxification par le cytochrome P450 (CYP/450). NADPH = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate déshydrogénase. G6P = Glucose 6-phosphate. 6PG = 6-Phospho gluconate. GSH = glutathion (forme réduite). GSSG = glutathion (forme oxydée). Ero1 = ER oxidoreductin 1. PDI = protéine disulfure isomérase.

3.3. Mécanisme du stress oxydatif dans la plante

Les plantes sont immobiles, et donc incapables d'échapper aux modifications de l'environnement. Le climat peut être affecté par de nombreux facteurs tels que la sécheresse, la salinité, le froid et les températures élevées. Ces conditions défavorables, mais pas toujours létales, sont généralement connues sous le nom de stress, qui peut retarder la croissance et le développement, réduire la productivité et, dans les cas extrêmes, provoquer la mort des plantes souvent dû à l'accumulation des formes réactives de l'oxygène (ROS) (Mattos et Moretti, 2015). En effet, la production des formes réactives de l'oxygène est une réponse cellulaire commune à de nombreux stress chez les végétaux (Figure 10) qui se localise au niveau de différentes sources, notamment les membranes cellulaires, entraînant des dommages oxydatifs irréversibles (Wang *et al.*, 2003 ; Parent *et al.*, 2008).

3.3.1. Perception du stress et signalisation cellulaire par les ROS

Il existe un équilibre fragile entre la production des ROS et le système antioxydant qui définit le niveau normal intracellulaire des ROS et le maintient à l'état d'équilibre. En conditions de stress hydrique, cet équilibre va être perturbé par l'augmentation excessive des ROS, en raison de la fermeture des stomates et la limitation concomitante de la fixation du CO₂. Au lieu d'avoir un effet délétère immédiat, cette augmentation de la production des ROS est susceptible d'être bénéfique pour la plante si elle reste néanmoins sous contrôle strict. En effet, l'augmentation de la production des ROS est perçue par la plante comme un signal d'alarme qui déclenche des voies de défense et des réponses acclimatées, permettant à la plante de s'adapter à l'environnement changeant. De nombreux rapports mettent en évidence le rôle des ROS dans la signalisation cellulaire en situation de stress (Dat *et al.*, 2000 ; Mittler, 2002 ; Vranová *et al.*, 2002 ; Verslues et Zhu, 2005). D'après Wang *et al.*, (2003), les ROS interviennent dans les cascades de signalisation responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défenses (protéines chaperonnes : HSP, enzymes antioxydantes : APX, SOD, GSH, les aquaporines, les sucres simples, etc.) (Figure 10).

3.3.1.1. L'H₂O₂ comme second messenger

Le candidat ROS le plus susceptible d'agir comme un messenger secondaire dans une voie de transduction du signal en réponse à un stress est l'H₂O₂. Il est non seulement le ROS le plus stable avec une capacité de diffuser facilement d'un compartiment cellulaire à un autre, mais il peut aussi être facilement métabolisé par un système antioxydant cellulaire efficace (Gill et Tuteja, 2010).

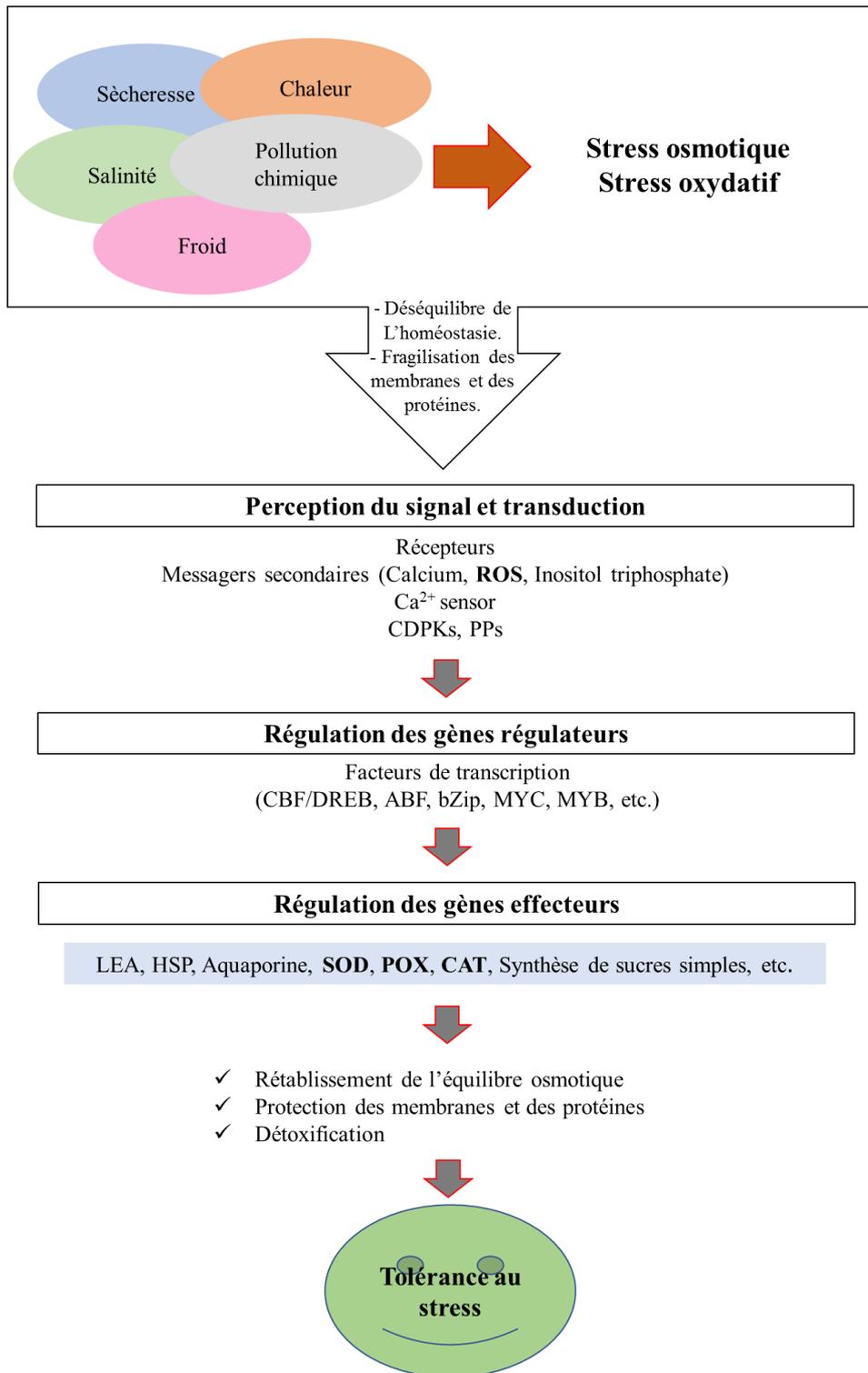


Figure 10 : Schéma général de la réponse des plantes aux stress abiotiques (Adapté de Wang *et al.*, 2003).
 La sécheresse, la salinité et le froid induisent un stress osmotique et un stress oxydatif qui entraînent un déséquilibre de l'homéostasie et une fragilisation des membranes et des protéines. La perception puis la transduction du signal aboutissent à l'expression de gènes régulateurs qui eux-mêmes contrôlent les gènes effecteurs permettant la mise en place des mécanismes de tolérance aux stress. ROS = Reactive Oxygen Species, CDPK = Calcium Dependent Protein Kinase. PP = Phosphatase Protein. CBF = Crepeat Binding Factor. DREB = DRE Binding factor. ABF = ABRE Binding Factor. LEA = Late Embryogenesis-Abundant. HSP = Heat Shock Protein. SOD = Superoxyde Dismutase. POX = peroxydase. CAT = Catalase

Comme il est produit à des taux élevés sous conditions de stress hydrique, une diminution de sa concentration par l'action du système antioxydant permet l'activation et la désactivation rapide du signal, une condition essentielle pour qu'un messager secondaire soit efficace. D'autre part, cette espèce active d'oxygène a une grande affinité avec les groupements thiol protéiques, ce qui suggère son rôle possible en tant que modulateur de la conformation des protéines et/ou des activités biochimiques. En outre, le statut thiol intracellulaire est considéré comme l'un des mécanismes qui permettent la détection des ROS (Foyer et Noctor, 2005).

La spécificité de la signalisation cellulaire de l' H_2O_2 peut être déterminée par son site de production, de contrôle et de transduction (Foyer et Noctor, 2003). Par conséquent, les différents compartiments cellulaires végétaux vont influencer différemment le réglage de la signalisation redox cellulaire sous conditions de stress hydrique. Bien que le taux de production de l' H_2O_2 soit plus rapide dans les peroxysomes et les chloroplastes, les mitochondries sont les organites les plus vulnérables aux dommages oxydatifs (Bartoli *et al.*, 2004). Ceci peut s'expliquer par une quantité d'antioxydants inférieure dans les mitochondries par rapport aux autres organites. Dans ce sens, les mitochondries jouent un rôle crucial dans la mise en place de l'état redox cellulaire et l'initiation des cascades de transduction du signal en conditions de déficit hydrique.

L' H_2O_2 module la mobilisation du Ca^{2+} , la phosphorylation des protéines et l'expression des gènes (Figure 11, Neill *et al.*, 2002). Des changements dans le taux de calcium libre cytosolique ont été rapportés dans de nombreuses voies de transduction du signal biotiques et abiotiques (Sanders *et al.*, 2002). Il a été montré que les ROS induisent une augmentation du Ca^{2+} cytosolique par l'activation des canaux hyperpolarisés perméables aux ions Ca^{2+} dans la membrane plasmique des cellules de garde d'*Arabidopsis* (Pei *et al.*, 2000). D'un autre côté, plusieurs rapports ont montré que l' H_2O_2 induit l'activation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases ou les MAP kinases), qui sont à leur tour impliqués dans plusieurs cascades de transduction des signaux qui modulent l'expression des gènes de réponse au stress (Desikan *et al.*, 1999 ; Samuel *et al.*, 2000). La voie de signalisation de l' H_2O_2 en réponse au stress hydrique favorise également l'accumulation de plusieurs protecteurs cellulaires qui peuvent agir directement ou indirectement dans la régulation de l'état redox cellulaire comme les antioxydants enzymatiques (Cruz de Carvalho, 2008). Elle est aussi à l'origine de l'induction des gènes impliqués dans les mécanismes de réparation et de protection de la cellule

(protéines réparatrices de l'ADN et les protéines LEA) ou dans la voie de transduction du signal en réponse au stress oxydatif (sérine / thréonine protéine kinase).

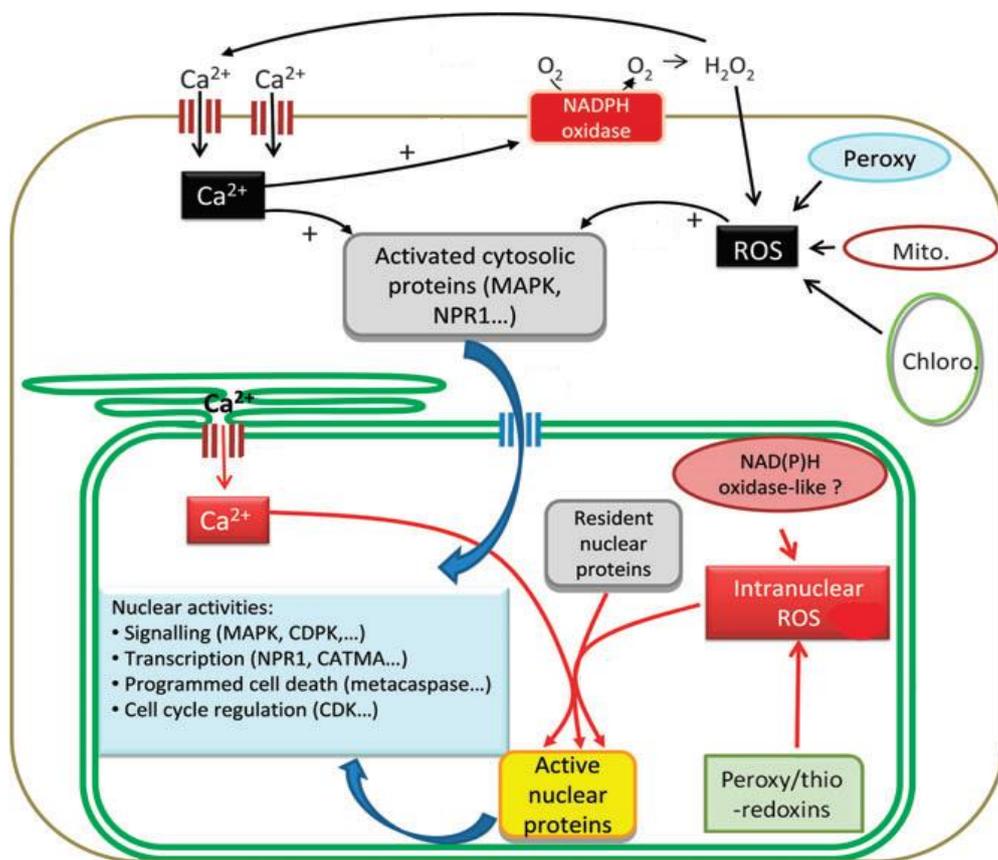


Figure 11 : Schéma général illustrant comment les ROS et le Ca^{2+} peuvent moduler les activités nucléaires en contrôlant les activités et/ou la localisation des protéines cibles (Adapté de Mazars *et al.*, 2010).

3.3.1.2. Signalisation cellulaire de l'ABA et des ROS

Il semble y avoir une relation assez complexe entre l'hormone ABA et les ROS. En conditions de stress hydrique, la plante accumule l'ABA ce qui va déclencher en aval une série de réponses qui vont lui permettre de s'adapter à la situation de stress, comme la fermeture des stomates (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Cependant, plusieurs études ont montré que la réponse au stress hydrique ABA-dépendante ne peut être élicitée par l'ABA seul (Verslues et Zhu, 2005 ; Verslues et Bray, 2006). En effet, le stress hydrique induit de nombreux changements physiologiques et biochimiques qui altèrent le statut métabolique de la plante, ce qui pourrait influencer la susceptibilité cellulaire à l'accumulation de l'ABA. Un de ces changements importants est la modification du statut redox de la plante

par une augmentation de la production des ROS (Foyer et Noctor, 2005) qui ont été suggérés comme étant le lien entre le statut métabolique de la plante et la voie de signalisation ABA-dépendante et qui agissent en aval de l'ABA modulant la voie de transduction du signal ABA-dépendante (Figure 12). En outre, la voie de signalisation des ROS en cas de stress hydrique, agit non seulement en aval de la fermeture des stomates, mais aussi en amont dans le réseau de signalisation de l'ABA.

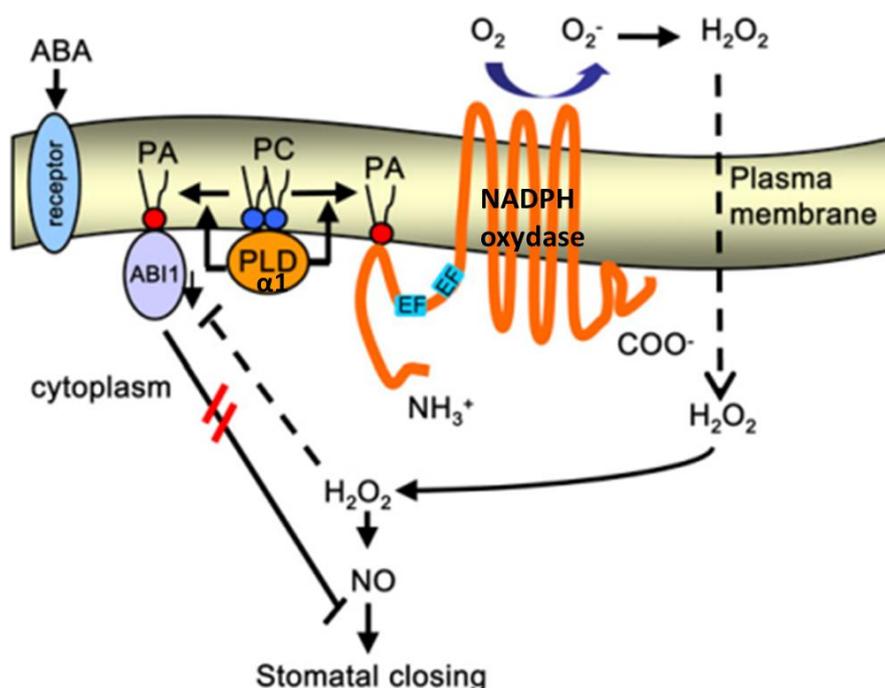


Figure 12 : Un modèle proposé pour le rôle des ROS dans la voie de signalisation de l'ABA (Adapté de Zhang *et al.*, 2009)

L'ABA stimule l'activité de la PLD α 1 probablement par l'intermédiaire d'un récepteur de l'ABA. Le PA, messenger lipidique produit par l'activation de la PLD α 1 se lie à la NADPH oxydase dans la région cytosolique de l'extrémité N-terminale. L'activation de la NADPH oxydase par la liaison PA entraîne la production des ROS (y compris l' H_2O_2). L'interaction PA-ABI1 altère l'inhibition d'ABI1 de la signalisation de l' H_2O_2 et du NO. ABA = Acide abscissique. PLD α 1 = Phospholipase D α 1. PA = Acide phosphatidique. PC = phosphatidylcholine. ABI = Protéine phosphatase 2C. NADPH = Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate déshydrogénase. NO = oxyde nitrique.

3.3.1.3. Les sucres et la signalisation cellulaire des ROS

Les sucres, et plus précisément les sucres solubles tels que le glucose et le saccharose, semblent jouer un double rôle en favorisant la production des ROS ou en participant indirectement aux mécanismes d'élimination des ROS par les voies génératrices de NADPH, telles que la voie oxydative pentose-phosphate. L'activité de photosynthèse conduit à

l'accumulation des ROS par la réaction de Mehler mais aussi des sucres (Cruz de Carvalho, 2008). De plus, il a été montré que les sucres sont impliqués dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes liés à la photosynthèse, ainsi que dans certains gènes liés aux ROS tels que la superoxyde dismutase (Couée *et al.*, 2006 ; Sulmon *et al.*, 2006). Par conséquent, il a été suggéré que les sucres solubles pourraient fonctionner comme des signaux utiles pour la plante dans la détection et le contrôle non seulement de l'activité photosynthétique, mais aussi de l'équilibre redox cellulaire (Couée *et al.*, 2006). La connexion entre le mécanisme des sucres et la signalisation des ROS est cependant extrêmement complexe et semble impliquer également la signalisation de l'ABA, au moins dans certaines voies spécifiques.

3.3.2. La sécheresse augmente la production des ROS

Le premier organe de la plante à détecter une limitation de l'approvisionnement en eau est le système racinaire. Il a été démontré qu'en plus de l'eau et des minéraux, les racines envoient des signaux aux feuilles à travers la sève du xylème et la phytohormone ABA est considérée comme l'un des principaux signaux de stress de la racine à la tige (Jiang et Hartung, 2008). Lorsque le signal de stress atteint les feuilles, il déclenche la fermeture des stomates et la plante passe à une stratégie d'économie d'eau. Ainsi, en ajustant l'ouverture des stomates, les plantes sont capables de contrôler la perte d'eau en réduisant le flux de transpiration, mais elles limitent concomitamment l'entrée du dioxyde de carbone (CO₂) (Figure 13). Cela aura des effets directs et indirects sur la réduction de la photosynthèse nette et sur la production globale des ROS par les plantes soumises à un stress hydrique (Mittler, 2002). Plusieurs études ont rapporté l'augmentation de l'accumulation des ROS et du stress oxydatif sous stress hydrique (Sgherri *et al.*, 1993 ; Boo et Jung, 1999 ; Chakraborty et Pradhan, 2012). Selon Parent *et al.*, (2008), cette augmentation de la quantité des ROS a lieu de plusieurs façons et à différents endroits de la cellule. Par exemple, la limitation de la fixation du CO₂ au niveau des chloroplastes, réduira la régénération du NADP⁺ à travers le cycle de Calvin, provoquant ainsi une réduction excessive de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques et les électrons qui ne participent plus à la fixation du CO₂ vont entraîner la production et l'accumulation des ROS. En effet, lors de la photosynthèse et sous stress hydrique, il y a une fuite plus élevée des électrons vers l'O₂ par la réaction de Mehler (Smirnoff, 1993). L'accroissement de la production des ROS sous stress hydrique est également observé dans la voie de la photorespiration (Noctor *et al.*, 2002). Durant les conditions de photoinhibition, la carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) est inhibée, favorisant son oxygénation et entraînant la production de phosphoglycolate et par la

suite du H_2O_2 dans les peroxysomes (Figure 13). La prédominance de la photorespiration sur la charge oxydative sous stress hydrique a été récemment mise en avant. Noctor *et al.*, (2002), ont estimé que la photorespiration est susceptible de représenter plus de 70% de la production totale de l' H_2O_2 dans des conditions de stress hydrique.

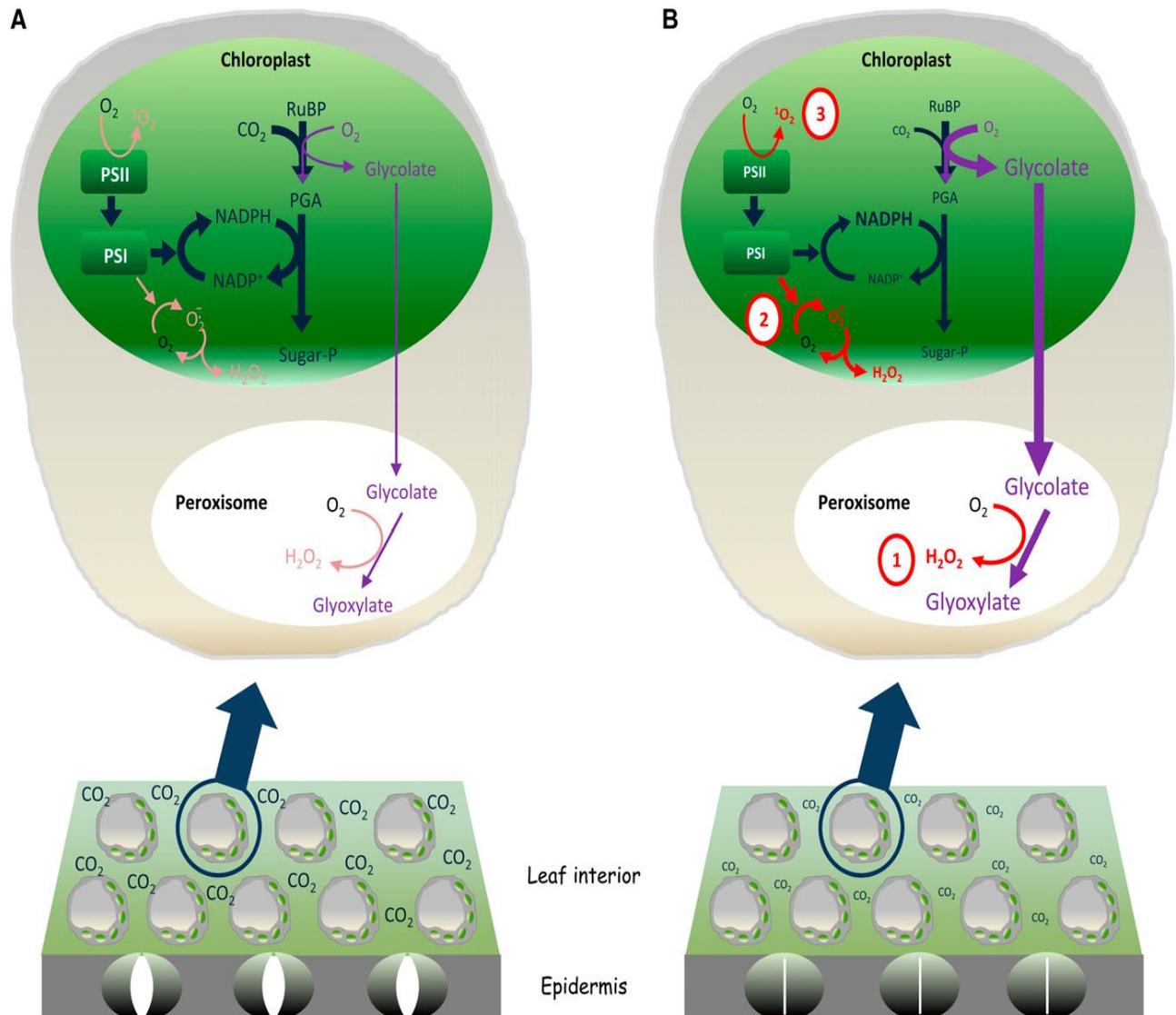


Figure 13 : Concept de la façon dont la sécheresse augmente la génération des ROS durant la photosynthèse (Adapté de Noctor *et al.*, 2014)

A, la plante est bien arrosée dans laquelle des concentrations relativement élevées en CO_2 intercellulaire permettent une régénération équilibrée des oxydants terminaux et limitent l'oxygénation de RuBP. **B**, la fermeture stomatique induite par la sécheresse limite l'absorption du CO_2 , favorisant la production photorespiratoire de l' H_2O_2 dans le peroxysome (1) et éventuellement la production du superoxyde et de l' H_2O_2 (2) ou de l'oxygène singlet (3) par la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. PGA = acide 3-phosphoglycérique.

Comme précédemment mentionné, la chaîne de transport des électrons mitochondriale est une autre source possible de la production du superoxyde et de l' H_2O_2 . Cependant, la contribution de la mitochondrie à la production des ROS lors de la réponse au stress hydrique reste encore mal définie. Noctor *et al.*, (2014), suggèrent qu'au cours des conditions de stress, la photorespiration pourrait augmenter la pression des électrons de la chaîne mitochondriale due à la production excessive du glycolate, favorisant ainsi la production des ROS au niveau des mitochondries. Selon Pastore *et al.*, (2007), La mitochondrie produit généralement des ROS dans des conditions normales, mais elle est fortement boostée en conditions de stress hydrique. De telles conditions affectent le couplage étroit de la chaîne de transport des électrons et de la synthèse de l'ATP, conduisant à une réduction excessive des transporteurs d'électrons comme le pool d'ubiquinone, générant ainsi des ROS (Rhoads *et al.*, 2006 ; Blokhina et Fagerstedt, 2010). D'autre part, la fréquence respiratoire de la cellule augmente durant le stress hydrique, ce qui va augmenter la production de la synthèse de l'ATP mitochondrial afin de compenser la baisse du taux de synthèse de l'ATP chloroplastique, conduisant ainsi à une accumulation des ROS (Atkin et Macherel, 2009).

3.4. Toxicité des ROS

La production et l'élimination des ROS doivent être strictement contrôlées afin d'éviter le stress oxydatif. Un niveau accru de ROS peut endommager des biomolécules en interagissant avec elles, telles que les lipides, les protéines et l'ADN (Møller *et al.*, 2007 ; Farmer et Mueller, 2013). Ces réactions peuvent altérer les propriétés intrinsèques de la membrane telles que la fluidité, le transport des ions, la perte d'activités enzymatiques, la réticulation des protéines, l'inhibition de la synthèse des protéines, des dommages au niveau de l'ADN entraînant à des pertes de certaines activités physiologiques, voir la mort de la plante.

3.4.1. Oxydation des lipides

Lorsque le niveau des ROS atteint un certain seuil, où il dépasse celui des mécanismes de défense, une peroxydation lipidique accrue se produit au niveau des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et celle des organites. Ceci affecte non seulement le fonctionnement cellulaire normal, mais aussi aggrave le stress oxydatif par la production de radicaux dérivés des lipides (Sharma *et al.*, 2012). Les dommages membranaires sont parfois pris comme un paramètre unique pour déterminer le niveau de destruction des lipides sous diverses contraintes. L'augmentation de la peroxydation des lipides a été rapporté chez des

plantes poussant sous des stress environnementaux (Sharma et Dubey, 2005 ; Han *et al.*, 2009 ; Tanou *et al.*, 2009). Maintenant, il a été reconnu que pendant la peroxydation lipidique, des produits sont formés à partir de précurseurs polyinsaturés qui comprennent de petits fragments d'hydrocarbures tels que des cétones, le MDA et des composés qui leur sont associés (Garg et Manchanda, 2009). Certains de ces composés réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former des produits colorés appelés substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS). Le processus global de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés implique 3 étapes distinctes : initiation, propagation et terminaison (Farmer et Mueller, 2013) (Figure 14). L'initiation de la peroxydation lipidique est déclenchée par l'attaque d'un acide gras polyinsaturé (RH) par un atome d'hydrogène du radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$), conduisant à la formation d'un radical lipidique ($\text{R}\bullet$). Dans un milieu aérobie, l'oxygène va s'ajouter à l'acide gras au centre du radical lipidique pour donner naissance à un radical lipoperhydroxyle ($\text{ROO}\bullet$). Ce radical réagit avec un autre RH et engendre la formation d'un hydroxyperoxyde lipidique (ROOH) et d'un nouveau radical lipidique, assurant ainsi la propagation du processus. Le ROOH peut facilement se décomposer en plusieurs espèces réactives comprenant : des radicaux alcoyles lipidiques, des aldéhydes (malonyldialdéhyde), des alcanes, des époxydes lipidiques et des alcools (Davies, 2000). Un seul événement d'initiation a donc le potentiel de générer de multiples molécules de peroxyde par une réaction en chaîne. La terminaison de ce cycle est effective lorsque deux formes lipidiques radicalaires réagissent ensemble pour former deux composés stables.

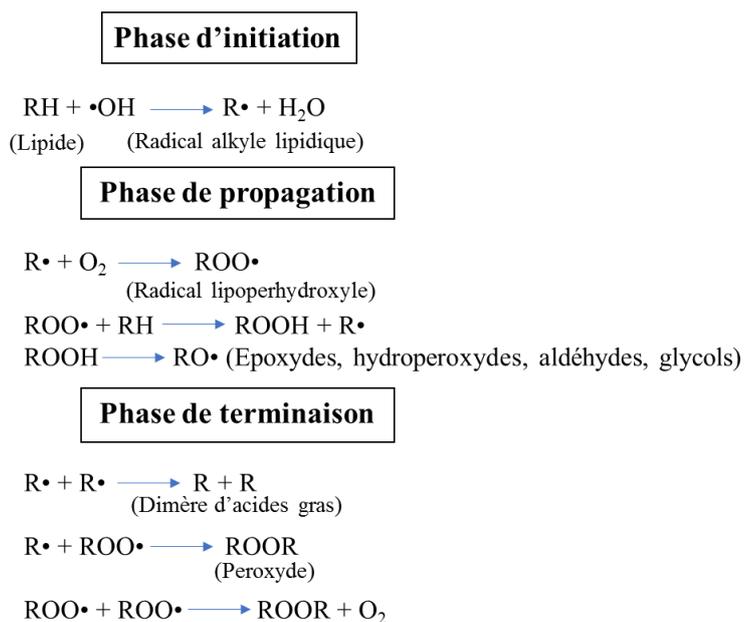


Figure 14 : Mécanisme de la peroxydation des acides gras (Gill et Tuteja, 2010)

Les effets globaux de la peroxydation lipidique sont la perturbation de la fluidité membranaire, augmentation de la perméabilité de la membrane à des substances qui ne la traversent normalement que par des canaux spécifiques, endommagement des protéines membranaires et inactivation des récepteurs, des enzymes et des canaux ioniques (Farmer et Mueller, 2013). L'altération des membranes thylakoïdales et chloroplastiques entraîne des perturbations au niveau de la chaîne de transport des électrons, conduisant à une augmentation de la production des ROS dans ces zones et amplifiant ainsi le stress oxydatif.

3.4.2. Oxydation des protéines

Les ROS produites durant les conditions de stress provoquent une oxydation des protéines. La protéine subit alors des modifications qui peuvent être directes ou indirectes (Das et Roychoudhury, 2014). Lors des modifications directes, l'activité de la protéine varie en fonction des différentes modifications chimiques comme la nitrosylation, la carboxylation, la formation de liaisons disulfure et la glutathionylation. La carbonylation des protéines est souvent utilisée comme marqueur pour l'évaluation de l'oxydation des protéines (Møller *et al.*, 2007). Les modifications indirectes sont le résultat de l'interaction des protéines avec les produits de la peroxydation lipidiques. Une surproduction des ROS peut conduire à la fragmentation de la chaîne peptidique, l'altération de la charge électrique des protéines, la réticulation des protéines et l'oxydation des acides aminés spécifiques et ainsi conduire à une susceptibilité accrue à la protéolyse suite à une dégradation par des protéases spécifiques (Kelly et Mudway, 2003). Les acides aminés contenant des groupements thiols et le soufre sont les plus vulnérables. La cystéine et la méthionine sont tous deux susceptibles d'être endommagés par les radicaux $^1\text{O}_2$ et $\bullet\text{OH}$ (Das et Roychoudhury, 2014). Leur oxydation provoque des changements conformationnels, le dépliement des protéines et la dégradation. Les enzymes qui ont des métaux sur ou près de leurs sites actifs sont particulièrement sensibles à l'oxydation catalysée par des métaux de transition ou par $\text{l'O}_2^{\bullet-}$ (Stadtman, 1990 ; Das et Roychoudhury, 2014). Il a été démontré que la modification oxydative des enzymes inhibe leurs activités. Une telle modification de cette composante organique clé de la vie, entraîne la perte d'une fonction médiée par les protéines, comme les activités métaboliques, structurelles, de transport ou de régulation. L'oxydation des protéines entraîne également à une accumulation d'agrégats de protéines toxiques et, dans le cas de lésions sévères, induit une mort cellulaire programmée (PCD : *Programmed Cell Death*) (Demidchik *et al.*, 2010 ; Avery, 2011).

3.4.3. Oxydation des acides nucléiques

Puisque l'ADN nucléaire de la plante est bien protégé par les histones et les protéines associées, ce sont les ADN mitochondriaux et chloroplastiques qui subissent le poids de l'attaque des ROS en raison du manque d'histones protecteurs ainsi que de la proximité des machines de production des ROS (Das et Roychoudhury, 2014). Les dommages oxydatifs de l'ADN se produisent à plusieurs niveaux et comprennent l'oxydation des résidus du sucre désoxyribose, la modification des bases nucléotidiques, l'abstraction d'un nucléotide et les ruptures dans l'ADN simple et double brin (Figure 15). Le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) endommage non seulement le squelette du sucre désoxyribose en extrayant l'atome H, mais réagit également avec les doubles liaisons des bases purines et pyrimidines (Halliwell, 2006). L' $\bullet\text{OH}$ est également connu pour créer des réticulations des protéines de l'ADN quand il réagit avec l'ADN ou les protéines associées. Ces réticulations ne sont pas facilement réparables et peuvent être létales pour la cellule végétale (Das et Roychoudhury, 2014). La 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxo-G) et la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (Fapy-G) sont des produits fréquemment détectés dans l'oxydation de l'ADN / ARN induite par le radical hydroxyle (Wang *et al.*, 2010 ; Yoshiyama *et al.*, 2013) (Figure 15).

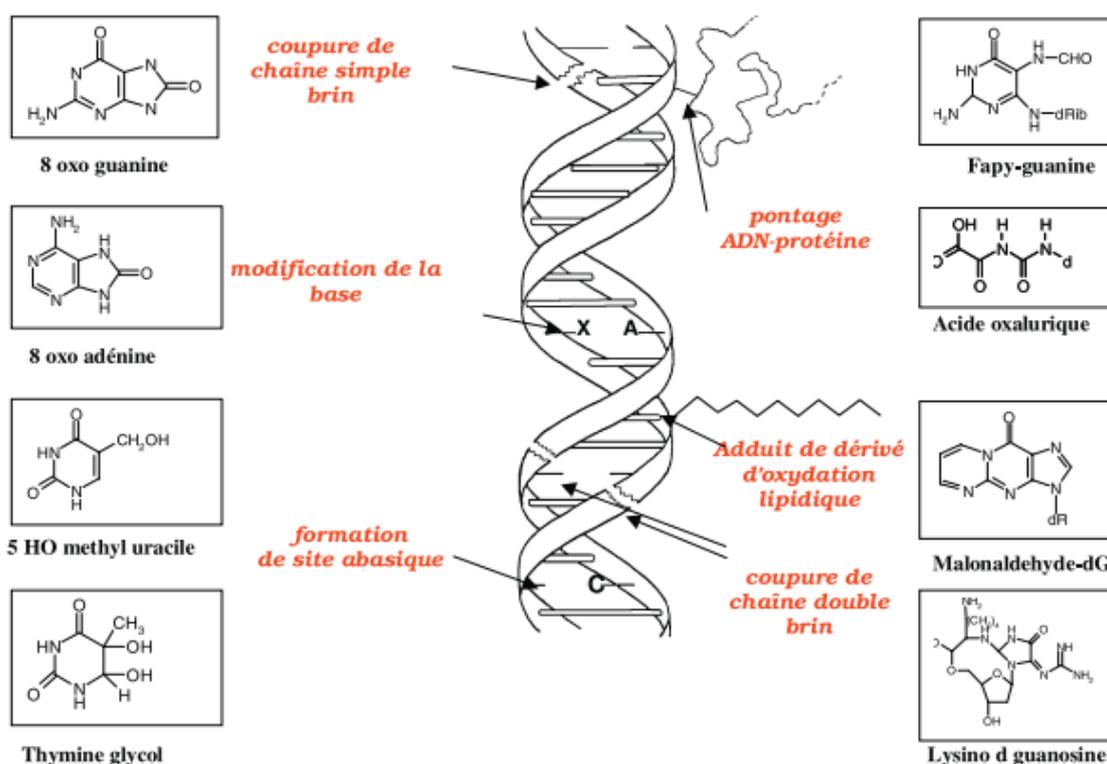


Figure 15 : Lésions de l'ADN et produits formés par l'attaque des ROS (Favier, 2003)

L'oxydation des acides nucléiques résulte dans plusieurs effets physiologiques tels que la réduction de la synthèse des protéines, la destruction de la membrane cellulaire et la détérioration des protéines photosynthétiques, qui affectent la croissance et le développement de la plante. Les dommages oxydatifs résultent également dans l'arrêt ou l'induction de la transcription, l'induction des voies de transduction du signal, les erreurs de réplication et l'instabilité génomique (Britt, 1999).

4. Système antioxydant enzymatique : dégradation des ROS

Le stress hydrique entraîne une accumulation excessive des ROS, ce qui favorise les dommages oxydatifs dans les différents compartiments cellulaires de la plante. (Reddy *et al.*, 2004). Le niveau des ROS doit être étroitement régulé et maintenu à l'état d'équilibre afin d'éviter les altérations dues au stress oxydatif. Pour se protéger contre ces intermédiaires toxiques de l'oxygène, les cellules végétales et leurs organites comme les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes, utilisent des systèmes de défense antioxydants comprenant des composants enzymatiques et non enzymatiques (Mittler *et al.*, 2004 ; Gill et Tuteja, 2010 ; Demidchik, 2014). L'activation et/ou la synthèse de ces antioxydants dépend de l'espèce impliquée, l'état métabolique de la plante et l'intensité et la durée du stress (Ahmad *et al.*, 2014). Les principaux antioxydants enzymatiques qui présentent une forte affinité spécifique pour les ROS, comprennent le Cu/Zn-SOD cytosolique, le Mn-SOD mitochondriale, le Fe-SOD chloroplastique, l'APX, la POX, la CAT et d'autres enzymes du cycle glutathion-ascorbate (Tableau 1). Les antioxydants non enzymatiques ne sont pas spécifiques aux différentes ROS et comprennent l'acide ascorbique, le glutathion, la proline, les polyamines, la bêtaïne, les carotènes, certains flavonoïdes et l' α -tocophérol (Demidchik, 2014).

La mesure des activités enzymatiques antioxydantes et l'analyse de l'expression des gènes codants pour ces enzymes au cours des traitements au stress hydrique ont été généralement acceptées comme une approche pour évaluer l'implication du système antioxydant pendant un déficit hydrique. De nombreuses recherches ont établi que l'induction de la machinerie antioxydante des SOD, POX et CAT est importante pour la protection des plantes contre divers stress abiotiques (Masoumi *et al.*, 2011 ; Saglam *et al.*, 2011 ; Ali *et al.*, 2014b). Ces enzymes interviennent dans la détoxification des principales formes des ROS, où la SOD catalyse la dismutation du $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 , tandis que la POX et la CAT s'occupent de l'élimination de l' H_2O_2 (Egert et Tevini, 2002).

Tableau 1 : Liste d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques, leurs fonctions et leurs localisation cellulaire (Das et Roychoudhury, 2014).

Antioxydants enzymatiques	Code de l'enzyme	Réaction catalysée par l'enzyme	Localisation subcellulaire
Superoxyde dismutase (SOD)	EC 1.15.1.1	$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow 2H_2O_2 + O_2$	Peroxyosomes, Mitochondries, Cytosol, et Chloroplastes
Catalase (CAT)	EC 1.11.1.6	$H_2O_2 + \longrightarrow H_2O + \frac{1}{2} O_2$	Peroxyosomes et Mitochondries
Ascorbate peroxydase (APX)	EC 1.11.1.11	$H_2O_2 + AA \longrightarrow 2H_2O + DHA$	Peroxyosomes, Mitochondries, Cytosol, et Chloroplastes
Monodéhydroascorbate réductase (MDHAR)	EC 1.6.5.4	$MDHA + NAD(P)H \longrightarrow AA + NAD(P)^+$	Mitochondries, Cytoplasme, et Chloroplastes
Déhydroascorbate réductase (DHAR)	EC 1.8.5.1	$DHA + 2GSH \longrightarrow AA + GSSG$	Mitochondries, Cytoplasme, et Chloroplastes
Glutathion réductase	EC 1.6.4.2	$GSSG + NAD(P)H \longrightarrow 2GSH + NAD(P)^+$	Mitochondries, Cytoplasme, et Chloroplastes
Guaiacol peroxydase (GPX)	EC 1.11.1.7	$H_2O_2 + GSH \longrightarrow H_2O + GSSG$	Mitochondries, Cytoplasme, Chloroplastes et RE
Antioxydants non enzymatique			
Acide ascorbique (AA)		Elimine l' H_2O_2 via l'action de l'APX	Peroxyosomes, Mitochondries, Cytosol, Chloroplaste, vacuoles et apoplasme
Glutathion (GSH)		Agit comme un co-substrat détoxifiant pour les enzymes (POX, GST, GR...)	Peroxyosomes, Mitochondries, Cytosol, Chloroplaste, vacuoles et apoplasme
α -tocophérol		Protège et détoxifie la membrane des produits de la peroxydation lipidique	Principalement dans les membranes
Caroténoïdes		Désactiver l'énergie excédante au niveau des photosystèmes	Chloroplastes et les autres plastes non verts
Flavonoïdes		Capteurs d' H_2O_2 , 1O_2 et $\bullet OH$	Vacuoles
Proline		Epurateur efficace des radicaux $\bullet OH$ et 1O_2 , prévient les dommages oxydatifs	Mitochondries, Cytosol et Chloroplastes

4.1. La superoxydes dismutase (EC 1.15.1.1)

4.1.1. Description de l'enzyme

La superoxyde dismutase (SOD) qui appartient à la classe des oxydoréductases, est une métalloenzyme intracellulaire, qui est omniprésente dans tous les organismes aérobies et dans tous les compartiments subcellulaires sujets au stress oxydatif (Gill et Tuteja, 2010). Il est bien établi que les stress environnementaux entraînent souvent à une augmentation de la production des ROS, où la SOD joue un rôle important dans la tolérance des plantes au stress et constitue la première ligne de défense contre les effets toxiques des niveaux élevés des ROS. En effet, le radical $O_2^{\cdot-}$ qui est habituellement la première espèce réactive à être générée en conditions de stress, est un précurseur d'autres espèces réactives ($\cdot OH$, NO ou des peroxy-nitrites) et a une durée de vie de l'ordre de quelques secondes, qui lui permet de diffuser au-delà de son lieu de production pour atteindre ses cibles (Parent *et al.*, 2008). Cependant, il peut être éliminé par la SOD, qui catalyse la dismutation de ce radical en H_2O_2 et O_2 .

Les SOD peuvent être classées selon la nature du métal cofacteur présent dans leur site actif en 3 types connus : le cuivre / zinc (Cu/Zn-SOD), localisé dans les chloroplastes et le cytosol, le manganèse (Mn-SOD), localisé dans les mitochondries et le fer (Fe-SOD), localisé dans les chloroplastes (Mittler, 2002). Il a été suggéré que les protéines Mn et Fe-SOD sont les anciennes formes de SOD, qui proviennent probablement de la même enzyme ancestrale. Les séquences d'acides aminés du Cu/Zn-SOD sont différentes des autres protéines et ont probablement évolué indépendamment dans les cellules eucaryotes (Greene, 2002).

4.1.2. Structure tridimensionnelle des SOD

Structurellement, le Mn-SOD et le Fe-SOD semblent être des variants de la même enzyme (Stallings *et al.*, 1984). Les deux sont structurellement homologues ayant 3 feuillets β antiparallèles, dominés par des hélices α , ce qui diffère du motif clé grecque du feuillet β de l'enzyme Cu/Zn-SOD, assuré par un pont disulfure, une caractéristique unique de Cu-Zn SOD. Les Fe-SOD et Cu/Zn-SOD sont généralement observés comme étant des dimères, tandis que les Mn-SOD sont tétramériques (Scandalios, 1993). Les sites actifs de ces enzymes sont spécifiques pour les ions métalliques respectifs et pour l'anion superoxyde (Muñoz *et al.*, 2005).

Une étude portée sur la SOD du blé dur (Feki *et al.*, 2016) a permis d'identifier la structure tridimensionnelle d'une Mn-SOD (TdMnSOD) en utilisant comme modèle la structure cristallographique de la AtMnSOD d'*Arabidopsis thaliana* (Marques *et al.*, 2014).

La Mn-SOD du blé dur d'un poids moléculaire de 30 kda, forme un tétramère où chaque sous unité est composée d'un domaine N-terminal prédominé par l'hélice α et un domaine C-terminal qui est une structure $\alpha+\beta$ (Figure 16). Le domaine N-terminal a 2 longues hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$, avec l'absence de l'hélice $\alpha 2$ supplémentaire. L'absence de cette hélice supplémentaire favorise les interactions entre les sous unités pour former des dimères (Trinh *et al.*, 2008). Le domaine C-terminal comprend 6 hélices α et 3 feuillets β .

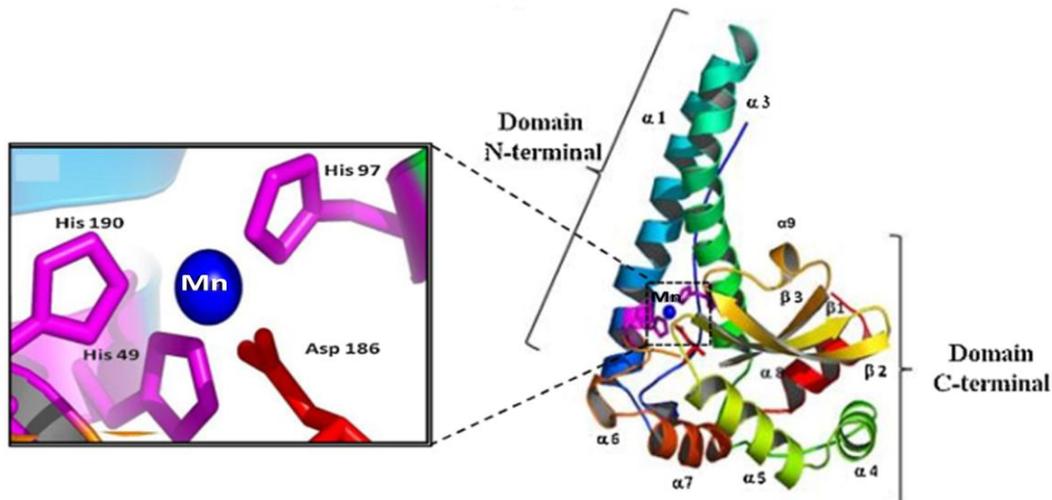


Figure 16 : Diagramme en ruban de la sous unité TdMnSOD du blé dur (Feki *et al.*, 2016)

La sous unité TdMnSOD est composée d'un domaine N-terminal qui contient 2 hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$ et un domaine C-terminal composé de 6 hélices α ($\alpha 4$ - $\alpha 9$) et 3 feuillets β ($\beta 1$ - $\beta 3$). Les résidus His49, His97 dans le domaine N-terminal et Asp186 et His190 dans le domaine C-terminal sont impliqués dans l'interaction des ions métalliques (Mn^{3+}) et forment le site actif.

La sous unité de l'enzyme Fe-SOD isolée de *Vigna unguiculata* ou le niébé (Muñoz *et al.*, 2005), est constituée de 2 domaines structuraux : un domaine hélicoïdal N-terminal composé de 2 longues hélices α antiparallèles, séparées par une petite hélice α et un domaine C-terminal composé d'une structure $\alpha+\beta$ avec 3 feuillets β centrales antiparallèles et 4 hélices α (Figure 17). La structure cristallographique de cette enzyme a permis d'identifier au total 238 résidus d'acides aminés.

Une analyse approfondie de la structure de Cu/Zn-SOD du riz (Dehury *et al.*, 2013) a révélé une enzyme avec une forme dimérique, dont chaque monomère est constitué d'une hélice α , 9 feuillets β et d'un pont disulfure (Cys56/Cys145) qui permet de maintenir la stabilité du pli (Figure 18).

4.1.3. Gènes codants la SOD

Contrairement à la plupart des autres organismes, les plantes ont de multiples formes enzymatiques (isozymes) de SOD. Les SOD sont codées par une petite famille multigénique où le premier gène cloné codant pour une SOD végétale provenait du maïs (Cannon *et al.*, 1987). Des études approfondies ont été menées sur la famille multigénique des SOD chez de nombreuses espèces végétales dont le maïs (Scandalios, 1997), l'Arabette (Kliebenstein *et al.*, 1998), le riz (Kaminaka *et al.*, 1999 ; Feng *et al.*, 2006), le coton (Kim *et al.*, 2008), le blé tendre (Wu *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2008), mais les recherches les plus détaillées ont été menées chez le maïs et *Arabidopsis thaliana*. Chez le maïs par exemple, on dénombre 9 isoformes différentes dont 6 sont des Cu/Zn-SOD (Sod1, Sod2, Sod4, Sod4A, Sod5, Sod9), une Fe-SOD (SodB) et 4 sont des Mn-SOD (Scandalios, 1997).

Bien que de nombreuses études sur les SOD végétales aient été effectuées, seules quelques-unes ont impliqué une analyse moléculaire détaillée chez l'espèce du blé. Chez le blé tendre, la famille multigénique des SOD comprends 5 isoformes, dont 3 isoformes de Mn-SOD (SOD, SOD3.1, SOD3.3), une isoforme Cu/Zn-SOD (SOD1.1) et une isoforme Fe-SOD, disponibles sur la base de données Genbank. Chez le blé dur, la famille des SOD inclue une seule Mn-SOD mitochondriale (TdMnSOD) disponible également dans la base de données Genbank et dont l'expression a été décrite dans la littérature (Feki *et al.*, 2016). L'existence de formes moléculaires multiples de SOD, leur localisation dans les cellules, tissus ou organelles et tout changement qu'elles puissent subir au cours du développement ou en réponse à divers signaux impliquent des rôles métaboliques distincts pour chacune des isoenzymes SOD (Scandalios, 1993).

4.1.4. Localisation subcellulaire et rôles fonctionnels de la SOD

Le superoxyde d'oxygène ($O_2^{\cdot-}$) est produit dans la cellule, là où une chaîne de transport d'électrons est présente. Ainsi, l'activation de ce radical peut se produire dans différents compartiments de la cellule, y compris les mitochondries, les chloroplastes, les microsomes, les glyoxysomes, les peroxysomes, les apoplastes et le cytosol (Eltner, 1991). Ceci étant le cas, il n'est pas surprenant de constater la présence des SOD dans tous ces emplacements subcellulaires. Alors que tous les compartiments de la cellule sont des sites possibles pour la formation du radical $O_2^{\cdot-}$, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes sont considérés comme les plus importants générateurs des ROS (Fridovich, 1995). Il a été montré que les membranes phospholipidiques sont imperméables aux

molécules $O_2^{\cdot-}$. Par conséquent, il est crucial que les SOD soient présentes dans les compartiments où les radicaux $O_2^{\cdot-}$ sont formés (Takahashi et Asada, 1983).

Les plantes ont longtemps été connues pour avoir les Fe-SOD dans leurs chloroplastes (Alscher *et al.*, 2002). Toutefois, ces enzymes ont été récemment localisées dans le cytoplasme des plantes du niébé (Moran *et al.*, 2003). Chez *Locus japonicus*, des Fe-SOD sont localisés dans les chloroplastes alors que d'autres semblent être cytoplasmiques (Rubio *et al.*, 2007). Le Fe-SOD des chloroplastes peut s'associer aux nucléoïdes des plastes et participer à la signalisation ou à la régulation des gènes (Pilon *et al.*, 2011). Les Fe-SOD ne sont pas seulement limitées à l'élimination des $O_2^{\cdot-}$ chloroplastiques, mais constituent aussi un mécanisme défensif contre le stress oxydatif associé à la sénescence (Muñoz *et al.*, 2005).

Les Mn-SOD végétales sont localisées principalement dans les mitochondries. Il existe plusieurs gènes codants pour différentes Mn-SOD destinées à différents sous-compartiments de la mitochondrie (Miller, 2012). La Mn-SOD végétale est également présente dans les peroxysomes, où son taux d'expression est régulé indépendamment de celui de la Mn-SOD mitochondriale (del Río *et al.*, 2003). La présence d'une Mn-SOD mitochondriale et d'une Mn-SOD peroxysomale a été démontrée en utilisant des tests d'immunolocalisation chez le pois (del Río *et al.*, 2003). Le métal présent dans le site actif de l'enzyme réduit la molécule $O_2^{\cdot-}$ en lui cédant un électron, qui à son tour forme un H_2O_2 en réagissant avec un proton (Asada, 1994). La Mn-SOD peut être régulée différemment pour compléter le rôle joué par les Cu/Zn-SOD cytosoliques et extracellulaires (Miller, 2012).

Les plantes contiennent du Cu/Zn-SOD dans leurs cytosols et dans leurs chloroplastes. Il peut en outre y avoir plusieurs Cu/Zn-SOD exprimés à partir de plusieurs gènes différents (Fink et Scandalios, 2002). Une isoforme de Cu/Zn-SOD chloroplastique (Ogawa *et al.*, 1996) et 2 isoformes cytoplasmiques (Kanematsu et Asada, 1990) ont été identifiées chez l'épinard (*Spinacia oleracea*). Des méthodes de localisation immunologiques réalisées avec des anticorps marqués ont montré que cette enzyme, soluble dans les feuilles d'épinard, n'est pas uniformément distribuée dans le chloroplaste mais localisée principalement sur la face stromale des membranes thylacoïdiennes (Ogawa *et al.*, 1995), où se trouve le photosystème I. Les mêmes méthodes de localisation ont permis d'identifier des Cu/Zn-SOD cytoplasmiques au niveau du noyau et de l'apoplasme (Ogawa *et al.*, 1996). Il a été proposé que le Cu/Zn-SOD de l'apoplasme joue un rôle dans la lignification et que dans le noyau, il protège la cellule des mutations mortelles causés par les molécules $O_2^{\cdot-}$. Les Cu/Zn-SOD végétales ont également été localisés au niveau des peroxysomes (Bueno *et al.*, 1995).

4.2. La peroxydase de classe III (EC 1.11.1.7)

4.2.1. Description de l'enzyme

Les peroxydases végétales (POX), appelées aussi peroxydases de classe III, sont des oxydoréductases qui catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols, les hydroquinones et les amines aromatiques, en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Delannoy *et al.*, 2004). Elles sont distribuées classiquement dans deux groupes : le premier est constitué des peroxydases acides ou anioniques, le second des peroxydases basiques ou cationiques, dont la masse moléculaire est comprise entre 30 et 45 kDa (Almagro *et al.*, 2009).

Les POX jouent un rôle très important dans les plantes en permettant la formation de structures végétales rigides et en adaptant l'organisme à un environnement plus oxygéné (Passardi *et al.*, 2004). Les Peroxydases de classe III font partie des principaux antioxydants enzymatiques qui assurent la protection des plantes contre le stress oxydatif par élimination du H_2O_2 (Miller *et al.*, 2010). En effet, cette enzyme catalyse la réduction de l' H_2O_2 par oxydation de divers composés organiques. Les formes individuelles des POX diffèrent dans la spécificité de leur substrat, qui est associée au changement dans la charge et la configuration de l'enzyme et du substrat en lui-même, à différentes valeurs de pH (Gajhede, 2001a). Silaghi-Dumitrescu, (2010) a recensé plus de 200 substrats utilisés pour la détermination *in vitro* de l'activité POX de raifort (HRP). Cependant, le guaiacol présente un substrat universel pour la majorité des peroxydases et est utilisé dans les tests colorimétriques dans de nombreuses applications (Murphy *et al.*, 2012).

4.2.2. Structure tridimensionnelle des POX

Les POX sont des glycoprotéines, contenant de la ferriprotoporphyrine IX comme groupe prosthétique et du calcium. En général, les POX cytosoliques sont des dimères, tandis que les POX chloroplastiques sont des monomères (Welinder, 1992). Le premier modèle de la structure tridimensionnelle de la HRP utilisant la cristallographie aux rayons X a été déterminé par Gajhede *et al.*, (1997). La structure de l'enzyme est en grande partie hélicoïdale bien qu'il y ait également des petites régions de feuillet β (Figure 19). Malgré une divergence importante de leurs séquences, les POX végétales présentent une structure tridimensionnelle relativement similaire dont la base est constituée de 10 hélices α , renfermant un groupement prosthétique qui est un hème de type b, le cœur réactionnel de la peroxydase. On obtient ainsi 2 domaines, l'un distal (extrémité N-terminal) qui contient les hélices A à D et l'autre proximal (Extrémité C-terminal) comprenant les hélices E à J, reliés entre eux par une longue

boucle, entre lesquels l'hème vient se loger (Delannoy *et al.*, 2004). Ces 2 domaines sont stabilisés par plusieurs ponts : une dizaine de cystéines impliquées, des ponts disulfures, des ponts salins, ainsi que des ions Ca^{2+} . Une caractéristique des peroxydases végétales est la présence de 3 hélices α supplémentaires (hélices D', F', F'') qui s'ajoutent au noyau de la POX et qui ne se trouvent pas dans les peroxydases de classe I ou II (Gajhede, 2001b).

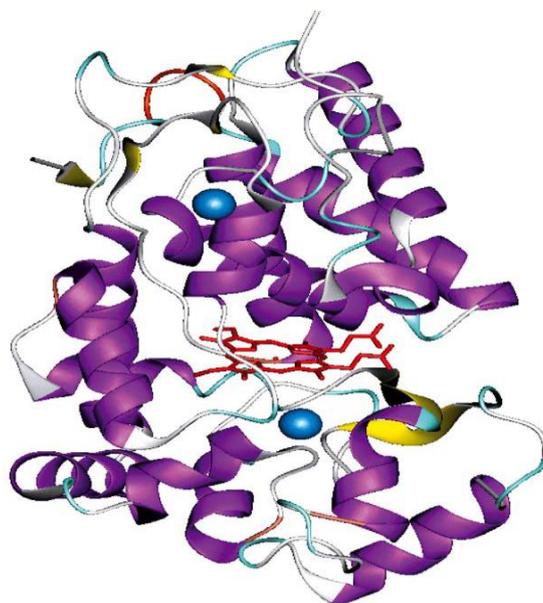


Figure 19 : Représentation tridimensionnelle de la structure cristallographique de la HRP (Veitch, 2004)
Le groupement prosthétique de type b (coloré en rouge) est situé entre les domaines distaux et proximaux qui contiennent chacun un atome de calcium (représenté par des sphères bleues). Les régions α -hélicoïdale et les feuillets β de l'enzyme sont respectivement indiquées en violet et en jaune.

4.2.3. Mécanisme réactionnel de la catalyse enzymatique des POX

En raison de leur très grande diversité de substrats, il est difficile, voire impossible, de dégager une réaction typique des peroxydases végétales. Néanmoins, elles partagent toutes un schéma réactionnel similaire en 3 étapes qui transforme le substrat en sa forme radicalaire extrêmement réactive (Figure 20). La catalyse déclenchée par la réaction entre l' H_2O_2 et le Fe^{3+} de l'enzyme POX permet la formation d'enzymes transitoires (composés I et II) qui sont des oxydants très puissants. En réagissant avec un donneur de protons (AH_2), les composés I et II donnent naissance à des radicaux libres (AH^\bullet) qui peuvent former des polymères en réagissant entre eux (Baaziz *et al.*, 2006).

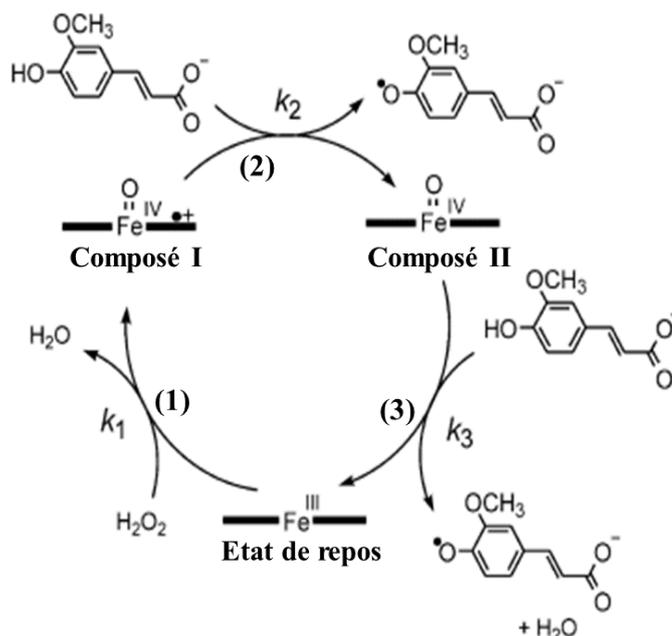


Figure 20 : Le cycle catalytique de la peroxydase de raifort (HRP) avec l'acide férulique comme substrat réducteur (Veitch, 2004)

Les constantes de vitesse k_1 , k_2 et k_3 représentent le taux de formation du composé I, le taux de réduction du composé I et le taux de réduction du composé II, respectivement. (1) L' H_2O_2 réagit avec l'enzyme POX à l'état de repos Fe(III) pour donner le composé I, un intermédiaire à haut degré d'oxydation comprenant un centre oxyferryl Fe (IV) et un radical cationique à base de porphyrine. (2) Le composé I oxyde le substrat pour donner le radical (AH^\bullet). Il subit une seconde oxydation générant le composé II qui contient un centre oxyferryl coordonné à un ligand porphyrinique normal (dianionique). (3) le composé II est réduit à l'état ferrique natif. La charge nette du composé I est +1 alors que celle du composé II est neutre.

Outre le cycle catalytique standard des POX, où l' H_2O_2 est décomposé en eau et oxygène, un deuxième cycle hydroxylique séparé, qui conduit à la formation de différentes espèces réactives de l'oxygène, a été décrit (Passardi *et al.*, 2004), impliquant ainsi les POX dans plusieurs processeurs physiologiques.

4.2.4. Multiplicité des gènes POX et des isoformes

Les peroxydases végétales sont un exemple d'une famille multigénique dont le nombre des isoformes a augmenté depuis l'émergence de la terre par les plantes en raison de l'évolution constante (Bakalovic *et al.*, 2006). L'annotation automatique des génomes d'*Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis Genome Initiative, 2000) et d'*Oryza sativa* (Goff *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2002), le regroupement automatique et l'assemblage des séquences EST et

les nombreux projets d'EST, ont conduit à l'identification d'un grand nombre de séquences codantes pour des peroxydases végétales de classe III. Le génome d'*Arabidopsis* contient 73 gènes codants pour la peroxydase (Tognolli *et al.*, 2002) et le riz en contient 138 (Passardi *et al.*, 2004). La base de données PeroxiBase, accessible via le serveur web (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>), permet l'accès à des outils spécifiques dédiés pour faciliter l'interrogation, la classification et la soumission des séquences des POX végétales. Actuellement, jusqu'à 115 séquences POX de *Triticum aestivum* ont été identifiées dans la base de données PeroxiBase. Des isoenzymes de POX ont été identifiées dans des extraits bruts de différentes plantes par coloration de l'activité enzymatique après séparation sur gel d'électrophorèse. Les profils électrophorétiques des isoenzymes POX indiquent des rôles possibles des POX dans de multiples processus physiologiques. Sur la base de leur point isoélectrique, on distingue 5 isoformes chez le Raifort (Aibara *et al.*, 1982), 12 isoformes chez le tabac (Lagrimini et Rothstein, 1987), 25 chez le riz (Ito *et al.*, 1991) et 22 isoformes chez le Mil (Shivakumar *et al.*, 2003). Du fait de cette multiplicité des gènes et des isoformes, la suppression d'une peroxydase peut être compensée par l'activité des autres, surtout si l'on tient compte de la faible spécificité d'action de ces protéines (Delannoy *et al.*, 2004).

4.2.5. Localisation subcellulaire et rôles fonctionnels des POX

Dans la cellule végétale, les POX sont principalement associées aux parois cellulaires. Il est d'usage de distinguer 3 groupes de peroxydases pariétales : les POX libres dans l'apoplasme et les POX liées à la paroi par des interactions ioniques ou covalentes (Takabe *et al.*, 2001). Outre la paroi et l'apoplasme qui semblent être des lieux privilégiés de leur action, des POX se localisent également dans les vacuoles, les vésicules de transport et les ribosomes liés à la membrane (Gaspar *et al.*, 1982). Les travaux de Šukalović et Vuletic (2003) ont permis de localiser des peroxydases au niveau des mitochondries des racines du maïs.

Du fait du grand nombre des gènes codants pour la POX et des deux cycles catalytiques possibles, les POX sont impliqués dans un large éventail de processus physiologiques, tant dans le développement de la plante que dans son comportement à l'égard de traumatismes biotiques ou abiotiques (Delannoy *et al.*, 2004). Ainsi, les POX sont impliquées dans la régulation de la croissance (Zheng et van Huystee, 1992), le catabolisme de l'auxine (Sembdner *et al.*, 1980), la sénescence (Abeles *et al.*, 1988), la défense contre les agents pathogènes (Dmochowska *et al.*, 2013), la biosynthèse des parois cellulaires, spécifiquement dans les mécanismes de lignification et de subérisation (Espelie *et al.*, 1986 ; Lagrimini et

Rothstein, 1987), ainsi que dans la réticulation des polysaccharides de la paroi cellulaire (Fry, 1986).

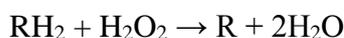
Les POX végétales participent également dans les mécanismes de tolérance au stress abiotiques. En cas de stress, il est fréquent de constater une augmentation de l'activité totale des POX de la plante (Delannoy *et al.*, 2004). C'est un phénomène très général, mis en évidence dans un grand nombre d'espèces en réponse à différents types de stress comme la sécheresse (Shao *et al.*, 2007a). Les peroxydases de classe III peuvent participer à la détoxification des ROS accumulées en conditions de stress hydrique. En effet, le point commun entre toutes les peroxydases est l'utilisation de l' H_2O_2 . La peroxydation de cette espèce réactive est le rôle majeur des ascorbates peroxydases, mais les peroxydases de classe III peuvent aussi y participer selon au moins 2, voire 3 voies (Delannoy *et al.*, 2004). Par ailleurs, le système peroxydase-flavonoïdes-acide ascorbique peut constituer un excellent cycle de détoxification (Pérez *et al.*, 2002) ; en présence d' H_2O_2 , une peroxydase peut oxyder les flavonoïdes ou d'autres composés phénoliques qui sont par la suite réduits en présence d'ascorbate. Enfin, certaines peroxydases peuvent avoir une activité de type catalase en produisant de l' O_2 aux dépens d' H_2O_2 (Baker *et al.*, 2000).

4.3. La catalase (EC 1.11.1.6)

4.3.1. Description de l'enzyme

La catalase (CAT) est une oxydoréductase hémique avec le potentiel de dismuter directement l' H_2O_2 en H_2O et O_2 sans consommer d'équivalents réducteurs cellulaires et est indispensable pour la désintoxication des ROS en conditions de stress (Garg et Manchanda, 2009). C'est une enzyme constituée de polypeptides d'un poids moléculaire de 50-70 kDa, qui sont organisés en tétramères, chaque monomère portant un groupement prosthétique hémique (Regelsberger *et al.*, 2002). La CAT présente une vitesse de renouvellement la plus élevée par rapport à toutes les autres enzymes : une molécule de CAT peut convertir 6 millions de molécules d' H_2O_2 en H_2O et O_2 par minute (Gill et Tuteja, 2010). La CAT est importante dans l'élimination de l' H_2O_2 généré dans les peroxysomes par les oxydases impliquées dans la β -oxydation des acides gras, la photorespiration et le catabolisme de la purine. L'activité enzymatique augmente linéairement sur une large gamme de concentrations d' H_2O_2 , maintenant ainsi un niveau contrôlé de peroxyde intracellulaire. Il a été proposé que la catalase puisse être uniquement adaptée pour réguler l'homéostasie de l' H_2O_2 dans la cellule (Asada et Takahashi, 1987).

En fonction de la concentration en H_2O_2 , la CAT exerce une double fonction (Scandalios *et al.*, 1997). À faible concentration d' H_2O_2 , la CAT agit comme une peroxydase et fait intervenir des cofacteurs donneurs d'électrons (comme l'éthanol et l'acide ascorbique), qui peuvent être oxydés selon la réaction :



Le cycle catalytique passe par un intermédiaire de type Fe(V)-oxo (Figure 21). À des concentrations élevées du substrat, la CAT décompose l' H_2O_2 toxique à une vitesse extrêmement rapide utilisant une réaction catalytique dans laquelle l' H_2O_2 agit à la fois comme accepteur et donneur de molécules d'hydrogène.

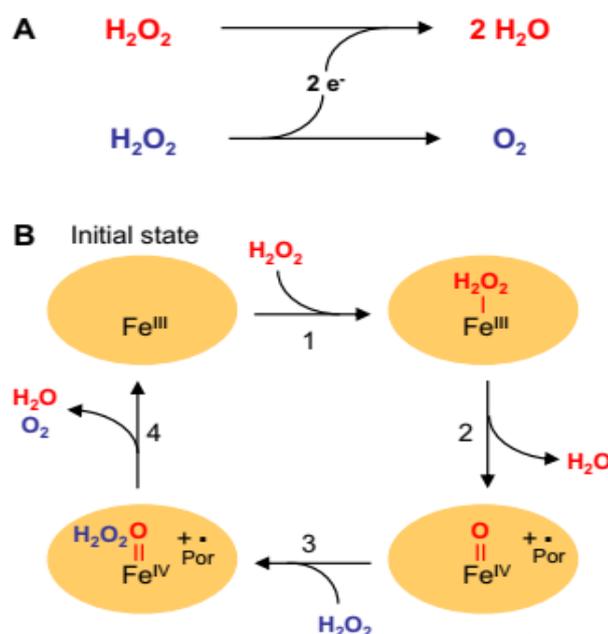


Figure 21 : Représentation schématique du cycle catalytique de la catalase (Mhamdi *et al.*, 2010)

(A) Les substrats globaux et les produits de la réaction de dismutation classique. (B) Schéma de la réaction peroxydasique en 4 étapes. Les chiffres romains indiquent l'état d'oxydation du fer de l'hème, alors que Por^+ indique un équivalent d'oxydant accumulé comme un radical cation de la porphyrine. 2 substrats d' H_2O_2 différents et leurs produits respectifs sont indiqués en bleu et en rouge.

4.3.2. Structure tridimensionnelle de la CAT

La structure tridimensionnelle d'une Catalase isolée du blé dur (TdCAT1) a été mise en évidence (Feki *et al.*, 2015) en utilisant comme modèle, la structure cristallographique de la catalase HP11 de *E. coli* (Chelikani *et al.*, 2003). L'enzyme est tétramérique où chaque monomère contient 4 régions structurales distinctes qui sont le bras N-terminal, le domaine

du feuillet β formé de 8 brins β antiparallèles, le domaine de connexion et le domaine α -hélicoïdal, qui contient 4 hélices α antiparallèles et contiguës (Figure 22). Le domaine C-terminal est absent dans la protéine TdCAT1 et qu'on retrouve dans d'autres types de CAT. Une certaine variabilité a été détectée dans le domaine de connexion et le domaine α -hélicoïdal dans certain type de CAT de différents organismes (Sooch *et al.*, 2014). La poche de l'hème est localisée entre les parois internes du feuillet β et plusieurs hélices (Frankenberg *et al.*, 2002). La poche de l'hème de la TdCAT1 du blé est composée de 5 résidus essentiels, qui sont : l'His 65, la Ser 104, l'Asn 138, l'Arg 344 et le Tyr 348. Les mêmes résidus forment également la poche de l'hème de la catalase HPII de la *E. coli* (Chelikani *et al.*, 2003).



Figure 22 : Diagramme en ruban de la sous-unité TdCAT1 du blé dur (Feki *et al.*, 2015)

La sous unité TdCAT1 est composée d'un bras N-terminal, d'un domaine du feuillet β , d'un domaine de connexion (repliement), et un domaine α -hélicoïdal. La couleur verte correspond à la poche de l'hème qui est composée de 5 résidus essentiels (His 65, Ser 104, Asn 138, Arg 344 et Tyr 348).

4.3.3. Gènes codants la CAT et isoformes

Les catalases végétales sont codées par une petite famille de gènes. À ce jour, 3 gènes de catalase ont été identifiés chez les angiospermes, notamment chez le tabac, *Arabidopsis*, le maïs, la citrouille et le riz (Willekens *et al.*, 1995 ; Frugoli *et al.*, 1996 ; Guan et Scandalios, 1996 ; Esaka *et al.*, 1997 ; Iwamoto *et al.*, 2000). Cependant, les gels protéiques ont indiqué

plus de 3 bandes dans les études de plusieurs espèces végétales (Corpas *et al.*, 1999 ; Zimmermann *et al.*, 2006). Jusqu'à 12 isoenzymes CAT ont été identifiées chez la moutarde blanche (Drumm et Schopfer, 1974). Les phénomènes sous-jacents à ces bandes multiples restent à élucider. Les données disponibles sur les profils d'expression et l'analyse fonctionnelle des gènes CAT ont permis de les classer en 3 classes : I, II et III (Table 2). Les CAT de classe I sont fortement exprimées dans les tissus photosynthétiques où elles éliminent l'excès d'H₂O₂ produit pendant la photorespiration. Les CAT de classe II dont le rôle est encore inconnu, sont associées aux tissus vasculaires. Enfin, les CAT de classe III sont exprimées dans les graines et les jeunes plantules à des niveaux élevés, où leur activité est liée à l'élimination de l'H₂O₂ produit lors de la dégradation des acides gras dans le cycle du glyoxylate dans les glyoxysomes (Mhamdi *et al.*, 2010). Dans une étude précédente, 2 isoformes de CAT (CAT1 et CAT2) ont été purifiées à partir du blé tendre où certaines propriétés biochimiques ont été déterminées (Garcia *et al.*, 2000). Quatre gènes CAT de blé tendre (wcat1, CAT3, CATA, LOC542902) et un gène CAT de blé dur (TdCAT1) sont disponibles sur la base de données Genbank.

Tableau 2 : Classification des 3 catalases dans différentes espèces végétales (Mhamdi *et al.*, 2010)

La division en 3 classes est basée sur la classification introduite par Willekens *et al.*, (1995), représentée dans 5 espèces dans lesquelles un trio complet de gènes CAT a été identifié et étudié.

	Classe I	Classe II	Classe III
Tabac	Cat1	Cat2	Cat3
Arabidopsis	CAT2	CAT3	CAT1
Mais	Cat2	Cat3	Cat1
Citrouille	cat2	cat3	cat1
Riz	CatC	CatA	CatB

4.3.4. Localisation subcellulaire et rôles fonctionnels des CAT

Chez les plantes supérieures, les catalases sont principalement localisées dans les peroxysomes (Willekens *et al.*, 1995). Il est connu que la photorespiration rend la photosynthèse oxygénée possible, en piégeant son sous-produit toxique majeur, le 2-phosphoglycolate, mais conduit également à des pertes élevées de CO₂ et à la production du H₂O₂ (Bauwe *et al.*, 2012). Considérant le rôle clé de la CAT dans la photorespiration, de

nombreux auteurs se sont concentrés sur le rôle de la voie catalytique de cette enzyme en condition de stress hydrique. En effet, le maintien de l'activité CAT dans les feuilles des plantes stressées permet l'élimination de l' H_2O_2 photorespiratoire produit lorsque les plantes sont soumises à un déficit hydrique, notamment sous des degrés de stress sévère (Sofo *et al.*, 2015). La présence de certaines catalases non peroxysomales a été également signalé. En effet, plusieurs études ont prouvé l'existence des CAT dans les mitochondries (Heazlewood *et al.*, 2004 ; Shugaev *et al.*, 2011). Des séquences peptidiques de CAT2 et CAT3 ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana*, par analyse protéomique de mitochondries purifiées (Heazlewood *et al.*, 2004). Une isoenzyme CAT3 a été identifiée dans les mitochondries du maïs (Scandalios *et al.*, 1980). Il a été suggéré que cette enzyme peut jouer un rôle dans la voie de l'alternative oxydase (AOX). Sheptovitsky et Brudvig, (1996) ont identifié une catalase au niveau des membranes des thylacoïdes associée au photosystème II dans des feuilles d'épinards. Selon ces auteurs, cette enzyme est importante pour le processus de la phase obscure de la photosynthèse des plantes. L'activité de la CAT a été également signalée dans l'espace apoplasmique des racines de maïs (Salguero et Bottger, 1995). Une catalase apoplasmique a été détectée par immunofluorescence et microscopie électronique dans des cotylédons de tournesol (Eising *et al.*, 1990). D'après ces études, la CAT apoplasmique permet de maintenir l' H_2O_2 à des niveaux constants dans les espaces extracellulaires de la plante et éviter la formation des ROS générées par les interactions entre l' H_2O_2 et le Fe III.

Chapitre II

Matériels et

Méthodes

Chapitre II. Matériels et méthodes

1. Matériel végétal

Le blé dur (*Triticum durum* Desf.) de la famille des poacées, a été choisi en raison de son utilisation au laboratoire faisant l'objet d'études pour beaucoup de recherches, notamment dans l'impact des stress environnementaux ou encore dans l'amélioration variétale. Les variétés étudiées ont été choisies de manière à avoir un ensemble de cultivars ayant des différences importantes concernant les caractéristiques agronomiques de productivité et de tolérance. Les graines des écotypes étudiés, d'origine locale et introduite, ont été obtenues auprès de l'Institut Technique des Grandes Cultures (ITGC) de Constantine (Tableau 3).

Tableau 3 : Pédigrée, origine et acronyme des génotypes étudiés

Génotype	Pédigrée	Origine	Acronyme
Oued zenati368	Variété locale ancienne	Algérie	OZ
Bidi 17	Variété locale ancienne	Algérie	B17
Bousselam	Heider/Martes//Huevos de Oro	Cimmyt-Icarda	BOU
Benisuif	Corm'S'/Rufo'S'	Egypte	BEN
Vitron	TURCHIA77/3/JORI(SIB)/(SIB)ANHINGA// (SIB)FLAMIN GO	Espagne	VIT
Colosseo	Creso/Mexa'S Mutant	Italie	COL
Waha	Plc/Ruff //Gta/3/Rolette CM 17904	Cimmyt-Icarda	W
Djennah khetifa	Variété locale ancienne	Algérie	DK
Beliouni	Variété locale ancienne	Algérie	BEL
Beltagy-2	ICD97-0396-T-1AP-AP-5AP-0AP-16AP-AP	Icarda	AGY

2. Méthodes expérimentales

2.1. Etude de l'effet du stress oxydatif sur les activités enzymatiques antioxydantes et des marqueurs du stress oxydatif

2.1.1. Conditions de culture

Les graines de blé dur conservées à l'obscurité à 4 °C sont triées puis mises à hydrater pendant une nuit à température ambiante. Elles sont ensuite stérilisées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 1 % pendant 10 mn puis rincées plusieurs fois à l'eau

déminéralisée et enfin déposées sur du papier Wattman humide dans des boîtes de Pétri. Ces dernières sont placées dans une chambre de culture à l'obscurité et à une température de 25 °C. Quand les premières racines sont à 2-3 cm, les plantules sont sélectionnées puis transférées dans des pots en plastiques (5 graines / pot) contenant un mélange de terre et de sable dont les proportions sont successivement (2 : 1). Les plantules sont mises à germer sous serre (Figure 1) sous des conditions semi-contrôlées : environ 14 h lumière / 10 h d'obscurité, 25 °C jour/ 15 °C nuit et une humidité relative de 65 % à 70 %. Les pots sont ensuite répartis en 4 lots pour l'étude de l'effet des différents stress appliqués :

- Un lot pour les plantes témoins
- Un lot pour les plantes traitées par sécheresse
- Un lot pour les plantes traitées par chaleur
- Un lot pour les plantes traitées par paraquat

Les plantes sont arrosées régulièrement (un jour sur trois). Les différents stress sont appliqués au stade 4^{ème}-5^{ème} (Girardi, 2006). Pour chaque plante témoin et chaque plante traitée, 3 répétitions biologiques sont réalisées.

2.1.2. Application des stress

2.1.2.1. Stress thermique

Les plantes de blé dur sont placées dans un phytotron à 45 °C pendant 6 heures. Les feuilles sont plongées immédiatement dans de l'azote liquide dès la sortie du phytotron puis congelées à -80 °C pour l'étude des paramètres biochimiques.

2.1.2.2. Stress avec paraquat

Les plantes sont traitées avec une solution de paraquat (methyl viologen dichloride hydrate, Sigma) 50 µM auquel on a ajouté du Tween 20 (0.1 %, v/v) comme fixateur. Cette solution a été pulvérisée de façon homogène sur les feuilles, jusqu'à formation des gouttes. Après 48 h de traitement, les feuilles présentant un jaunissement dû à la pulvérisation de la solution de paraquat (Figure 2) sont récoltées puis congelées dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C.

2.1.2.3. Stress hydrique

Le traitement consiste en l'arrêt de l'irrigation pendant 10 jours. Les plantes irriguées à saturation et à température ambiante ont été utilisées comme témoins. Les feuilles récoltées sont congelées dans de l'azote liquide puis stockés à - 80 °C.



Figure 23 : Dispositif de culture sous serre



Figure 24 : Phénotype de jaunissement sur des feuilles de blé dur suite au traitement avec le paraquat

2.1.3. Mesure des activités enzymatiques

2.1.3.1. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines est réalisée selon le protocole de Singh *et al.*, (2008). Environ 250 mg de matériel végétal sont homogénéisés dans 10 ml de tampon Na-phosphate (pH 7, 100 mM) à froid (dans un bac à glace). Le mélange est filtré à l'aide d'un papier Wattman, puis récupéré dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml. Ces derniers sont ensuite centrifugés à 15000 g pendant 30 min à 4 °C. Les surnageants sont récupérés et placés dans de nouveaux tubes à 4 °C pour la mesure de la quantité des protéines et celles des activités des enzymes antioxydantes.

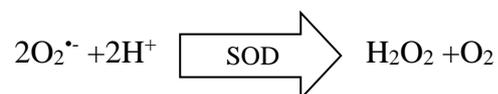
La quantité de protéines dans les échantillons est mesurée par la méthode de Bradford (1976). Le principe de cette méthode est basé sur la liaison du bleu de Coomassie G-250

contenu dans le réactif de Bradford aux résidus aromatiques des protéines, pour donner une couleur bleue dont l'intensité est mesurée par l'absorbance à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée en utilisant une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA) de concentrations connues. Le dosage s'effectue en ajoutant 5 µl de l'extrait protéique (ou 5 µl du tampon d'extraction pour les blancs) à 200 µl de réactif de Bradford et 795 µl de tampon phosphate (pH 7). Après homogénéisation, le mélange est incubé pendant 5 min à température ambiante. L'absorbance est lue à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, modèle Biomate 3.

2.1.3.2. Activité Superoxyde dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1)

L'activité Superoxyde dismutase (SOD) a été mesurée en termes de sa capacité à inhiber la réduction photochimique du nitrobleu de tétrazolium (NBT) selon la méthode décrite par Beauchamp et Fridovich (1971). Pour un volume final de 4 ml, le mélange réactionnel est constitué de [NBT 63 µM, l-méthionine 13 mM, EDTA 0.1 mM, riboflavin 13 µM, carbonate de sodium 0.05 M et 0.5 ml de l'extrait enzymatique (ou tampon d'extraction pour les blancs)]. L'expérimentation est réalisée dans des tubes à essai. La réaction est effectuée à 25 °C sous une intensité lumineuse de 100 µmol m⁻² s⁻¹ pendant 15 min. La réaction est ensuite arrêtée en plaçant les tubes à l'obscurité pendant 15 min, puis l'absorbance est lue au spectrophotomètre Biomate 3 à 560 nm.

Le milieu réactionnel contient une molécule photosensibilisatrice : la riboflavine qui génère sous un éclairage intense des anions superoxydes (O₂^{•-}) interagissant avec le NBT, incolore, pour former du bleu de formasan qui absorbe la lumière à 560 nm. L'activité de la SOD en réduisant les anions superoxydes limite la formation du bleu de formasan et peut être quantifiée sur cette base.



Le maximum de réduction photochimique du NBT, Amax, est déterminé à partir d'un tube témoin en l'absence d'extrait enzymatique. Une unité d'activité SOD est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour une inhibition de 50% du taux de réduction du NBT. L'activité SOD des extraits est calculée en appliquant les formules ci-dessous :

Le pourcentage d'inhibition = $[(A_{560} \text{ max} - A_{560} \text{ échantillon}) / A_{560} \text{ max}] \times 100$

Une unité SOD/g de protéines : $U_{\text{SOD}} = \text{pourcentage d'inhibition} / (n \times 50)$

n : quantité de protéines dans la réaction

2.1.3.3. Activité Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6)

L'activité de la catalase est déterminée selon la méthode décrite par Cakmak et Marschner (1992), en suivant la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 240 nm du fait de l'activité de la catalase selon la réaction suivante :



Pour un volume final de 2 ml, on prépare un milieu réactionnel composé de [tampon phosphate (25 Mm, pH 7), H_2O_2 10 mM, et 0,2 ml de l'extrait enzymatique (0,2 ml de tampon d'extraction pour le blanc)]. Une unité de CAT est définie comme étant la quantité d'enzymes qui décomposent $1 \mu\text{M}$ d' $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$. Les calculs de l'activité CAT sont réalisés en utilisant un coefficient d'extinction de $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$:

$$\text{Activité CAT} = (\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \varepsilon \times V_r \times d) / (V_t \times C)$$

($\mu\text{moles H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$ protéine)

ε : Coefficient d'extinction = $39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

V_r : Volume de la réaction (ml)

d: Facteur de dilution

V_t : Volume de l'extrait enzymatique

C: Concentration en protéines de l'Echantillon (mg/ml)

2.1.3.4. Activité guaiacol peroxydase (GPOX) (EC 1.11.1.7)

L'activité de la guaiacol peroxydase est mesurée selon la méthode rapportée par Cakmak *et al.*, (1993), Cette activité est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 470 nm due à la polymérisation du guaiacol en tétraguaiacol en présence de peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



La mesure a été réalisée dans un volume de 2 ml contenant [tampon phosphate (25mM, pH 7), guaiacol 0,05%, H₂O₂ 1,0 mM, EDTA 0,1 mM et 0,2 ml de l'extrait enzymatique (0,2 ml de tampon d'extraction pour les blancs)]. Une unité de GPOX est la quantité d'enzymes qui produit 1 μ M guaiacol min⁻¹. L'activité enzymatique est calculée en utilisant un coefficient d'extinction de 26.6 mM⁻¹cm⁻¹ selon la formule suivante :

$$\text{Activité GPOX} = (\Delta\text{Abs}/\text{min} \times \varepsilon \times V_r \times d) / (V_t \times C)$$

(μ moles H₂O₂/min/g protéine)

ε : coefficient d'extinction = 26.6 mM⁻¹cm⁻¹

V_r : Volume de la réaction (ml)

d: facteur de dilution

V_t: volume de l'extrait enzymatique

C: Concentration en protéines de l'Echantillon (mg/ml)

2.1.4. Evaluation des dommages oxydatifs

2.1.4.1. Peroxydation lipidique

Sous conditions de stress oxydatif, les plantes présentent une chaîne de peroxydation de lipides amenant finalement à la production de malondialdéhyde (MDA), un aldéhyde réactif capable de réagir avec l'acide 2-thiobarbiturique (Figure 25). L'extraction et le dosage du MDA ont été réalisés selon la méthode de Ekmekci et Terzioglu (2005). Des échantillons de feuilles de 100 mg des plantes témoins et traitées sont broyés avec 1 ml d'acide trichloracétique (TCA, 5%) à froid (dans un bac à glace). Le broyat est récupéré dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml puis centrifugé (10 min, 10000 g, température ambiante). À 0,5 ml de surnageant, sont additionnés 0,5 ml d'acide thiobarbiturique (TBA, 0.5 %) préparé dans du TCA (20 %). L'homogénat est ensuite incubé à 95 °C dans un bain-marie pendant 30 min. La réaction est arrêtée par refroidissement immédiat du mélange dans de la glace. Après centrifugation (10 min, 10000 g, température ambiante), le surnageant est récupéré et l'absorbance est lue au spectrophotomètre Biomate 3 à 532 nm puis corrigée après soustraction de la turbidité non spécifique lue à 600 nm. Le blanc contient du TBA (0,5%) préparé dans du TCA (20%). La concentration en MDA (exprimée en μ mol g⁻¹ MF) est calculée en utilisant un coefficient d'extinction 155 mM⁻¹cm⁻¹ suivant la méthode de Heath et Packer (1968).

$$[\text{MDA}] \text{ (nmol/g MF)} = [(\text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}) \times V_t / \epsilon \times \text{MF}] \times 1000$$

V_t : volume de l'extrait (ml)

ϵ : coefficient d'extinction = $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

MF : Matière végétale fraîche (g)

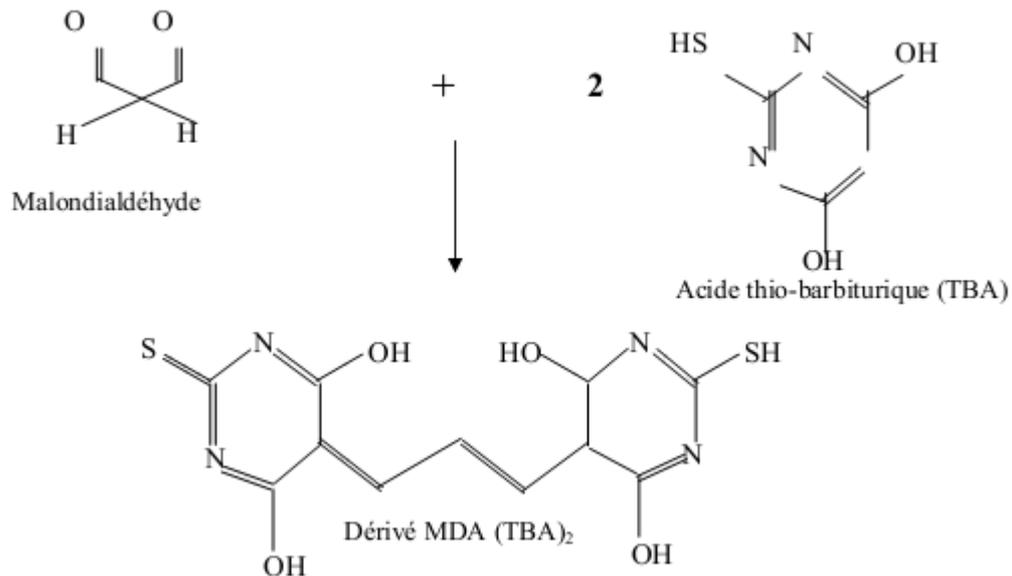


Figure 25 : Réaction de condensation du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique formant le dérivé coloré : MDA (TBA)₂

2.1.4.2. Teneur en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le dosage du peroxyde d'hydrogène a été effectué selon la méthode de Velikova *et al.* (2000). Des échantillons de feuilles (100 mg) sont homogénéisées dans 5 ml d'acide trichloracétique (TCA, 0,1%) dans un bac à glace. L'homogénat est centrifugé à 12000 *g* pendant 15 min à 4 °C. Une fraction aliquote de 0,5 ml du surnageant est placée dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant au préalable 0,5 ml de tampon phosphate (10 mM, pH =7.) et 1 ml de KI 1,0 M. L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 390 nm. La concentration en H₂O₂ est déterminée en utilisant un coefficient d'extinction $\epsilon = 0.28 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ et est exprimée en *n* mol g⁻¹ MF.

2.1.4.3. La stabilité membranaire

La libération relative d'électrolytes (REL: Relative electrolyte leakage) indique le degré de perméabilité de la membrane cellulaire. L'hypothèse est que la dégradation de la

membrane cellulaire due au stress oxydatif entraîne une augmentation de la libération des solutés cytoplasmiques dans le milieu aqueux dans lequel le tissu foliaire est immergé (Prášil et Zámečník, 1998). La libération relative d'électrolytes a été mesurée selon la méthode décrite par Singh *et al.*, (2008). Des feuilles fraîches (100 mg) sont lavées avec de l'eau distillée pour éliminer tout résidu ou électrolyte pouvant adhérer à la surface, puis coupées en petits morceaux (0,5 cm x 0.5 cm). Ces derniers ont été placés dans des tubes à essais contenant de l'eau déionisée puis incubés sous agitation à température ambiante. Après 30 min, la première conductivité (C_1) est mesurée à l'aide d'un conductivimètre de type LF 92. Les tubes à essais sont ensuite plongés dans de l'eau bouillante pendant 15 min et la conductivité (C_2) est de nouveau mesurée. Le pourcentage de REL est déterminé suivant la formule suivante :

$$\%REL = C_1 / C_2 \times 100$$

2.1.4.4. Teneur en chlorophylle totale (SPAD index)

La teneur en chlorophylle totale des feuilles qui est un indicateur de nutrition et des capacités photosynthétiques de la plante, a été déterminée à l'aide d'un chlorophylle mètre SPAD « Soil Plant Analysis Development » modèle 502 Minolta. Ce système permet de mesurer l'absorbance de la lumière à travers la feuille sans altérer cette dernière. Le principe d'analyse est la mesure de la transmittance lumineuse à 2 longueurs d'ondes : le rouge (650 nm), bande d'absorption de la chlorophylle et le proche infrarouge (950 nm) dont la réponse est liée à la structure interne de la feuille (absorptivité et épaisseur des tissus foliaires). Pour ce faire, l'appareil émet à travers la pince qui séquestre la feuille, 2 faisceaux (rouge et infrarouge). Ceux-ci, après avoir traversé la feuille, sont captés par des récepteurs qui vont transformer la lumière transmise en signal électrique et l'amplifient. Le signal est ensuite converti en unités analogiques, appelé unités SPAD. Après une calibration effectuée « à vide » pour déterminer une mesure de référence à 100 % de transmission, l'appareil calcule le ratio des transmittances dans les 2 bandes spectrales, qui est proportionnel à la teneur en chlorophylles dans la feuille, exprimé en unité arbitraire (ou unité SPAD). La mesure donnée est une moyenne de 3 lectures qui ont été effectuées le long de la section médiane de la feuille au stade 4^{ème} -5^{ème} feuille.

2.1.5. Suivi physiologique des plantes sous conditions de stress hydrique

2.1.5.1. Contenu relatif en eau (RWC : Relative Water Content)

La teneur relative en eau permet de connaître le niveau de saturation en eau ou de turgescence de la plante. Elle a été déterminée selon la méthode décrite par Barrs et Weatherley (1962). Le calcul de cette valeur nécessite la mesure de 3 paramètres : le poids frais des feuilles (PF), le poids turgide (PT) et le poids sec (PS). Les feuilles ont été pesées immédiatement après la récolte pour fournir le poids à l'état frais (PF). Ensuite, elles ont été immergées dans de l'eau distillée pendant 24 h à l'obscurité, au frais à 4 °C pour fournir le poids turgide (PT). Enfin le poids sec a été déterminé après 48 h de séchage des feuilles dans une étuve à 80 °C. Le RWC se calcule en appliquant l'équation suivante :

$$\text{RWC} = [(\text{PF}-\text{PS}) / (\text{PT}- \text{PS})] \times 100$$

2.1.5.2. Mesure du potentiel osmotique des feuilles

Le potentiel osmotique gouverne le transport à travers la membrane cellulaire, mais il est aussi un bon indicateur du statut hydrique de la plante. Il a été déterminé selon le protocole décrit par Levy *et al.*, (2006). Pour ce faire, les échantillons de feuilles des plantes témoins et stressées sont placés dans des tubes Eppendorf puis congelés à -20 °C pendant une nuit. Après décongélation, les feuilles sont écrasées avec un piston Pellet Eppendorf. 10 µl du liquide physiologique obtenus sont récupérés à l'aide d'une micropipette et l'osmolalité de l'extrait est aussitôt mesurée à l'aide d'un osmomètre à tension de vapeur (Vapro Modèle 5600). Le solvant de l'échantillon étant l'eau, l'osmolalité mesurée est égale à l'osmolarité de l'échantillon. Le potentiel osmotique (Méga pascals) est déterminé en se basant sur la formule de Van't Hoff :

$$\pi = - R.T. (\text{Osm})$$

Où : π est le potentiel osmotique moyen des feuilles (mPa)

R = 8,314 (Constante des gaz parfait)

T = température en °K (23 °C = 296,15°K)

Osm = Osmolarité (mOsm.Kg⁻¹)

2.1.5.3. Conductance stomatique

L'effet du stress hydrique sur la conductance stomatique a été largement étudié (Ykhlef et Djekoun, 2000 ; Xu et Zhou 2008 ; Wang *et al.*, 2013). Ces études montrent que la fermeture des stomates est parmi les premières réponses des plantes à la sécheresse. La conductance stomatique (g_s) a été mesurée à l'aide d'un Poromètre à diffusion de vapeur d'eau (modèle Delta-T AP4). Les mesures ont été faites sur la partie médiane des feuilles (4^{ème} – 5^{ème} stade) qui présentaient toutes, des surfaces suffisamment importantes pour autoriser l'utilisation de la pince du poromètre qui est dotée d'une chambre de mesure de (2,5 mm x 17,5 mm). Le principe de la mesure repose principalement sur la différence en vapeur d'eau existante entre la chambre sous stomatique (surface de la feuille) et celle obtenue sur une surface dont les caractéristiques sont connues (plaque d'étalonnage). Les flux de vapeurs sont alors mesurés par unité de temps et par unité de surface. L'appareil procure une lecture directe de la résistance stomatique. On calcule ensuite la conductance stomatique, qui est l'inverse de la résistance :

$$g_s = 1/r_s$$

Où : g_s : conductance stomatique

r_s : résistance stomatique

2.1.5.4. Température de surface foliaire

La température de surface du couvert végétal est une caractéristique physique de la plante influencée par la contrainte hydrique. En effet, lors d'un déficit hydrique, les stomates se ferment, la transpiration décroît, et l'énergie solaire absorbée par la plante est emprisonnée. Celle-ci, est dissipée par convection sous forme d'un flux de chaleur, entraînant ainsi une augmentation de la température de la surface foliaire qui devient supérieure à celle de l'air (Aldaoui et Hartani, 2000). La température de surface foliaire a été mesurée à l'aide d'un thermomètre infrarouge numérique portable (modèle Kane-May). Quand la température d'un corps augmente, il émet une radiation sous forme de rayonnement électromagnétique qui sera mesuré par des capteurs infrarouges thermiques dans la bande infrarouge (0.7 - 100 μm) du spectre électromagnétique et la relie ensuite à la température du corps (Gaussorgues, 1999). Les mesures sont données en degré Celsius ($^{\circ}\text{C}$).

2.1.5.5. Rendement quantique maximal du photosystème II (Fv/Fm)

Le rendement quantique maximal du PSII est couramment utilisé pour caractériser l'état de stress chez les plantes. Il renseigne sur l'efficacité quantique d'ouverture des centres réactionnels du PSII et donc sur l'état du photosystème II (PSII). Sous un stress hydrique sévère, la photosynthèse est perturbée, l'émission des électrons est interrompue et la dissipation d'énergie (chaleur ou fluorescence) augmente causant ainsi des photo-détériorations au niveau du PSII (Nogués et Baker 2000). L'intensité de la fluorescence est donc directement liée par une relation inverse au rendement photochimique. Le rendement quantique maximale du transport d'électrons du PSII (Fm/Fv) a été mesuré en utilisant un fluorimètre (modèle FMS2, Hansatech). Les mesures se déroulent en 2 étapes : une phase de 30 min à l'obscurité pendant laquelle le système photosynthétique se met en repos et l'intensité de la fluorescence est à son état initial (F_0). Pour cela, on place un leaf clip sur la surface de la feuille, pour permettre à celle-ci de s'adapter à l'obscurité. Une deuxième phase qui consiste à envoyer un flash lumineux sur la surface test. Les accepteurs d'électrons du PSII sont donc saturés et l'énergie lumineuse excédant les possibilités de collecte du PSII est alors réémise sous forme de fluorescence. L'intensité de la fluorescence monte rapidement d'une valeur initiale F_0 vers une valeur maximale (Fm) en moins d'une seconde. Au cours de cette phase, le fluorimètre enregistre les mesures toutes les 10 μ sec. Fv/Fm est le rapport de fluorescence variable (Fm- F_0) et de fluorescence maximale (Fm). Il est proportionnel au rendement quantique de photochimie et montre un degré de corrélation élevé avec le rendement quantique de la photosynthèse nette.

2.1.6. Analyses statistiques

Le logiciel XLSTAT 2016-Windows a été employé pour toutes les analyses statistiques. La comparaison multiple des moyennes est effectuée par un test d'analyse de variances (ANOVA) suivi du test de Newman-Keuls pour le classement des moyennes. Celles-ci sont exprimées en (moyenne \pm SE) au seuil de signification de 5%. Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée. A l'issue de cette analyse, sont représentés graphiquement d'une part les variables (en fonction de leurs corrélations) et d'autre part les observations (sur un plan à deux dimensions F_1 et F_2 en respectant le critère de Kaiser). Le cercle des corrélations des variables indique la corrélation de chacune des variables initiales avec les axes du plan considéré. La distance entre les points sur le graphique de corrélation des observations obtenues traduit l'intensité de l'association entre les variétés : plus les individus sont éloignés, moins ils ont tendance à être associés, permettant ainsi d'identifier des groupes

homogènes d'observations ou au contraire des observations atypiques. La matrice des corrélations a été établie sur la base des coefficients de Pearson (1986).

2.2. Analyse par électrophorèse native (PAGE) d'isoenzymes de GPOX, CAT et de SOD en conditions de stress hydrique

2.2.1. Conditions de culture

Les graines de blé dur sont triées et désinfectées par un lavage à l'hypochlorite de calcium à 1% pendant 20 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée. Après 5 jours de germination dans des boîtes de Petri, à l'obscurité et à température ambiante (25° C), les plantules sont repiquées sur un milieu nutritif hydroponique de Broughton et Dillworth, (1971) (milieu BD), enrichi en macro- et oligoéléments (Tableau 4). La culture se déroule en salle climatisée sous conditions contrôlées : une luminosité de (16 h de lumière /8 h d'obscurité avec un rayonnement efficace de 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.) une température de (23 \pm 0,5 ° C) et une humidité relative de (65 \pm 5 %) (Figure 26). Durant toute la durée de l'expérience, le milieu BD a été renouvelé tous les 3 jours pour éviter les variations de pH, l'épuisement des ions minéraux et la prolifération d'éventuelles microorganismes.

2.2.2. Application du stress

2.2.2.1. Le polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000)

Le stress hydrique a été induit par ajout du PEG 6000 (Sigma-Aldrich) à la solution nutritive. Le choix de cet osmoticum se justifie par ses avantages, soit un produit inerte, non ionique, n'affectant pas le pH et non perméant pour les cellules. Les molécules de PEG 6000 sont suffisamment petites pour influencer le potentiel osmotique et assez larges pour ne pas être absorbées par les plantes (Carpita *et al.*, 1979). Il est souvent utilisé comme un agent osmotique pour abaisser le potentiel de l'eau d'une manière semblable au séchage du sol sans causer de dommages physiques aux plantes (Romo *et al.*, 2001).

2.2.2.2. Application du stress et échantillonnage

Après un mois de culture, les plantules de blé dur sont traitées avec une solution de PEG 6000 à 20% correspondant à un potentiel osmotique de -0,49 MPa. Le traitement consiste en l'ajout de 5 ml de PEG à la solution nutritive chaque 72 h. Dans le cas du contrôle, le milieu BD est renouvelé sans ajout de PEG (0 MPa). La concentration du PEG et la durée du traitement ont été déterminées suite à plusieurs essais préliminaires. Pour chaque traitement, 3 réplicas sont réalisés. Après 10 jours de traitement au PEG 6000, un échantillonnage est

effectué sur les feuilles des plantes témoins et stressées où elles ont été réparties en 3 lots pour la suite des expérimentations.

Le premier lot est destiné à l'étude du taux de chlorophylle a et b et des caroténoïdes : les feuilles de blé dur sont pesées immédiatement après la récolte puis placées dans des tubes à essai contenant de l'acétone (85 %). La mesure de la teneur en pigments photosynthétiques est faite le jour même.

Les feuilles du deuxième lot sont placées dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml puis congelées à -80°C pour l'étude du potentiel osmotique. Enfin, le dernier lot est destiné pour l'analyse électrophorétique des isoenzymes antioxydantes où les feuilles récoltées sont immédiatement pesées, placées dans des tubes Eppendorf de 2 ml puis plongées directement dans de l'azote liquide. Les échantillons sont ensuite congelés à -80°C jusqu'à leurs utilisations.

Tableau 4 : Composition du milieu BD

Eléments	Concentration finale dans la solution nutritive
Macroéléments	
CaCl ₂ , 2H ₂ O	2 M
KH ₂ PO ₄	1 M
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 M
K ₂ SO ₄	0,5 M
MnSO ₄	2 mM
Fer	
Fe, EDTA	195 mM
Oligoéléments	
H ₃ BO ₃	4 mM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1 mM
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,4 mM
CoSO ₄ , 7H ₂ O	0,2 mM
NaMoO ₄ , 2H ₂ O	0,2 mM

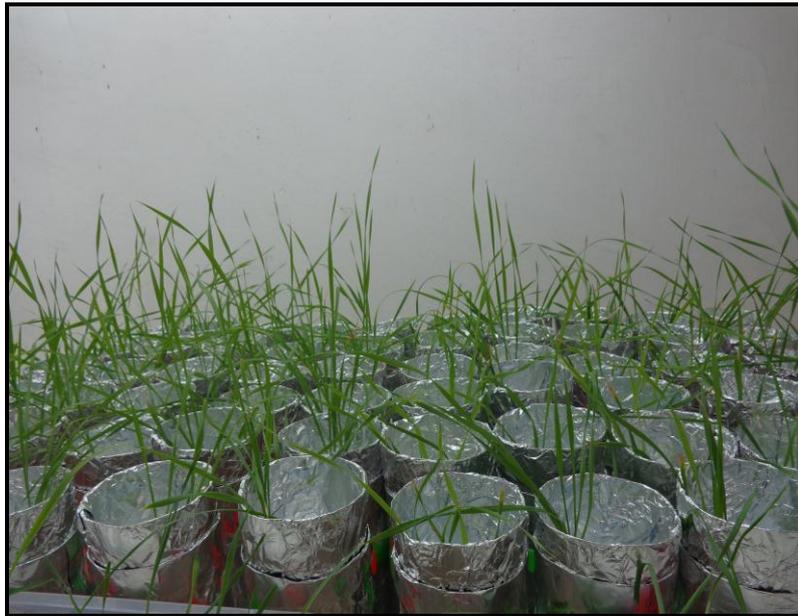


Figure 26 : Dispositif de culture en milieu hydroponique

2.2.3. Mesure des paramètres liés à l'état hydrique des plantes

2.2.3.1. Mesure du taux de chlorophylles et des caroténoïdes

L'extraction des pigments est faite selon la méthode d'Arnon (1949). Les échantillons de feuilles (0,5 g) sont broyés dans 10 ml d'acétone à 85 %. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés après une centrifugation de 3000 rpm pendant 10 min et les surnageants sont récupérés. L'absorbance des échantillons est déterminée à 645, 663 et 470 nm au spectrophotomètre UV-visible, modèle Biomate 3. Les teneurs en pigments sont calculées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ selon les équations suivantes (Lichtenthaler et Wellburn 1983) :

$$\text{chlorophylle a : } \text{Chl a} = 12,21 \text{ DO}_{663} - 2,81 \text{ DO}_{645}$$

$$\text{chlorophylle b : } \text{Chl b} = 20,13 \text{ DO}_{645} - 5,03 \text{ DO}_{663}$$

$$\text{chlorophylles totales : } \text{Chl} = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

caroténoïdes totaux (xanthophylles + β -carotènes) :

$$\text{Ca} = (1000 \text{ DO}_{470} - 3,27 \text{ Chl a} - 104 \text{ Chl b}) / 229$$

2.2.3.2. Mesure du potentiel osmotique

Le potentiel osmotique (π) des feuilles témoins et traitées au PEG 6000 a été déterminé de la même manière que celle décrite dans la partie 1 du chapitre 2 de ce document.

2.2.4. Electrophorèse monodimensionnelle en conditions natives (PAGE)

L'étude du polymorphisme enzymatique et donc de la variabilité génétique entre cultivars est possible grâce à l'électrophorèse. Cette technique nous permet de suivre les modifications des profils isoenzymatiques des antioxydants enzymatiques (SOD, GPOX, CAT) sous conditions de stress. Les variations ainsi enregistrées constitueront un véritable marqueur du stress oxydatif (Lepeduš *et al.*, 2004).

2.2.4.1. Extraction des enzymes

L'extraction de la catalase est réalisée selon le protocole décrit par Pérez & Lira (2005). Les feuilles de blé dur (~ 500 mg) sont broyées dans de l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre fine, qui sera récupérée dans des tubes Eppendorf de 2 ml. 1 ml de tampon d'extraction [Tris-HCl 0.5 M (pH 7.5), DTT 5 mM, MgCl₂ 1 mM, PMSF 10 µM PVP insoluble 2% et du glycérol 12.5%] est ajouté au matériel végétal broyé. L'ensemble est ensuite vortexé puis centrifugé (15 min, 13000 g, 4 °C). Le culot obtenu est resuspendu dans le même tampon + Triton-X 100 à 2%. Après une incubation de 15 min à 30 °C, l'homogénat est centrifugé une deuxième fois (15 min, 13000 g, 4 °C). Les surnageants sont ensuite récupérés et placés dans de nouveaux tubes à 4 °C.

L'extraction des POX et des SOD est réalisée d'après une méthode adaptée de Valizadeh *et al.* (2011) citée par Naderi *et al.* (2014). 1 ml de tampon d'extraction [Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), saccharose 5%, acide ascorbique 50 mM, métabisulfite de sodium 20 mM, PEG 6000 (2%) et 2-mercaptoethanol 0.1%] est ajouté dans des tubes de 2 ml contenant au préalable 500 mg de matériel végétal frais broyé. L'ensemble est ensuite vortexé puis centrifugé (10 min, 12000 g, 4 °C). Les surnageants obtenus sont placés dans de nouveaux tubes à 4 °C.

Les extraits enzymatiques obtenus après extraction sont directement utilisés pour l'analyse en PAGE.

2.2.4.2. Séparation des isoenzymes par gel d'électrophorèse

2.2.4.2.1. Préparation des gels d'électrophorèse

Les différents extraits enzymatiques provenant des feuilles de blé dur sont soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) selon le système de Laemmli (1970) sans l'ajout de SDS.

Les isoformes de catalase sont séparées sur un gel non dénaturant de 7 % (Tableau 5-A) suivant le protocole de Pérez & Lira (2005) avec quelques modifications. Les isoenzymes de

SOD et de POX sont séparées respectivement sur un gel non dénaturant de 10 % et de 7,5 % selon la méthode décrite par Naderi *et al.*, (2014). Le gel est préparé avec le tampon de Poulik (1957) (Tableau 5-B pour les SOD) (Tableau 5-C pour les POX) cité par Wendel & Weeden. (1989). Dans chaque échantillon à analyser sont ajoutés 3 µl du tampon d'extraction approprié contenant des traces de bleu de bromophénol, qui est utilisé comme marqueur de migration. Les échantillons sont ensuite vortexés puis déposés dans les puits.

2.2.4.2.2. Conditions de migration

Le tampon d'électrophorèse préparé pour la migration des CAT est composé de Tris 250 mM et glycine 1,92 M (pH 8,3) sans urée et SDS. Celui des SOD et des GPOX (pH 8,8) contient du Tris 32 mM, Na₂EDTA 0,1 Mm et de l'acide borique 0,6 mM.

La migration est effectuée dans une cuve d'électrophorèse verticale H-Vertigel 2 de dimensions 20 x 20 cm (Apelex) à un voltage constant (70 V) et une température de 4 °C jusqu'à ce que le front de migration atteigne le bas du gel.

2.2.4.2.3. Révélation de l'activité enzymatique sur gel

La révélation de l'activité des CAT est effectuée selon la méthode de Woodbury *et al.*, (1971) citée par Fath *et al.*, (2002). Le gel est d'abord immergé dans l'eau distillée pendant 15 min. Après lavage, il est incubé dans l'H₂O₂ à 0.03% pendant 5 min sous agitation douce puis lavé délicatement dans de l'eau distillée afin d'éliminer les résidus d'H₂O₂. L'activité de la catalase est révélée en trempant le gel à l'obscurité dans une solution contenant du chlorure ferrique à 1% (w/v) et de ferricyanure de potassium à 1% (w/v). Le réactif, le ferricyanure de potassium, réagit avec l'eau oxygénée, ce qui donne une coloration bleue verte. Ainsi, lorsque la catalase est absente dans le gel, ce dernier présente une coloration bleue verte. Les bandes claires (achromatiques) dans un gel bleu-vert, traduisent la présence de la catalase dans le gel. Lorsque le contraste maximal est atteint, la réaction est stoppée en rinçant le gel plusieurs fois à l'eau distillée.

Après migration, l'activité de la SOD est révélée en trempant le gel dans une solution de Tris-HCL (50 mM, pH 8,0) contenant : 2 mg de Riboflavine, 1 mg EDTA et 10 mg de NBT pour un volume final de 50 ml (Wendel & Weeden 1989). Après une incubation de 30 min à l'obscurité et sous agitation, le gel est éclairé sous une lumière blanche. Le NBT se colore en présence du superoxyde généré par l'oxydation de la riboflavine à l'air ambiant. La disparition du superoxyde résultant de l'activité de dismutation des SOD se traduit par une décoloration du NBT à l'emplacement de la SOD.

Tableau 5 : Composition du gel d'électrophorèse pour la séparation des CAT (A), SOD (B) et GPOX (C)

(A)

Solutions stocks	Gel de séparation (7 %)	Gel de concentration (4 %)
Acrylamide/bis (40 %)	9,4 mL	1 mL
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,3)	12,5 mL	/
Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	/	2,5 mL
APS (10%)	250 µL	50 µL
TEMED	50 µL	10 µL
H ₂ O distillée	27,8 mL	6,44 mL

(B)

Solutions stocks	Gel de séparation (10%)	Gel de concentration (4 %)
Acrylamide/bis (40 %)	12,5 mL	1 mL
Tris-citrate (0,076 M, pH 8,6)	12,5 mL	/
Tris-citrate (0,076 M, pH 6,8)	/	2,5 mL
APS (10%)	250 µL	50 µL
TEMED	50 µL	10 µL
H ₂ O distillée	24,7 mL	6,44 mL

(C)

Solutions stocks	Gel de séparation (7,5%)	Gel de concentration (4 %)
Acrylamide/bis (40 %)	9,37 mL	1 mL
Tris-citrate (0,076 M, pH 8,6)	12,5 mL	/
Tris-citrate (0,076 M, pH 6,8)	/	2,5 mL
APS (10%)	250 µL	50 µL
TEMED	50 µL	10 µL
H ₂ O distillée	27,83 mL	6,44 mL

Les zones de l'activité SOD apparaissent comme des bandes achromatiques sur un bleu foncé. Le gel est ensuite lavé abondamment à l'eau distillée.

Enfin, La révélation de l'activité des GPOX est réalisée selon la méthode de Baaziz. (1989) avec quelques modifications. Le gel est trempé dans une solution de guaïacol 0.12 M préparée dans un tampon acétate (0.1 M pH 5,0) pendant 5 min sous agitation douce. La réaction des POX avec le guaïacol est ensuite déclenchée par addition de 1 ml de H₂O₂ (1%). Le gel est ensuite incubé à 40 °C, jusqu'à l'apparition de zones de couleur rouge brique témoignant la présence de l'activité peroxydase, puis lavé à l'eau distillée et fixé dans une solution de méthanol-H₂O-acide acétique (5 : 5 : 1) (v/v/v). Les gels sont ensuite observés à l'aide de Image Scanner III (GE Healthcare).

2.2.5. Traitement des données

Les expériences ont été répétées 3 fois dans les mêmes conditions. Les données du potentiel osmotique et des pigments photosynthétiques ont été soumises à une analyse de la variance à un facteur à l'aide du logiciel XLSTAT 2016-Windows ; les moyennes ont été comparées selon la méthode de Newman et Keuls et ont été exprimées en (moyenne ± SE) au seuil de signification de 5%.

A partir des zymogrammes obtenus, nous avons évalué la variabilité génétique selon les principes avancés de Pasteur *et al.*, (1987) et Wendel et Weeden, (1989). Pour chaque système enzymatique observé chez les 10 génotypes étudiés, nous avons préconisé son déterminisme génétique en tenant compte du nombre et du niveau de migration des bandes, de la structure quaternaire de l'enzyme, de la fréquence allélique par locus et du taux de polymorphisme. Les profils électrophorétiques des CAT, SOD et GPOX ont été scorés et la présence d'une bande (1) ou l'absence (0) a été enregistrée dans une matrice binaire et analysée par le logiciel XLSTAT 2016-Windows, basé sur le coefficient de similarité de Jaccard. Le dendrogramme de similarité a été construit en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair group Method using arithmetic Averages).

2.3. Etude de l'expression des gènes de CAT, SOD et POX en réponse au stress hydrique par RT-PCR quantitative

2.3.1. Dispositif expérimental et conditions de culture

Les graines de blé dur sont triées et désinfectées par un lavage avec une solution d'hypochlorite de calcium (1%) et d'éthanol (70%) pendant 15 à 20 mn. Après plusieurs

rinçages à l'eau déminéralisée, les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri, sur du papier imbibé d'eau, à l'obscurité et avec un taux d'humidité de 100% pendant 5 jours. Les plantules sont transférées dans des godets en plastiques contenant du terreau universel (une graine / pot), et sont ensuite placés sous serre ($23 \pm 0,5$ °C, 70 ± 5 % d'humidité relative), en conditions de jours longs (16 h lumière /8 h obscurité) et avec une densité de flux de photons utiles à la photosynthèse de $100 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les plantes sont arrosées régulièrement (un jour sur deux) et sont réparties en 2 lots : un lot pour les plantes témoins, et un deuxième pour l'étude de l'effet du stress hydrique.

Le déficit hydrique a été induit par l'application d'une solution de polyéthylène glycol (PEG-6000). Des plantes âgées de 4 semaines environ sont arrosées avec une solution de PEG 6000 (20%), soit un potentiel hydrique de -0,49 MPa. Le traitement a duré 10 jours, à ce stade, les plantes présentent un flétrissement marqué. Pour chaque type de plante étudiée (témoin et stressée), 3 répétitions biologiques sont réalisées.

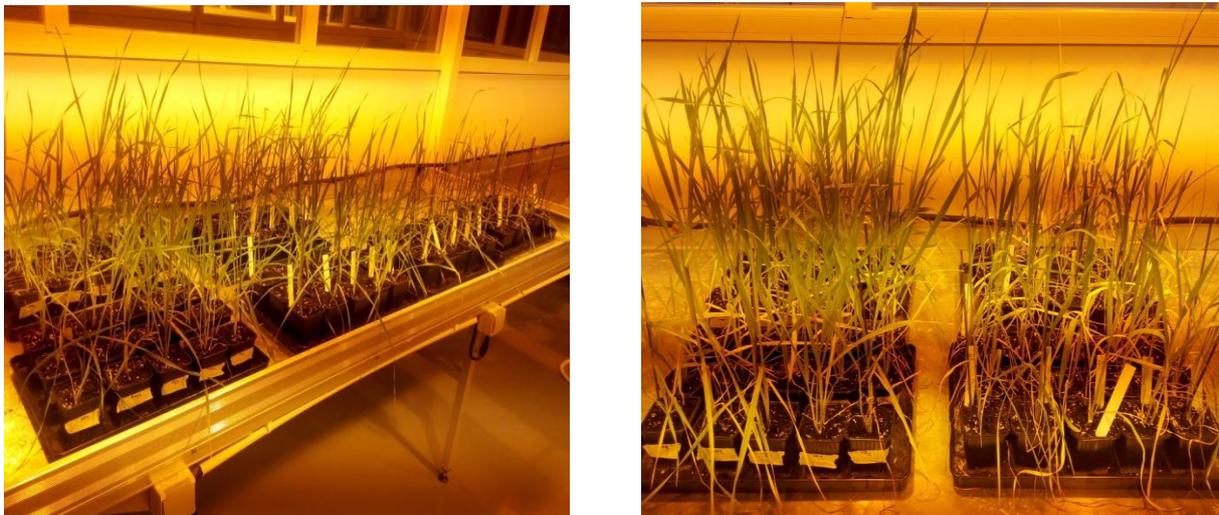


Figure 27 : Dispositif de culture sous serre

2.3.2. Echantillonnage des feuilles

Pour chaque plante témoin et chaque plante stressée au stade 4^{ème}-5^{ème} feuilles, un prélèvement est réalisé : la feuille est excisée avec des ciseaux puis placée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, plongé directement dans l'azote liquide. Chaque prélèvement est ensuite broyé à froid à l'aide d'un mortier dans de l'azote liquide empêchant ainsi tout réchauffement

des tissus pouvant être à l'origine de la dégradation des ARN par les ARNases. La poudre récupérée est replacée dans son tube d'origine et stockée dans un congélateur à -80°C jusqu'à son utilisation.

2.3.3. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN est réalisée avec un Kit nucleospin[®]RNA de Macherey-Nagel en suivant les recommandations du fabricant. Le principe de ce Kit est basé sur la fixation sélective de l'ARN sur une membrane (gel de silice) contenue dans une colonne centrifugeable. Le protocole est détaillé en annexe 1.

2.3.4. Analyse qualitative et quantitative des ARN totaux extraits

Les ARN purifiés sont quantifiés en déposant $1\mu\text{l}$ d'échantillon sur un spectrophotomètre Nanodrop (1000 Thermo Scientific, Wilmington, USA). Pour considérer un échantillon pur en ARN, le rapport $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ doit être compris entre 1,8 et 2,0 ; un rapport inférieur à 1,8 traduit généralement une contamination en protéines. D'après les résultats du contrôle au Nanodrop (Annexe 2), le degré de pureté des ARN des échantillons est bon.

L'intégrité des ARN totaux est vérifiée par migration électrophorétique sur des puces RNA nano LabChip avec le bioAnalyser 2100 (Agilent Technologies), fondé sur la migration de l'échantillon sur micropuce, présentant l'avantage de combiner visualisation qualitative et mesure quantitative rapide et automatisée. Quatre pics représentant les ARN ribosomiaux (pour les cellules foliaires) : 25S et 18S du cytoplasme, 23S et 16S des chloroplastes sont visualisés sur l'électrophorégramme (Figure 28). La valeur numérique du RIN (RNA Integrity Number) calculée à partir du profil électrophorétique de chaque échantillon permet d'estimer le taux d'ARNm dégradé sur la base d'un système de numérotation de 1 à 10 : 1 étant le profil le plus dégradé et 10 le plus intact. Les ARNs ayant un RIN proche ou supérieur à 7 (Annexe 3) sont conservés à -20°C pour la suite des manipulations, les autres ARN (les moins bons) sont ré-extraits.

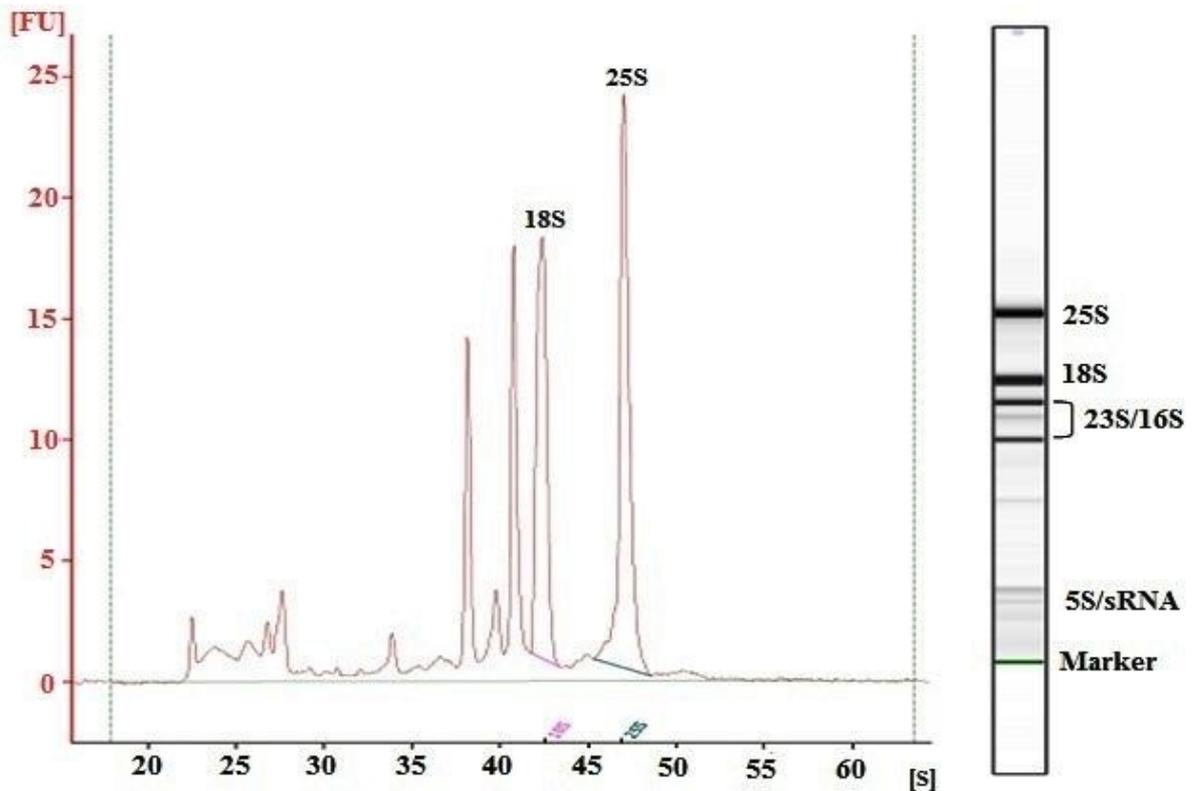


Figure 28 : Profil de migration des ARN totaux de blé dur

2.3.5. Transcription inverse

La transcription inverse est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux avec le kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche), selon le protocole du fournisseur (Annexe 4). L'ADNc obtenu est ensuite dilué au 1/10^{ème} avant d'être utilisé dans les expériences de PCR quantitatives.

2.3.6. PCR quantitative en temps réel

2.3.6.1. Principe de la technique

La PCR quantitative permet d'accéder de façon précise et spécifique au niveau d'expression d'un gène dans un échantillon d'ARN totaux donné. Elle repose sur la possibilité de suivre au cours du temps « en temps réel » le processus de PCR à l'aide d'un émetteur fluorescent formé pendant l'amplification, dont le signal d'émission est proportionnel à la quantité d'amplicons formés.

La méthode utilisée est le système SYBRTM Green I qui est une molécule fluorescente se fixant préférentiellement sur la double hélice de l'ADN. À chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle PCR, le SYBR Green s'intercale entre les bases nucléotidiques de

l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets (Figure 29). Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. La quantification d'un échantillon s'effectue en déterminant le cycle seuil ou « cycle threshold » (Ct). Ce Ct marque le début de la phase exponentielle d'amplification. Cela correspond au nombre de cycles à partir duquel le produit formé est distinct du « bruit de fond » (Figure 30). Plus un échantillon contiendra de séquences cibles, plus l'amplification sera importante et donc plus le nombre de cycles nécessaires pour atteindre le seuil sera faible. La valeur du Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN cible et peut servir à la comparaison des niveaux d'expression d'un gène entre les échantillons ayant subi différents traitements (Gibson *et al.*, 1996).

2.3.6.2. Recherche des gènes codants pour la SOD, POX, et la CAT chez le blé dur

Pour établir une liste de gènes candidats chez le blé dur, nous avons d'abord entrepris une recherche bibliographique approfondie. Les publications correspondantes ont été analysées avec l'objectif de sélectionner les gènes dont l'expression varie en conditions de stress hydrique et qu'au niveau des feuilles.

L'identification des gènes a été complétée par une approche bioinformatique au moyen des bases de données NCBI « National Center for Biotechnology Information » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Genevestigator (<https://genevestigator.com/gv/>) et PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>), cette dernière intègre une quantité de données sur les séquences de peroxydases.

Triticum durum n'étant pas une plante modèle dans la communauté scientifique, relativement peu de séquences étaient disponibles dans les banques de données informatiques. Parmi les gènes dont la séquence était accessible chez le blé dur : TdMnSOD (manganèse superoxide dismutase mitochondriale) et TdCAT1 (catalase de chloroplastes). Nous avons donc choisi de prendre comme référence le blé tendre (*Triticum aestivum*) qui représente l'espèce la plus proche du blé dur. Les séquences de gènes identifiées sont ensuite comparées aux séquences des banques de données en utilisant le logiciel BLAST (Basic Alignment Search Tool). Des alignements multiples ont été réalisés grâce au programme ClustalW afin de déterminer les zones divergentes entre des gènes proches lors de la conception des amorces de PCR et d'assurer un maximum de spécificité.

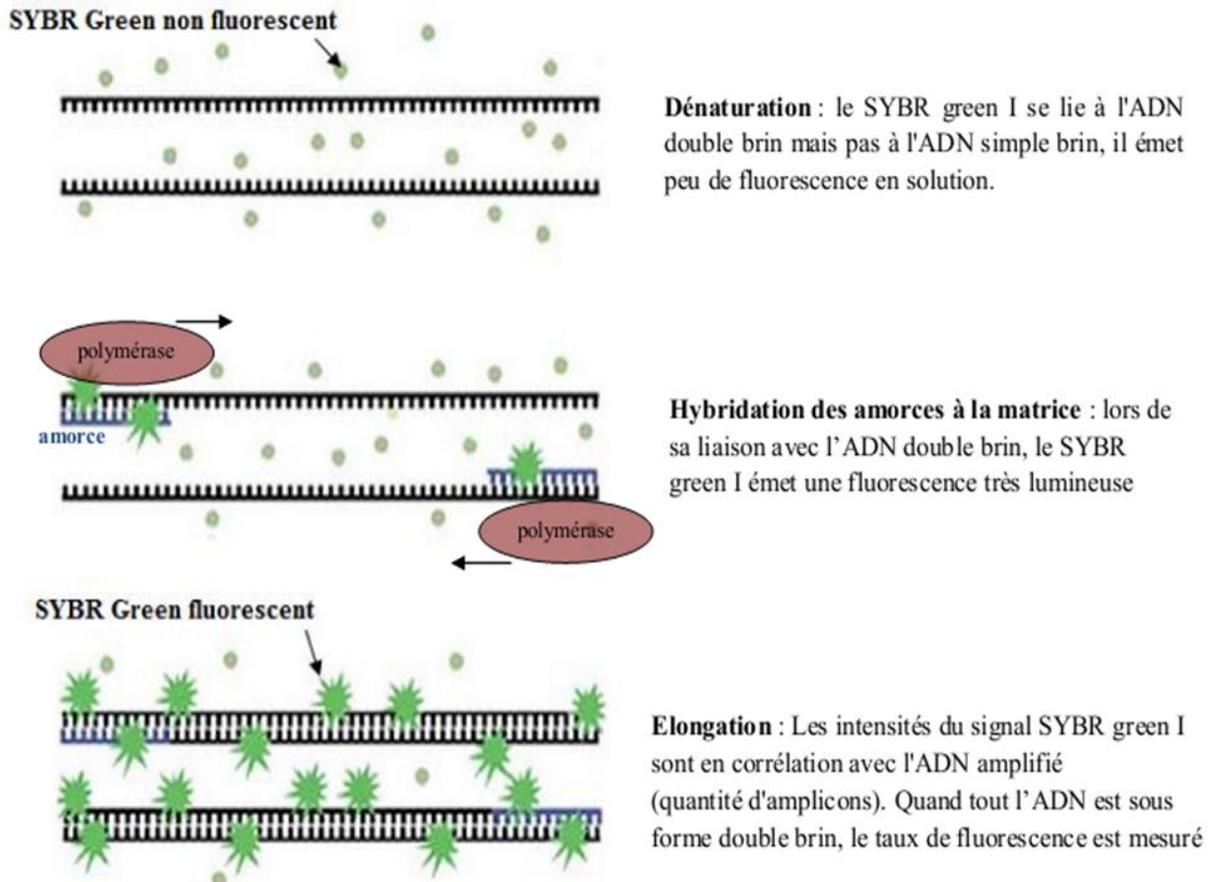


Figure 29 : Principe du SYBR Green I

2.3.6.3. Recherche de séquences des gènes de référence

La quantité totale d'ARN produite est fonction de multiples variables et une quantification satisfaisante peut être obtenue par comparaison avec un gène contrôle (ou « de référence ») (China *et al.*, 2002). Un gène de référence est un gène dont l'expression est stable dans toutes les conditions quel que soit le stade de développement ou le traitement appliqué et qui servira pour la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt. Du fait qu'il n'existe pas encore un gène de référence universel et que les gènes sont régulés différemment en fonction des conditions spécifiques, il est nécessaire de rechercher des gènes appropriés dans chaque situation de conception expérimentale (Bustin *et al.*, 2009).

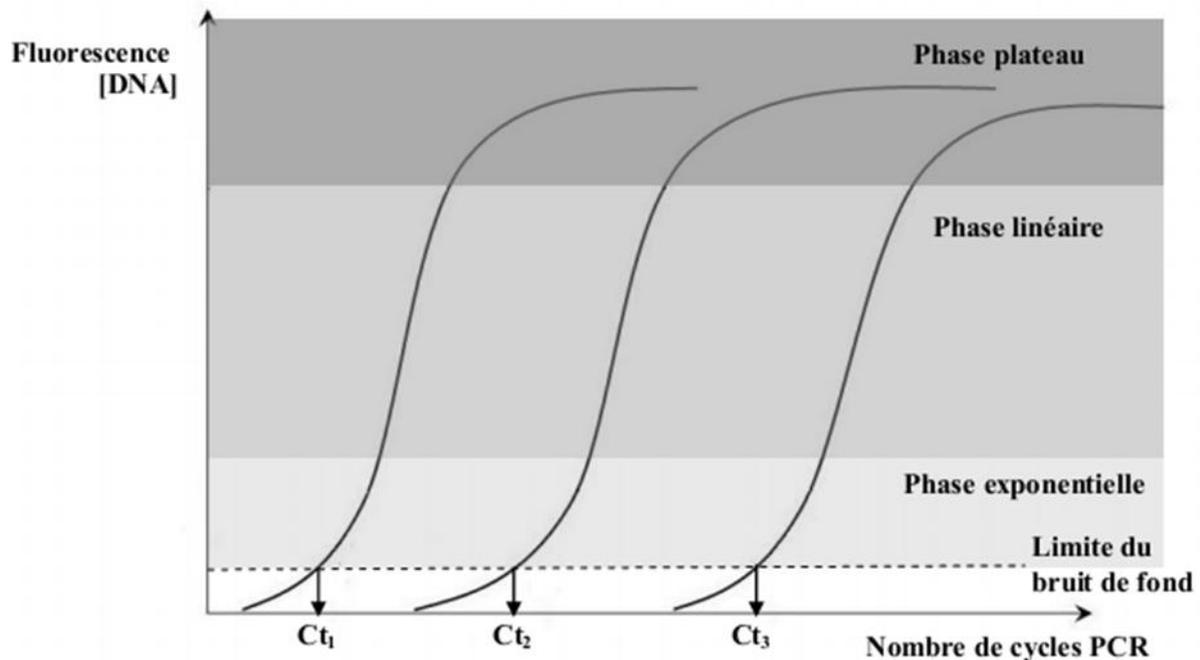


Figure 30: Modèle graphique de la PCR en temps réel.

La cinétique de la réaction PCR met en jeu 3 phases. Une phase exponentielle : la quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite. Une phase linéaire : le taux d'amplification diminue fortement et devient variable d'un échantillon à un autre. Une phase plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction deviennent limitants, le taux d'amplification décroît générant très peu d'amplicons. Le bruit de fond correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil Ct qui est le point de départ de la phase exponentielle et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon.

Le choix du gène de référence est effectué après amplification de plusieurs gènes et l'analyse des valeurs de cycle thresholds (Ct) obtenus. Nous avons ensuite sélectionné six gènes qui sont : l'actine (ACT) que l'on rencontre couramment dans la littérature, le facteur d'ADP-ribosylation (ADP-RF) (Singh *et al.*, 2014), le (TaFNR1) qui code pour la ferrédoxine-NADP(H) oxydoréductase, une importante enzyme appartenant à la famille des flavoprotéines (Tenea *et al.*, 2011), une protéine de contrôle de la division cellulaire (CDC) (Pérez *et al.*, 2011), une protéine ribosomale (26S) communément utilisée comme référence endogène (Ali-Benali *et al.*, 2005) et la Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (Vicente *et al.*, 2015). Des séquences nucléotidiques spécifiques correspondantes aux gènes d'intérêt et de référence sont identifiées chez *Triticum durum* et *Triticum aestivum* (Tableau 6).

Tableau 6 : Liste des gènes étudiés par RT-PCR quantitative

Gène	N°accession (Genbank)	Description	Remarque
ACT	GQ339780	Actin	Gène de référence, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
ADP-RF	AB050957	ADP-ribosylation factor	Gène de référence, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
TaFNRII	AJ457980	Ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase	Gène de référence, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
CDC	EU267938	Cell division control protein	Gène de référence, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
26S	M37274	Ribosomal RNA	Gène de référence, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
GAPDH	FN429985	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gène de référence, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
Pox3	X85229	Peroxidase	Gène cible, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
TaPrx107	AJ878510	Peroxidase	Gène cible, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
TaPrx115	AK332650	Peroxidase	Gène cible, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
TdCAT1	KP696753	Chloroplast catalase	Gène cible, espèce : <i>Triticum durum</i>
CATA	X94352	Catalase	Gène cible, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
CAT3	HQ860268	Catalase	Gène cible, espèce : <i>Triticum aestivum</i>
TdMnSOD	KP696754	Mitochondrial manganese superoxide dismutase	Gène cible, espèce : <i>Triticum durum</i>
SOD1.1	U69536	Cu/Zn superoxide dismutase	Gène cible, espèce : <i>Triticum aestivum</i>

2.3.6.4. Choix des amorces

Outre la grande attention qu'il est nécessaire d'apporter au choix du gène de référence, un autre point fondamental dans l'étude de l'expression génique par qRT-PCR : le choix des amorces. Il est préférable de rechercher à dessiner les amorces dans la région 3' de la séquence codante dite CDS « Coding DNA Sequence » du gène étudié selon plusieurs critères permettant une meilleure spécificité des amorces. En effet, les amorces ne doivent pas former des dimères d'amorces ni d'hybridations aspécifiques avec une séquence quelconque du génome au cours des cycles d'amplification. Ces amorces ont été définies à l'aide du logiciel en ligne Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) (Tableau 7), en choisissant de travailler sur des amplicons de petite taille (80 à 100 pb), à des températures de fusion (T_m) proche de 60°C et un taux en G et C compris entre 50 et 60%.

Tableau 7 : Gènes constitutifs, séquences des amorces sens et antisens et taille des produits amplifiés (en nombre de paires de bases)

Gène	N°accession (Genbank)	Amorce sens (5'-3')	Amorce antisens (5'-3')	Taille du produit amplifié (pb)
ACT	GQ339780	TATGTTCCCGGTATTGCTG	GCCACCACCTTGATCTTCAT	81
ADP-RF	AB050957	TTCATGGTTGGTCTCGATG	GGATGGTGGTGACGATCTCT	80
TaFNRII	AJ457980	GGCCCAGTGATCTTCACTTC	GCCTCGTCTACACCAACGAC	100
CDC	EU267938	CAGCTGCTGACTGAGATGGA	ATGTCTGGCCTGTTGGTAGC	77
26S	M37274	CCGTTGGTGTTAAAGGGAGA	TTGGCATAACAACCGGTACA	92
GAPDH	FN429985	TAGAACCGAGAAGGCTGCAT	CATAACCCATGATCCCCTTG	89
Pox3	X85229	CCTCTGGGAAGAAGGGATTC	GCTCAAGATCTGACCGGCTA	91
TaPrx107	AJ878510	AGCAACATGGACCTCCTCAC	GTGGCGGTCTCGATATCCT	92
TaPrx115	AK332650	CGAAGCTGAGGAAGGTCAAG	AGTCGGAGTTGAAGGTGACG	84
TdCAT1	KP696753	CCACCACAACAACCACTACG	TCGAACCTTGAGGGGAAGTA	81
CATA	X94352	GCAGTCACTGTCCCTGGAAT	GTGCCTTTGGGTATCAGCAT	84
CAT3	HQ860268	AGTGCGGCTTCAAGAACAAC	GTGGCGTGACGGGTAGTAGT	86
TdMnSOD	KP696754	CTGCATCCTTTGTTGGGAAT	CCACCTTCCAGATGTTGGTC	97
SOD1.1	U69536	GTTGGGAGAGCGTTTGTGT	CTTCCACCAGCATTTCCAGT	92

Des tests préliminaires ont été effectués pour chaque couple d'amorces, afin de vérifier la qualité de l'amplification ainsi que la spécificité des amorces. Ceci a été réalisé au moyen de la PCR quantitative faite sur des échantillons d'ADNc de 2 variétés. La spécificité de chaque amplification est contrôlée par une courbe de fusion (*melting curve*) à la fin de chaque PCR (Figure 31). L'observation d'un pic unique (courbe unimodale) par gène amplifié permet de s'assurer de l'amplification d'un seul produit PCR. Il est ainsi possible de distinguer, grâce à cette courbe, l'existence de plusieurs amplicons (courbe polymodale) signifiant un appariement non spécifique ou une formation de dimère d'amorces.

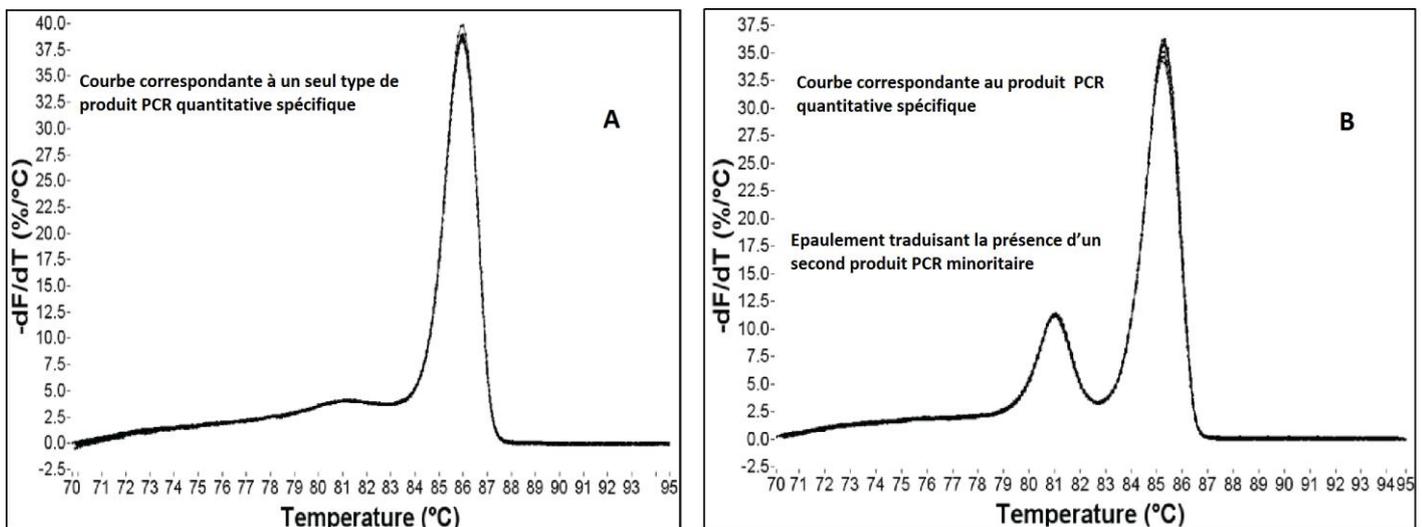


Figure 31 : Vérification de la pureté de l'amplicon produit grâce à la courbe de fusion « *melting curve* »
 La courbe de fusion traduit la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. En effet, l'ADN double brin est dénaturé très lentement jusqu'à ce que sa température de fusion caractéristique soit atteinte. Le SybrGreen est alors libéré dans le milieu réactionnel, ce qui se caractérise par une brusque chute de la fluorescence. Un amplicon donné présente une température de fusion spécifique (courbe A). 2 amplicons différents présentent des températures de fusion différentes (Courbe B). La dérivée première de la fluorescence $-dF/dT$ permet d'obtenir un pic unique, garant de la spécificité d'amplification et de l'absence de contamination.

2.3.6.5. Amplification de l'ADNc par RT-PCR quantitative

L'ADNc produit est quantifié par RT-PCR quantitative grâce à un appareil LightCycler 480 Instrument (Roche). Les réactions PCR ont été menées dans des plaques PCR à 384 puits (Roche). Dans chaque puit est déposé un mélange constitué de 4,6 μ l de Master mix Lightcycler 480 SYBR Green I Master (Roche), 0,5 μ l de couple d'amorces à 10 μ M, 2,1 μ l d'eau ultrapure et 2 μ l d'ADNc. Chaque échantillon est testé en dupliquât. La plaque est ensuite protégée par une feuille de scellage, puis centrifugée (*short run*) avec une centrifugeuse à plaques Eppendorf 5430.

Le programme PCR est constitué par 3 étapes distinctes :

- Une étape de dénaturation : 5 minutes à 95°C appelée étape de pré-incubation pour dénaturer l'ADN et activer l'enzyme.
- Une étape d'amplification de 45 cycles, avec pour chaque cycle : dénaturation 10 s à 95 °C, hybridation 20 s à 60 °C et élongation 15 s à 72 °C.
- Une étape de *melting curve* qui permet d'estimer la taille et le nombre de produits PCR : 5 s à 95 °C, 1 min à 65 °C et 97°C en fin de cycle.

L'acquisition et l'analyse des données de fluorescence ont été réalisées avec le logiciel LightCycler 480 Software (version 1.5).

2.3.6.6. Test d'efficacité des amorces et amplification

L'efficacité de PCR pour une paire d'amorces donnée est généralement déterminée grâce à une droite d'étalonnage de type $y = ax + b$. La pente (a) de cette droite permet de calculer l'efficacité de la PCR (E) selon la formule : $E + 1 = 10^{(-1/a)} - 1$. Pour réaliser cette droite, dont le coefficient de corrélation doit s'approcher le plus possible à 1, nous avons réalisé une gamme de dilutions de l'ADNc pour chaque couple d'amorces en triplicat (pur, 1/10^{ème}, 1/30^{ème}, 1/90^{ème}, 1/270^{ème}, 1/710^{ème}) suivie d'une amplification par qPCR. Seules les amorces qui ont une efficacité supérieure à 80 % sont validées pour quantifier l'expression des gènes dans chaque échantillon. Comme pour la quantification, les efficacités de chaque gène sont calculées à l'aide du logiciel LightCycler 480 Software (version 1.5).

2.3.6.7. Traitement des données

A la fin des réactions de qPCR, seules les amplifications ayant donné une seule courbe, donc un seul produit PCR, sont conservées. Sur l'ensemble des gènes étudiés, au vu des résultats obtenus, le gène *Pox3* a dû être écarté, en raison de la forme du pic de fusion particulièrement irrégulier (évasé), avec la présence d'un petit épaulement traduisant la présence d'un second produit PCR minoritaire dû probablement à la formation d'un dimère ou à un artefact.

Les données de PCR quantitative en temps réel sont normalisées à l'aide des gènes de référence pour réaliser une quantification relative. Ces derniers sont préalablement validés par le logiciel GeNorm Plus (Vandesompele *et al.*, 2002). GeNorm utilise un algorithme de calculs qui permet de déterminer les gènes de référence les plus stables à partir d'un ensemble de gènes de référence candidats testés dans un panel d'échantillons donné. Il mesure la

stabilité de l'expression du gène par comparaison deux à deux avec chaque autre gène, où une variation (V) de la transformation logarithmique du ratio obtenu est calculée. Ensuite, une moyenne de stabilité de l'expression de chaque gène, nommé « M » est établie à partir de la moyenne de ces variations avec les autres candidats. Une valeur M plus petite indique une meilleure stabilité du gène. Pour qu'un gène soit standard pour les traitements réalisés, son indice M doit être inférieur à 1,5. D'après les résultats présentés dans la figure 32, les 2 gènes de référence les plus stables sont ACT et TaFNRII. Dans la littérature, les gènes surexprimés ou sous-exprimés d'au moins un facteur 1,5 ou 2 sont considérés comme réellement modifiés. Nous avons fixé le seuil à 1,5 pour l'analyse.

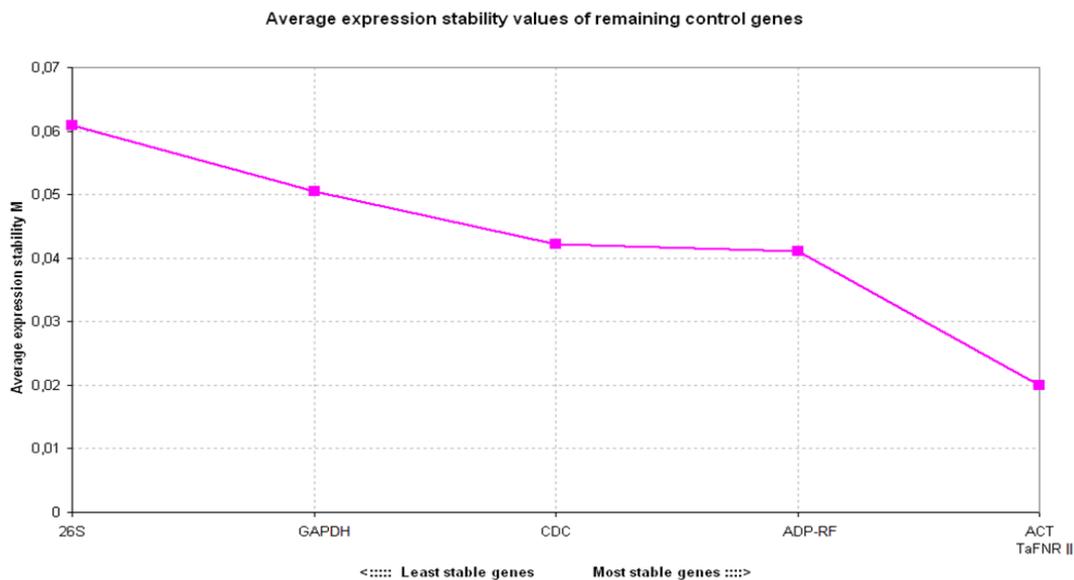


Figure 32 : Identification du gène ayant l'expression la plus stable pour les traitements réalisés selon le programme GeNorm

Les données présentées avec écarts types ont été analysées avec le logiciel Microsoft Excel. L'expression relative du gène cible par rapport au gène de référence est obtenue grâce à la formule suivante (Pfaffl *et al.*, 2001) :

$$\text{Expression relative} = E_c^{\Delta C_t} / E_r^{\Delta C_t}$$

E_c : Efficacité du gène cible

E_r : Efficacité du gène de référence

ΔC_t : Différence entre les valeurs des cycles seuils (CT) des 2 échantillons à comparer (témoins et stressés)

Chapitre III

Résultats et discussion

Chapitre III. Résultats et discussion

1. Activités enzymatiques et marqueurs du stress oxydatif en réponse à différents stress

L'objectif de cette première étude est de caractériser l'impact du stress oxydatif et d'évaluer la performance de différents cultivars de blé dur sous des conditions de stress hydrique, thermique et au paraquat, appliqué aux parties végétatives de la plante. Pour cela, nous avons choisi d'étudier plusieurs paramètres régulièrement utilisés dans la littérature pour caractériser l'état physiologique des plantes, à savoir : l'activité d'enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPOX) qui reflètent indirectement la production des ROS dans la plante, les biomarqueurs du stress oxydatif (taux de peroxydation lipidique, taux en H_2O_2 , stabilité membranaire) qui révèlent le niveau du stress oxydatif et la teneur en chlorophylle totale qui est très sensible à différents types de stress. Le choix des différents stress appliqués a été fait en raison de leurs effets directs sur l'accumulation des ROS. En effet, l'exposition des plantes à des contraintes environnementales telles que le stress hydrique ou les chocs thermiques conduit à la surproduction des ROS, très réactives et toxiques et qui causent des dommages à l'ADN, aux protéines, aux lipides, à la chlorophylle et à presque tout autre constituant organique de la cellule végétale. (Gill et Tuteja, 2010). Le paraquat (1,1'-diméthyl-4,4'-bipyridinium dichloride), est un herbicide, largement utilisé en application sur les feuilles pour étudier les dommages oxydatifs dans les chloroplastes qui sont causés par d'autres stress environnementaux (Zhao et Zhang, 2006). Dans la lumière, le PQ affecte le chloroplaste en catalysant le transfert d'électrons du photosystème I vers l'oxygène conduisant à la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et d'autres formes de ROS (Chiang *et al.*, 2008). Il affecte également la transduction des électrons dans le réticulum endoplasmique et dans les mitochondries (Alscher *et al.*, 2002).

Pour pouvoir, éventuellement, corrélérer les effets observés du stress oxydatif au statut hydrique de la plante, divers paramètres ont été quantifiés. Le contenu relatif en eau (RWC), le potentiel osmotique, la conductance stomatique, la température de surface foliaire et le rendement quantique maximal du photosystème II ont été déterminés.

1.1. Activité de la Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD a un rôle très important dans la tolérance au stress chez les plantes. Elle constitue une première ligne de défense contre les effets toxiques des niveaux élevés des ROS ou elle convertit le radical $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 (Gill et Tuteja, 2010). Pour chacun des 3 types de stress appliqués, une augmentation significative ($p < 0,05$) de l'activité SOD est enregistrée chez les 10 variétés étudiées. (Tableau 8). Elle est significativement plus importante chez les génotypes AGY, B17, OZ, et BOU (respectivement 3,79 fois supérieur ; 3,18 ; 2,78 et 2,6 fois) sous stress hydrique, (3,52 fois ; 3,17 ; 3,01 et 2,5 fois) avec paraquat et jusqu'à 2 fois plus sous stress thermique. Ces résultats suggèrent que ces génotypes ont une meilleure aptitude à éliminer les radicaux superoxydes. Les plus faibles activités sont enregistrées chez les génotypes COL, W, VIT et BEN.

Tableau 8 : Activité de la SOD ($U\ g^{-1}\ MF$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat

Génotype	Traitement						
	Témoins	Stress hydrique	% de changement	Stress avec paraquat	% de changement	Stress thermique	% de changement
OZ	5,91±0.99 ^a	16.45 ±0.9 ^c	178.32	17.83±0.46 ^c	201.73	12.05±0.29 ^b	103.97
COL	4.11±0.16 ^a	11.19±0.47 ^b	172.07	10.08±0.41 ^c	145.13	8.39±0.60 ^b	103.95
AGY	4.67±0.95 ^a	17.73±0.38 ^d	279.46	16.48±0.49 ^c	252.72	12.34±0.22 ^b	164.22
W	4.72±0.57 ^a	9.22±0.36 ^b	95.52	8.21±0.44 ^b	74.19	6.41±1.24 ^a	35.83
B17	5.51±0.50 ^a	17.55±0.59 ^c	218.30	17.50±0.51 ^c	217.40	14.07±0.35 ^b	155.28
BEL	6.95±1.49 ^a	15.93±0.53 ^c	129.28	14.88±0.18 ^c	114.20	12.42±0.47 ^b	78.74
VIT	4.67±0.3 ^a	10.71±0.98 ^c	129.53	10.11±0.29 ^c	116.72	7.33±0.49 ^b	57.01
BOU	6.64±1.57 ^a	17.27±1.21 ^d	160.04	16.64±0.75 ^c	150.51	11.95±0.69 ^b	79.91
BEN	4.02±0.30 ^a	7.32±0.58 ^b	82.16	7.71±1.14 ^c	91.79	5.71±0.15 ^b	42.00
DK	6.22±1.05 ^a	16.89±0.24 ^c	171.43	16.38±0.38 ^c	163.26	13.67±0.42 ^b	119.69

Les données représentent la moyenne ± SE de 3 répétitions. Les différents exposants dans chaque colonne expriment des différences significatives à $p < 0,05$

La SOD est l'un des principaux composants du système de protection cellulaire contre le stress oxydatif. L'augmentation de son activité est souvent synonyme de concentrations élevées de l'anion superoxide. Au cours de l'adaptation des plantes à l'accumulation des ROS, le taux de la SOD peut varier en fonction de l'espèce végétale, du stade de développement et du degré de l'effet de stress (Misalski *et al.*, 1998 ; Alscher *et al.*, 2002). Dans la présente étude, l'activité SOD varie selon le génotype étudié. Cela peut être dû à une sensibilité différentielle des isoformes de la même enzyme sous des conditions de stress. Les résultats de notre travail correspondent aux données disponibles dans la littérature selon

lesquelles l'activité de la SOD est associée à un renforcement de la protection contre les lésions oxydantes. Il a été rapporté que sous un stress hydrique (Sharma et Dubey 2005), thermique (Amirjani, 2012), ou avec paraquat (Chai *et al.*, 2005), l'activité de la SOD augmentent selon l'intensité du stress. D'après Badawi *et al.*, 2007 ; Hasheminasab *et al.*, 2012, plus le génotype a des activités SOD élevées en conditions de stress, plus il est tolérant au stress.

1.2. Activité de la catalase (CAT)

L'activité de la CAT a considérablement augmenté (à $p < 0,05$) dans les feuilles de blés soumis aux traitements de sécheresse, chaleur et PQ à l'exception de COL et de BEN (Tableau 9). Les plus faibles activités ont été observées chez les génotypes COL, W, VIT et BEN. OZ, AGY et BOU expriment une forte augmentation de l'activité CAT en condition de stress (2 fois plus que les témoins). Les activités les plus élevées ont été observées chez les génotypes B17, BEL et DK, ce qui suggère que leurs mécanismes de tolérance en termes d'élimination du H_2O_2 sont supérieurs par rapport aux autres génotypes.

Tableau 9 : Activité de la CAT ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat

Les données représentent la moyenne \pm SE de 3 répétitions. Les différents exposants dans chaque colonne expriment des différences significatives à $p < 0,05$

Génotype	Traitement						
	Témoins	Stress hydrique	% de changement	Stress avec paraquat	% de changement	Stress thermique	% de changement
OZ	17.15 \pm 3.60 ^a	40.85 \pm 1.64 ^c	138.19	37.2 \pm 0.57 ^c	116.91	29.11 \pm 0.72 ^b	69.74
COL	14.34 \pm 0.75 ^a	14.17 \pm 0.78 ^a	-1.19	14.06 \pm 0.45 ^a	-1.95	14.9 \pm 0.74 ^a	3.91
AGY	16.71 \pm 2.19 ^a	34.04 \pm 0.93 ^d	103.71	30.91 \pm 0.11 ^c	84.98	25.76 \pm 0.81 ^b	54.16
W	17.25 \pm 0.77 ^a	18.71 \pm 1.18 ^a	8.46	18.34 \pm 0.28 ^a	6.32	16.45 \pm 1.17 ^a	-4.64
B17	16.99 \pm 0.59 ^a	83.41 \pm 1.32 ^d	390.94	73.61 \pm 0.77 ^c	333.25	59.57 \pm 1.25 ^b	250.62
BEL	27.51 \pm 4.53 ^a	89.26 \pm 3.32 ^d	224.46	77.73 \pm 2.21 ^c	182.55	56.02 \pm 3.68 ^b	103.64
VIT	15.92 \pm 1.77 ^a	21.17 \pm 3.82 ^a	32.98	19.2 \pm 0.09 ^a	20.60	17.62 \pm 0.92 ^a	10.68
BOU	21.19 \pm 6.60 ^a	66.16 \pm 6.90 ^d	212.22	57.51 \pm 1.03 ^c	171.40	46.11 \pm 1.56 ^b	117.60
BEN	17.37 \pm 2.13 ^a	15.6 \pm 1.01 ^a	-10.19	15.83 \pm 0.12 ^a	-8.87	16.12 \pm 0.71 ^a	-7.20
DK	20.23 \pm 2.98 ^a	99.52 \pm 1.07 ^d	391.94	88.16 \pm 2.08 ^c	335.79	75.51 \pm 5.77 ^b	273.26

La CAT est une protéine constamment renouvelée dans les cellules foliaires, en particulier en conditions de stress, et est essentielle pour l'élimination du H_2O_2 produit par la photorépiration dans les peroxysomes (Noctor *et al.*, 2000). Dans cet organite, l' H_2O_2 est produit à partir de la β -oxydation des acides gras et de la photorespiration (Esfandiari *et al.*, 2007). Une activité élevée de la CAT diminue le niveau du H_2O_2 dans les cellules en le

décomposant directement pour former de l'eau et de l'oxygène, tout en augmentant la stabilité des membranes et la fixation du CO₂, car plusieurs enzymes du cycle de Calvin dans les chloroplastes sont extrêmement sensibles aux fortes concentrations d'H₂O₂. Velikova *et al.*, (2000), suggèrent que l'augmentation de l'activité CAT est étroitement liée à l'augmentation de la concentration intracellulaire du peroxyde d'hydrogène.

Dans ce travail, nous avons observé des variations significatives de l'activité de la CAT en réponse aux stress appliqués et selon le génotype étudié. Nos résultats sont cohérents avec d'autres études antérieures signalant l'augmentation de l'activité CAT en réponse au stress hydrique (Iqbal et Bano, 2009 ; Devi *et al.*, 2012), au stress thermique (Almeselmani *et al.*, 2006 ; Kumar *et al.*, 2012) et au traitement avec paraquat (Zhang *et al.*, 2013). Les génotypes possédant une activité CAT élevée montrent une meilleure tolérance au stress appliqué, évaluée par la mesure de la fuite des ions, du MDA et du H₂O₂. Une activité accrue de la CAT est liée à la capacité des plantes à tolérer les différents types de stress débouchant sur un stress oxydatif (Girardi, 2006).

1.3. Activité de la guaiacol peroxydase (GPOX)

La GPOX est nettement stimulée par les 3 types de stress avec des activités 3 à 4 fois supérieures à celles des plantes témoins, allant même jusqu'à 5 fois plus chez les génotypes B17 et DK (Tableau 10). L'analyse de variance révèle des différences significatives ($p < 0,05$) entre les variétés étudiées. Les génotypes B17, BEL et DK expriment les activités les plus élevées ce qui concorde avec la constatation que ces 3 variétés sont plus tolérantes au stress oxydant, suivis des génotypes OZ et AGY où l'activité GPOX est relativement élevée (4 fois plus que les témoins). Les plus faibles activités ont été enregistrées chez COL, W, VIT, BEN, et BOU montrant une diminution de la capacité redox face au stress oxydatif.

Une augmentation significative de l'activité de la GPOX en conditions de stress, utilisant le guaiacol comme substrat artificiel, indique la formation de grandes quantités d'H₂O₂ dans les feuilles des plantes. Elle reflète les changements des propriétés mécaniques et de l'intégrité de la membrane cellulaire des feuilles de plantes en conditions de stress (Ekmekci et Terzioglu, 2005).

Tableau 10: Activité de la GPOX ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MF}$) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat

Génotype	Traitement						
	Témoins	Stress hydrique	% de changement	Stress avec paraquat	% de changement	Stress thermique	% de changement
OZ	2.77±0.33 ^a	9.93±0.12 ^d	258.48	9.21±0.26 ^c	232.49	7.04±0.12 ^b	154.15
COL	1.12±0.37 ^a	3.25±0.41 ^b	190.18	3.27±0.3 ^b	191.96	1.94±0.17 ^a	73.21
AGY	1.63±0.11 ^a	9.51±0.45 ^c	483.44	7.86±0.42 ^b	382.21	7.36±0.19 ^b	351.53
W	1.42±0.68 ^a	4.48±0.51 ^c	215.49	3.39±0.29 ^b	138.73	2.25±0.14 ^a	58.45
B17	3.275±0.79 ^a	16.53±1.88 ^c	404.73	14.85±0.69 ^{bc}	353.44	12.94±0.26 ^b	295.11
BEL	3±0.73 ^a	13.98±0.65 ^c	366.00	12.57±0.04 ^b	319.00	13.96±0.38 ^c	365.33
VIT	1.2±0.12 ^a	3.027±0.06 ^c	152.25	3.07±0.02 ^c	155.83	1.81±0.32 ^b	50.83
BOU	2.93±0.18 ^a	6.08±0.81 ^b	107.51	5.55±0.2 ^b	89.42	3.95±0.2 ^a	34.81
BEN	1.24±0.33 ^a	3.64±0.28 ^c	193.55	3.3±0.1 ^c	166.13	1.79±0.27 ^b	44.35
DK	3.94±0.66 ^a	16.16±0.31 ^d	310.15	14.97±0.15 ^c	279.95	12.55±0.3 ^b	218.53

Les données représentent la moyenne \pm SE de 3 répétitions. Les différents exposants dans chaque colonne expriment des différences significatives à $p < 0,05$

Ces tendances à l'augmentation de l'activité GPOX en conditions de stress hydrique sont cohérentes avec les données publiées sur le blé dur (Huseynova *et al.*, 2015) et le blé tendre (Shao *et al.*, 2007a). Gulen et Eris (2004) ont montré que les activités de peroxydases totales et spécifiques étaient significativement augmentées par des températures élevées. L'étude faite par Ekmekci et Terzioglu en 2005, a montré une augmentation de l'activité GPOX chez des variétés tolérantes et sensibles de blé tendre soumises à un stress au paraquat. L'activité GPOX varie considérablement selon les espèces végétales et les conditions de stress. Cependant les POX diffèrent dans la spécificité du substrat, qui est associée à un changement dans la charge et la configuration de l'enzyme et du substrat à différentes valeurs de pH (Huseynova *et al.*, 2015). L'utilisation d'un substrat unique de révélation colorimétrique comme le guaïacol ne permet pas de tenir compte des spécificités de chacune des isozymes exprimées dans la plante. Une caractérisation plus poussée de ces enzymes devrait donc être entreprise afin de mieux comprendre leur implication dans la tolérance au stress oxydatif.

1.4. Teneur en Malondialdéhyde (MDA)

Les différents stress appliqués ont augmenté la concentration du MDA dans les cellules foliaires des plantes étudiées (Tableau 11). Cette augmentation est hautement significative pour les 3 types de stress par rapport aux plantes témoins sauf chez les génotypes Bidi17, BEL et DK. Le MDA, un produit issu de la peroxydation des lipides membranaires, est

Chapitre III. Résultats et discussion

considéré comme étant un marqueur des lésions par oxydation (Zhang et Kirkham, 1996) et une augmentation de sa concentration indique que l'induction du stress oxydant a réussi. L'accumulation maximale de MDA a été enregistrée chez les géotypes COL et VIT, suivie de près par W et BEN avec les 3 traitements appliqués indiquant des dommages oxydatifs de la membrane. Des différences minimales dans la production de MDA sont enregistrés chez les géotypes Bidi17, BEL et DK ; On peut en déduire que ces variétés sont plus tolérantes aux lésions oxydatives. Les géotypes AGY, OZ et BOU présentent une accumulation intermédiaire de MDA dans les conditions de stress.

Tableau 11 : Concentration du malonaldéhyde (MDA) (nmol g⁻¹ MF) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat

Géotype	Traitement						
	Témoins	Stress hydrique	% de changement	Stress avec paraquat	% de changement	Stress thermique	% de changement
OZ	24.7±3.72 ^a	47.28±1.85 ^c	91.42	47.3±3.72 ^c	91.50	33.21±4.94 ^b	34.45
COL	19.35±6.45 ^a	90.01±6.88 ^c	365.17	81.58±3.48 ^c	321.60	55.88±4.92 ^b	188.79
AGY	17.18±4.92 ^a	53.65±7.99 ^b	212.28	55.9±2.47 ^b	225.38	24.71±1.88 ^a	43.83
W	21.5±3.72 ^a	79.53±6.71 ^c	269.91	79.56±2.45 ^c	270.05	45.13±5.57 ^b	109.91
B17	15.03±4.94 ^a	23.63±1.88 ^a	57.22	23.63±4.92 ^a	57.22	17.18±1.88 ^a	14.30
BEL	21.5±3.72 ^a	29.01±3.23 ^a	34.93	27.93±1.85 ^a	29.91	23.65±3.72 ^a	10.00
VIT	33.31±1.85 ^a	94.6±3.72 ^c	184.00	91.9±1.6 ^c	175.89	53.73±6.71 ^b	61.30
BOU	23.63±4.92 ^a	49.43±8.13 ^b	109.18	42.45±3.35 ^{b,c}	79.64	32.23±3.23 ^{a,b}	36.39
BEN	23.63±1.88 ^a	75.23±6.72 ^c	218.37	69.86±4.92 ^c	195.64	42.48±5.60 ^b	79.77
DK	20.41±1.85 ^a	30.08±1.88 ^b	47.38	30.1±3.72 ^b	47.48	23.63±1.88 ^a	15.78

Les données représentent la moyenne ± SE de 3 répétitions. Les différents exposants dans chaque colonne expriment des différences significatives à $p < 0,05$

La peroxydation des lipides est considérée comme étant le processus dommageable le plus connu qui se produit dans chaque organisme vivant sous conditions de différents stress (Hasheminasab *et al.*, 2012). Ainsi, un taux élevé de MDA est généralement accepté comme un indicateur de stress oxydatif sévère (El-Tayeb, 2005) qui est lié à la peroxydation des acides gras polyinsaturés dans les membranes cellulaires, libérant ainsi des radicaux libres (Mustafa, 1990). L'augmentation de la teneur en MDA sous conditions de stress hydrique indique que ce dernier a renforcé le métabolisme lipidique oxydatif dans les feuilles, suggérant une relation entre le stress hydrique et le stress oxydatif (Munné-Bosch *et al.*, 2001). Des travaux de (Tartoura, 2010 ; Hameed *et al.*, 2011 ; Yan et Shi, 2013) ont également signalé une augmentation de la teneur en MDA chez le blé sous conditions de stress hydrique. Le stress thermique a également entraîné des changements importants dans la

teneur en MDA. Ceux-ci sont dus à une altération des fonctions mitochondriales, entraînant ainsi à l'induction de lésions oxydantes qui se manifestent dans la peroxydation lipidique, détectée par la teneur en malondialdéhyde (Larkindale et Knight, 2002 ; Vacca *et al.*, 2004). Savicka et Škute (2010) ont montré que la teneur en MDA augmente significativement chez des semis de blé tendre traités avec des températures létales. D'après Hernández et ses collaborateurs (2000) et Amirjani (2012), les lésions membranaires dues à des températures élevées sont liées à l'augmentation de la production des ROS hautement toxiques.

D'après nos résultats (Tableau 11), le traitement avec le PQ induit un stress oxydatif plus sévère que le stress thermique où la teneur en MDA atteint une valeur maximale, approximativement 4 fois plus que celle des plantes témoins chez les géotypes COL, VIT, W et BEN. Le traitement avec PQ conduit à la production des radicaux libres hautement toxiques générés par la réaction de l'oxygène moléculaire avec les radicaux du PQ formés dans le chloroplaste pendant la photosynthèse (Dodge, 1971). Il augmente également la perméabilité de la membrane et le contenu du MDA avec une diminution du contenu des acides gras polyinsaturés, indiquant une augmentation des réactions de la peroxydation lipidique (Chang et Kao, 1997). Conformément à nos résultats, les effets significatifs du paraquat sur la teneur en MDA ont été rapportés par plusieurs auteurs (Ananieva *et al.*, 2002 ; Ekmekci et Terzioglu, 2005 ; Zhang *et al.*, 2013). Ekmekci et Terzioglu (2005) ont noté une augmentation significative des teneurs en MDA et des fuites d'électrolytes dans les feuilles de géotypes de blé sauvage et cultivé traités avec des doses croissantes de paraquat.

1.5. Teneur en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La valeur seuil d'H₂O₂ au niveau cellulaire est considérée comme un facteur de stress indirect pour la mise en place de dommages oxydatifs (Mandal *et al.*, 2013). La toxicité d'H₂O₂ est principalement liée à sa capacité de produire le radical [•]OH durant les réactions de Fenton et d'Haber–Weiss. Parallèlement aux changements dans la concentration en MDA, une augmentation significative ($p < 0,05$) de la teneur en H₂O₂ a été enregistrée dans les feuilles du blé dur traitées avec les 3 types de stress (Tableau 12). C'est le stress hydrique et le stress avec paraquat qui affectent le plus la teneur en H₂O₂. En termes d'accumulation d'H₂O₂, les variétés COL, W, VIT et BEN ont enregistré les plus fortes valeurs, ce qui indique une fois de plus que ces variétés sont plus sensibles aux dommages oxydatifs, tandis que B17, BEL et DK ont enregistré les valeurs les plus basses, montrant une plus grande tolérance au stress oxydatif. Cependant, les géotypes OZ, AGY et BOU ont enregistré une légère augmentation de la teneur en H₂O₂. Des résultats similaires concernant l'accumulation

d'H₂O₂ ont été rapportés chez le haricot sous stress hydrique (Zlatev *et al.*, 2006), le blé tendre sous stress thermique (Kumar *et al.*, 2012) ainsi que chez le blé d'hiver traité avec le paraquat (Okuda *et al.*, 1992).

Tableau 12: Teneur en H₂O₂ (nmol g⁻¹ MF) dans les feuilles de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat

Génotype	Traitement						
	Témoins	Stress hydrique	% de changement	Stress avec paraquat	% de changement	Stress thermique	% de changement
OZ	24.57±1.38 ^a	36.41±4.03 ^c	48.19	34.44±0.62 ^{bc}	40.17	30.43±0.84 ^b	23.85
COL	28.44±2.6 ^a	59.36±1.12 ^c	108.72	57.41±0.62 ^c	101.86	39.25±0.54 ^b	38.01
AGY	18.03±1.80 ^a	30.48±3.49 ^c	69.05	29.12±0.34 ^c	61.51	22.68±1.09 ^b	25.79
W	28.22±1.62 ^a	59.64±3.11 ^d	111.34	55.65±0.24 ^c	97.20	37.36±0.24 ^b	32.39
B17	19.79±0.71 ^a	24.98±1.09 ^c	26.23	24.07±0.8 ^c	21.63	21.18±0.2 ^b	7.02
BEL	24.38±1.27 ^a	32.55±0.55 ^c	33.51	31.48±0.43 ^c	29.12	27.04±0.76 ^b	10.91
VIT	31.59±0.65 ^a	67.72±1.01 ^d	114.37	66.12±0.76 ^c	109.31	40.79±0.77 ^b	29.12
BOU	24.19±0.79 ^a	41.35±0.38 ^c	70.94	40.57±0.47 ^c	67.71	32.39±0.33 ^b	33.90
BEN	30.57±0.77 ^a	49.74±2.07 ^c	62.71	51.33±0.48 ^c	67.91	37.99±1.24 ^b	24.27
DK	18.09±3.19 ^a	26.29±0.47 ^b	45.33	25.13±0.47 ^b	38.92	19.76±3.03 ^a	9.23

Les données représentent la moyenne ± SE de 3 répétitions. Les différents exposants dans chaque colonne expriment des différences significatives à p < 0,05

L'accumulation du peroxyde d'hydrogène, avec le radical superoxyde et le radical hydroxyle suite à un stress hydrique, thermique ou à la salinité, est la principale cause du stress oxydatif (Sairam et Srivastava, 2000). Hasheminasab et ces collaborateurs (2012), ont observé qu'une grande partie des lésions du blé tendre causées par exposition au stress hydrique est associée à des dommages oxydatifs de la membrane cellulaire. En effet, la fermeture des stomates provoquée par le stress hydrique prive les feuilles de dioxyde de carbone ce qui conduit à une accumulation du NADPH (Zlatev *et al.*, 2006). Ces conditions défavorables augmentent le taux des ROS tel que le radical superoxyde (O₂⁻) par une fuite accrue des électrons vers l'oxygène moléculaire pendant la photosynthèse et la photorépiration et l'H₂O₂ issu de la dismutation de l'O₂⁻ (Foyer *et al.*, 1994). Le peroxyde d'hydrogène est également généré en tant que messenger secondaire dans la signalisation de l'acide abscissique dans les cellules de garde (Pei *et al.*, 2000). En photorépiration, le H₂O₂ est produit à des taux très élevés par la réaction du glycollate oxydase dans les peroxysomes (Noctor *et al.*, 2000).

De nombreux travaux indiquent que le stress thermique augmente l'accumulation intracellulaire d'H₂O₂ dans les cellules végétales (Dat *et al.*, 1998, Volkov *et al.*, 2006 et Gür *et al.*, 2010). Selon Shao *et al.*, 2007b, des températures élevées (supérieures à 40 °C) désactivent les centres réactionnels du PSII, accompagnées par une accumulation d'H₂O₂ dans les chloroplastes conduisant à l'inhibition de la photosynthèse, ce qui se traduit par une réduction du flux d'électrons vers le CO₂ et une augmentation de la fuite d'électrons pour la formation d'O₂ et des ROS. L'augmentation du taux d'H₂O₂ chez les variétés étudiées traitées avec le paraquat corrobore les résultats de Ananieva *et al.*, (2002), qui ont attribué cette augmentation à l'interception des électrons de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques du PSI par le paraquat. Cette réaction entraîne la production de radicaux bipyridyles qui réagissent avec l'O₂ pour produire du superoxyde, puis, par une série de réactions, de l'H₂O₂ et le radical hydroxyle.

1.6. Libération relative d'électrolytes (REL)

Le degré d'altérations de la membrane a été évalué indirectement par la mesure de la conductivité des fuites de solutés à partir des cellules foliaires. La fuite d'électrolytes a été recommandée comme critère important pour l'identification de cultivars résistants au stress chez plusieurs espèces de cultures (Stevanović *et al.*, 1997). Pour chacun des 3 types de stress appliqués, une augmentation de la REL est enregistrée chez les 10 variétés étudiées qui diffèrent significativement ($p < 0,05$) d'une variété à une autre (Tableau 13) et semble être plus élevée chez COL, W, VIT et BEN en particulier dans les traitements par sécheresse et avec PQ, ce qui implique que ces génotypes ne pouvaient pas maintenir un statut antioxydant en conditions déficitaires. La libération relative d'électrolytes est moins importante chez les génotypes OZ, AGY et BOU, ce qui indique que la membrane plasmique chez ces derniers a subi moins de lésions. Les génotypes B17, BEL et DK présentent les plus faibles REL ce qui confirme encore une fois une meilleure capacité d'adaptation au stress oxydatif.

Tableau 13 : Libération relative d'électrolytes (%) dans les cellules foliaires du blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat

Génotype	Traitement						
	Témoins	Stress hydrique	% de changement	Stress avec paraquat	% de changement	Stress thermique	% de changement
OZ	6.07±0.41 ^a	12.03±1.21 ^c	98.19	11.79±0.16 ^c	94.23	8.06±0.16 ^b	32.78
COL	6.04±0.58 ^a	17.41±0.45 ^c	188.25	17.08±0.27 ^c	182.78	11.07±0.28 ^b	83.28
AGY	7.56±0.34 ^a	12.35±0.96 ^c	63.36	10.76±0.19 ^b	42.33	8.31±0.34 ^a	9.92
W	5.73±0.16 ^a	15.31±0.31 ^d	167.19	14.45±0.42 ^c	152.18	10.72±0.43 ^b	87.09
B17	5.51±0.06 ^a	11.35±1.16 ^b	105.99	10.44±0.48 ^b	89.47	6.49±0.24 ^a	17.79
BEL	7.39±0.76 ^a	10.64±0.47 ^b	43.98	10.35±0.35 ^b	40.05	8.21±0.2 ^a	11.10
VIT	6.91±0.57 ^a	18.03±0.56 ^d	160.93	16.79±0.3 ^c	142.98	12.36±0.44 ^b	78.87
BOU	7.17±0.65 ^a	12.86±0.49 ^d	79.36	11.38±0.32 ^c	58.72	9.11±0.06 ^b	27.06
BEN	6.35±0.27 ^a	15.34±0.39 ^c	141.57	15.11±0.34 ^c	137.95	11.39±0.4 ^b	79.37
DK	6.07±0.09 ^a	10.04±0.61 ^d	65.40	9.14±0.16 ^c	50.58	7.23±0.16 ^b	19.11

Les données représentent la moyenne ± SE de 3 répétitions. Les différents exposants dans chaque colonne expriment des différences significatives à $p < 0,05$

Une diminution de la stabilité de la membrane reflète l'étendue de la LPO causée par les ROS (Sairam et Srivastava, 2001). Nos résultats suggèrent fortement que la sécheresse, la chaleur et le traitement avec PQ peuvent induire une peroxydation lipidique entraînant une fluidité de la membrane et par conséquent une augmentation des fuites d'électrolytes cellulaires. Une faible fuite des électrolytes en conditions de stress hydrique reflète une meilleure intégrité de la membrane et une tolérance envers le stress oxydatif (Liu *et al.*, 2011). Deshmukh et ces collaborateurs (1991), suggèrent l'utilisation de la fuite d'électrolytes comme un indice pour le criblage de génotypes tolérants au stress hydrique et thermique chez le blé. Les travaux d'Ananieva *et al.*, (2002) ont démontré que les traitements avec le PQ augmentaient le taux d'H₂O₂, la teneur en MDA et la fuite d'électrolytes dans les feuilles de l'orge. Le test de fuite des ions est couramment utilisé dans diverses espèces végétales pour déterminer la tolérance face à de nombreux facteurs de stress tels que la sécheresse (Simova-Stoilova *et al.*, 2006 ; Masoumi *et al.*, 2010), les températures élevées (Yeh et Lin, 2003 ; Kesici *et al.*, 2013) et le PQ (Chai *et al.*, 2005 ; Ekmekci et Terzioglu, 2005).

1.7. Teneur en chlorophylle totale

Les variations de la teneur en chlorophylle totale des feuilles mesurée par SPAD (indice de la teneur en chlorophylle foliaire) sont présentées dans le tableau 14. Les traitements de la sécheresse et avec paraquat ont un effet plus significatif ($p < 0,05$) sur la teneur en

Chapitre III. Résultats et discussion

chlorophylle foliaire chez les variétés étudiées. Dans le cas du traitement à la chaleur, les plantes réagissent par une très faible perte de chlorophylle allant de 0,8 % chez DK à 17,4 % chez BEN. Les pertes de chlorophylle les plus élevées sont observées chez les génotypes COL, W, VIT et BEN, tandis que les génotypes Bidi17, BEL et DK présentaient les valeurs les plus minimales.

Tableau 14 : Taux de chlorophylle totale des cellules foliaires de blé dur sous conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat

Génotype	Traitement						
	Témoins	Stress hydrique	% de changement	Stress avec paraquat	% de changement	Stress thermique	% de changement
OZ	38.3±1.14 ^a	33.5±0.50 ^b	-12.53	34.1±0.20 ^b	-10.97	36.6±0.61 ^a	-4.44
COL	37.9±0.75 ^a	26.5±0.51 ^d	-30.08	28.2±0.17 ^c	-25.59	32.2±0.15 ^b	-15.04
AGY	38.6±0.81 ^a	33.4±0.40 ^d	-13.47	35.1±0.12 ^c	-9.07	37±1.00 ^b	-4.15
W	41.2±0.80 ^a	33.8±1.05 ^c	-17.96	34.8±0.95 ^c	-15.53	37.4±0.49 ^b	-9.22
B17	40.5±0.91 ^a	36.5±1.07 ^c	-9.88	37.9±0.55 ^b	-6.42	39.8±0.36 ^a	-1.73
BEL	43.2±0.40 ^a	39.8±0.26 ^b	-7.87	40.6±0.74 ^b	-6.02	43±0.23 ^a	-0.46
VIT	42.9±1.29 ^a	31.3±0.58 ^c	-27.04	32.5±0.40 ^c	-24.24	35.6±0.35 ^b	-17.02
BOU	39.9±0.91 ^a	34.9±0.40 ^c	-12.53	35.7±0.55 ^c	-10.53	37±0.36 ^b	-7.27
BEN	36.2±0.25 ^a	25.9±1.00 ^d	-28.45	28.1±0.36 ^c	-22.38	29.9±0.21 ^b	-17.40
DK	37.7±1.82 ^{a,b}	30.4±0.66 ^c	-19.36	35.6±0.70 ^b	-5.57	37.4±0.15 ^a	-0.80

Les données représentent la moyenne ± SE de 3 répétitions. Les différents exposants dans chaque colonne expriment des différences significatives à p < 0,05

La diminution du taux de chlorophylle en conditions de stress hydrique ou thermique est due en grande partie aux dommages causés au niveau des chloroplastes par les ROS tels que l'O₂⁻ et l'H₂O₂, ce qui peut conduire à une LPO et, par conséquent, à la destruction de la chlorophylle (Smirnoff, 1993 ; Foyer *et al.*, 1994). La teneur en chlorophylle a été utilisée dans plusieurs études pour détecter les différences génotypiques en réponse au stress thermique chez le blé. Balouchi (2010) a signalé des pertes de chlorophylle totale mesurée par SPAD chez des variétés de blé tendre soumise à des températures élevées pendant le stade végétatif. Ristic *et al.*, (2007) suggèrent que la perte de la chlorophylle est une conséquence des dommages causés par la chaleur au niveau des membranes des thylakoïdes et du PSII, après avoir exposé des plantes de blé tendre à de longues journées de stress thermique. En effet, en conditions de stress par chaleur, les constituants de la membrane des thylakoïdes de l'appareil photosynthétique sont facilement endommagés et l'efficacité quantique photosynthétique foliaire est réduite (Shao *et al.*, 2007b), ce qui augmente le degré de

réduction du transport des électrons photosynthétiques avec une production accrue des ROS (Bita et Gerats, 2013).

Plusieurs études ont signalé des dommages au niveau des pigments des feuilles en conditions de déficit hydrique (Nyachiro *et al.*, 2001 ; Moaveni, 2011, Bousba *et al.*, 2013). Cela s'explique par la fermeture des stomates et le manque de CO₂, associés à une production accentuée des ROS (Mascher *et al.*, 2005). De cette façon, le déficit en eau peut conduire à une sur-réduction de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques, entraînant des effets nuisibles telles que la photoinhibition et la photo-oxydation.

Le stress causé par le pesticide PQ est similaire au stress hydrique qui diminue la teneur en chlorophylle dans les feuilles (Caglar *et al.*, 2011). Le PQ conduit à la photoinhibition de la photosynthèse par la dégénérescence de l'activité du PSI dans les chloroplastes (Choi *et al.*, 2001). Des travaux similaires sur le blé tendre ont montré une diminution de la teneur en chlorophylle chez les plantes traitées avec des concentrations élevées de paraquat (Lascano *et al.*, 2003 ; Ekmekci et Terzioglu, 2005).

1.8. Suivi de paramètres physiologiques liés à l'état hydrique des plantes

1.8.1. Détermination du RWC

Le statut hydrique des feuilles des 10 variétés de blé dur soumises à un déficit hydrique est illustré dans la Figure 33. La teneur relative en eau (RWC, Relative Water Content) fluctue pour les feuilles des plantes témoins entre une valeur maximale de 95,11 % et une valeur minimale de 86,55 %, témoignant sur une parfaite hydratation des cellules. Sous le régime hydrique, on observe une chute du RWC chez l'ensemble des génotypes. Le pourcentage de réduction varie entre 13,15 % par rapport au témoin pour la variété BOU et 31,33 % pour la variété BEN. Les génotypes qui ont maintenu une RWC plus élevée en conditions de stress hydrique sont BOU, B17, OZ, BEL et AGY, ce qui reflète une meilleure aptitude à limiter les pertes en eau et donc une meilleure tolérance au stress hydrique. Les variétés ont ainsi répondu de manière uniforme au stress hydrique, mais à des degrés variés.

La teneur relative en eau des feuilles (RWC) est un indicateur important de l'état de l'eau dans les plantes ; il reflète l'équilibre entre l'approvisionnement en eau du tissu foliaire et le taux de transpiration (Lugojan et Ciulca, 2011). Le maintien d'une teneur en eau stable est une condition essentielle pour une croissance normale et un rendement élevé des plantes. Les résultats obtenus montrent que le stress hydrique appliqué diminue la RWC foliaire, ce qui corrobore plusieurs travaux signalant l'état hydrique des plantes de blé en conditions de stress hydrique (Ykhlef et Djekoun, 2000 ; Keyvan, 2010 ; Ganji Arjenaki *et al.*, 2012). L'analyse

de la variance de la teneur relative en eau montre un effet variétal significatif. Ceci peut être attribué soit aux différences entre les variétés dans le pouvoir de pompage de l'eau du sol par les racines, soit au pouvoir du contrôle stomatique des pertes d'eau par les surfaces évaporantes (Sassi *et al.*, 2012). Il peut être aussi attribué à des différences entre les variétés dans le pouvoir d'accumulation des métabolites et de l'ajustement osmotique pour le maintien de la turgescence cellulaire et les activités physiologiques (Bayoumi *et al.*, 2008). De nombreux travaux menés sur le blé dur indiquent que les valeurs de RWC en conditions de stress hydrique sont plus élevées chez les génotypes tolérants à la sécheresse (Sultan *et al.*, 2012 ; Aprile *et al.*, 2013 ; Habash *et al.*, 2014).

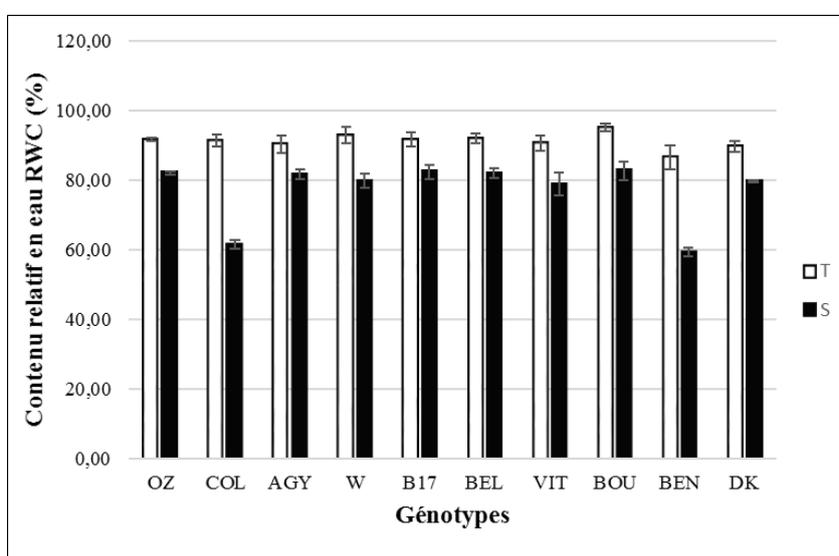


Figure 33 : Effet du déficit hydrique sur la teneur relative en eau (RWC) foliaire des 10 génotypes de blé dur.

T = Témoins, S = Stressés. Les données représentent la moyenne \pm SE de 3 répétitions

L'analyse de corrélation entre les paramètres physiologiques et biochimiques des 10 variétés de blé dur sous régime hydrique (Tableau 15) a permis de distinguer une forte corrélation négative ($p < 0,001$) entre la RWC et les biomarqueurs du stress oxydatif à savoir le MDA ($r = -0,769$), l' H_2O_2 ($r = -0,694$) et le REL ($r = -0,875$). Ceci suggère que l'intégrité de la membrane cellulaire est importante pour maintenir une teneur en eau élevée. La stabilité de la membrane cellulaire est très affectée par l'accumulation des ROS comme c'est indiqué par les niveaux accrus de MDA et de REL sous régime hydrique. Des recherches microscopiques sur des cellules déshydratées menées par Blackman et ses collaborateurs (1995), ont révélé des dommages au niveau des membranes dûs probablement à l'accumulation des ROS, ainsi

qu'une sédimentation du contenu cytoplasmique. Par ailleurs, une corrélation négative hautement significative est observée entre la RWC et la SOD ($r = -0,39$) ce qui suggère que l'induction de l'activité de cette enzyme coïncide avec l'augmentation correspondante des dommages oxydatifs au niveau de la membrane cellulaire. L'augmentation de l'activité SOD foliaire a été identifiée comme le premier indicateur du changement du statut redox en conditions de sécheresse (Schwanz et Polle, 2001). Elle intervient dans l'élimination du radical $O_2^{\cdot-}$, première ROS générée par le stress au niveau de la membrane des thylakoïdes.

1.8.2. Détermination du potentiel osmotique

Le stress hydrique provoque la mise en place d'un état de régulation hydrique de la plante qui se manifeste par la fermeture des stomates et par une régulation du potentiel osmotique (Slama *et al.*, 2005). En conditions normales, les plantes témoins affichent des potentiels osmotiques quasi équivalents et du même ordre, allant de -1,41 MPa chez la variété COL à -1,84 MPa chez la variété AGY. L'effet du déficit hydrique sur le potentiel osmotique (Figure 34) se traduit par un abaissement significatif ($p < 0,05$) chez les 10 génotypes étudiés. Cela s'explique par l'accumulation des solutés dans le cytosol, qui permet la rétention de l'eau et le maintien du potentiel hydrique à son niveau le plus bas. L'analyse de la variance montre que les génotypes BEL, DK, B17 et AGY, ont enregistré un potentiel osmotique le plus bas avec des chutes considérables de 81,36%, 77,21%, 64,15%, et 42,13% respectivement. Des résultats similaires concernant la baisse du potentiel osmotique en conditions déficitaires ont été rapportés chez le maïs (Ribaut et Pilet, 1991), le blé et l'*Aegilops* (Farooq et Azam., 2001), ainsi que l'orge (Samarah, 2005).

La chute du potentiel osmotique foliaire du blé dur, consécutive à l'application du stress hydrique, a été attribuée par certains auteurs (Bajji *et al.*, 2001 ; Slama *et al.*, 2005) à l'augmentation de la concentration des solutés dans la cellule. Parmi les osmorégulateurs les plus importants qui s'accumulent chez les céréales en conditions de déficit hydrique, on peut citer les sucres et un acide aminé important : la proline. Les sucres sont considérés par plusieurs auteurs comme de bons osmorégulateurs qui peuvent jouer un rôle important dans l'ajustement osmotique et l'adaptation des plantes à la sécheresse (Zhang *et al.*, 1999). L'accumulation de la proline est l'une des stratégies adaptatives fréquemment observée chez un grand nombre d'espèces en réponse au stress hydrique. Une corrélation négative entre cette accumulation et le PO a été rapporté dans de nombreux systèmes biologiques (Barker *et al.*, 1993 ; Slama, 2002 ; Levy *et al.*, 2006). Ce comportement est concomitant d'une capacité d'osmorégulation quand les plantes sont soumises à un déficit hydrique.

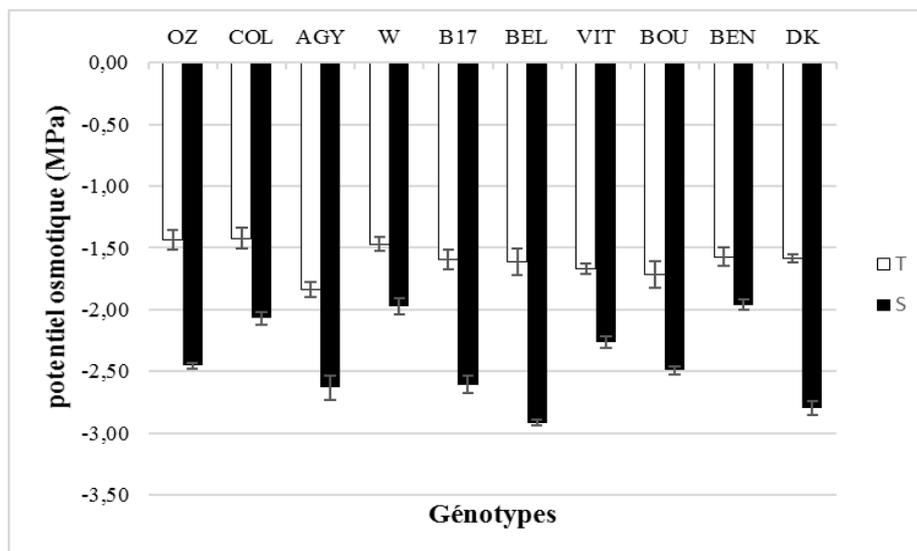


Figure 34 : Effet du déficit hydrique sur le potentiel osmotique foliaire (π) des 10 génotypes de blé dur. T = Témoins, S = Stressés. Les valeurs représentent des moyennes \pm SE (n= 3)

Une forte corrélation négative est observée entre le PO et les antioxydants enzymatiques (SOD : $r = -0,480$; CAT : $r = -0,503$; GPOX : $r = -0,456$) (Tableau 15). Cela peut être attribué au rôle de la proline dans la stabilisation des enzymes. En effet, il a été démontré que la proline peut fonctionner comme une molécule chaperonne capable de protéger l'intégrité des protéines et d'améliorer l'activité de certains enzymes (Rejeb *et al.*, 2012). Hoque *et al.*, (2007), ont rapporté que des activités d'enzymes antioxydantes à savoir la CAT, SOD et POX, ont été significativement améliorées par l'ajout de proline exogène dans une culture en suspension de tabac en conditions de stress salin. Des travaux de Islam *et al.*, (2009), ont montré que la proline et la bêtaïne confèrent une meilleure tolérance au stress de cadmium chez le tabac, en augmentant l'activité des SOD et des CAT, mais également en diminuant le taux de MDA. La corrélation négative ($r = -0,290$) obtenue dans cette étude entre le PO et la REL suggèrent une relation entre l'augmentation des osmotocums qui interviennent dans l'ajustement osmotique de la plante et la réduction des dommages oxydatifs. Plusieurs rapports ont indiqué que la proline intervient dans l'élimination des ROS (Smirnov et Cumbes, 1989 ; Okuma *et al.*, 2004 ; Chen et Dickman, 2005). Les études menées par Cuin et Shabala, (2007) et Ermias, (2013) ont montré une forte corrélation entre les marqueurs du stress oxydatifs (MDA et REL) et la proline, suggérant l'implication de cette dernière dans le balayage des ROS et la protection de la membrane cellulaire.

1.8.3. Détermination de la conductance stomatique

La fermeture des stomates, limitant la transpiration, est un moteur essentiel qui permet à la plante de se protéger lors d'un déficit hydrique. Pour les plants témoins, la conductance stomatique est de l'ordre de $0,62 \text{ scm}^{-1}$ à $0,66 \text{ scm}^{-1}$ (Figure 35), reflétant une transpiration favorable en raison d'une bonne alimentation hydrique. L'ANOVA montre une variabilité infraspécifique du comportement stomatique sous conditions déficitaires. En effet, la conductance stomatique diminue de manière significative ($p < 0,05$) après application du stress hydrique chez tous les génotypes. Cette diminution est plus importante chez les génotypes W, VIT, COL et BEN où les valeurs sont de $0,26$; $0,14$; $0,1$; $0,09 \text{ scm}^{-1}$ respectivement. Les génotypes BEL, DK, BOU, B17 et OZ ont une conductance stomatique supérieure aux autres ($> 0,4 \text{ scm}^{-1}$) témoignant l'aptitude de ces derniers à maintenir leurs stomates ouvertes.

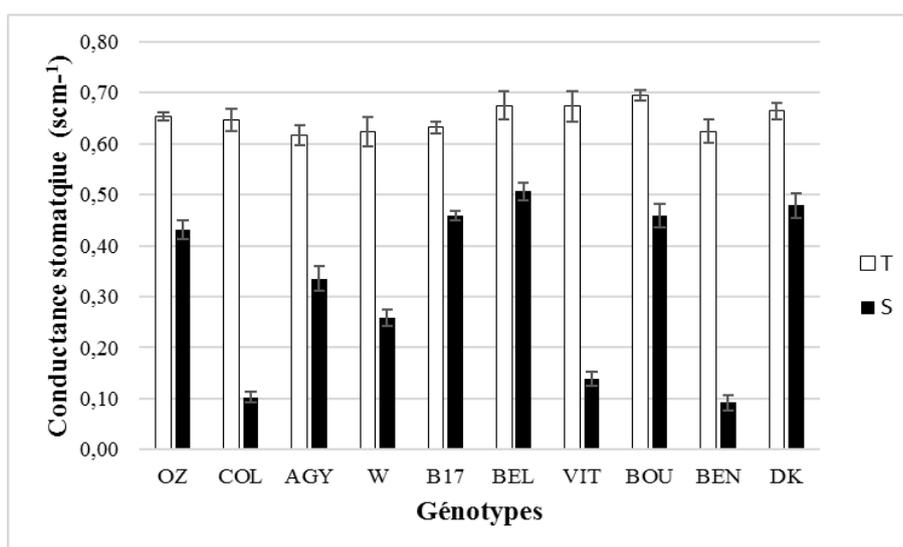


Figure 35 : Effet du déficit hydrique sur la conductance stomatique foliaire (g_s) des 10 génotypes de blé dur

T = Témoins, S = Stressés. Les valeurs représentent des moyennes \pm SE (n= 3)

La conductance stomatique révèle l'état d'ouverture des stomates et donc l'état transpiratoire de la plante. En cas de sécheresse, la plante ferme ses stomates pour éviter tout dommage, grâce à l'action d'une hormone, l'acide abscissique (Lovisolo *et al.*, 2010). Dans des conditions de limitation d'eau du sol et / ou d'une forte demande d'évaporation atmosphérique, une fermeture stomatique partielle ou complète permet aux plantes de maintenir un équilibre hydrique favorable (Vinya *et al.*, 2013). Nos résultats montrent un effet significatif du déficit hydrique sur la diminution de la conductance stomatique, ce qui a été rapporté par plusieurs travaux (Erchidi *et al.*, 2000 ; Liang *et al.*, 2002). Selon ces derniers,

les géotypes de blé dur ayant une conductance et une densité stomatique élevée, sont plus résistants à la sécheresse, en donnant le rendement en grains le plus satisfaisant.

En ajustant l'ouverture stomatique, les plantes peuvent contrôler la perte d'eau en réduisant le flux de transpiration, mais limitent simultanément l'entrée du dioxyde de carbone (CO₂). Cela aura des effets directs et indirects sur la réduction de la photosynthèse nette et sur la production globale de ROS par les plantes sous stress hydrique (Cruz de Carvalho, 2008). Effectivement, une forte corrélation négative très significative est observée entre la g_s et le MDA ($r = -0,914$), l'H₂O₂ ($r = -0,855$) et la REL ($r = -0,946$) (Tableau 15), indiquant une forte accumulation de ROS et de dommages oxydatifs au niveau de la membrane cellulaire. Plusieurs études confirment bel et bien la corrélation négative entre la g_s et la peroxydation lipidique des membranes sous stress hydrique (Riaz *et al.*, 2016) et stress salin (Anaya *et al.*, 2016). Comme il a pu être discuté au cours de ce chapitre, la synthèse d'H₂O₂ est due essentiellement à la fermeture des stomates par une fuite accrue d'électrons durant la photosynthèse et la photoréspiration (Foyer *et al.*, 1994). Cependant, d'autres recherches ont montré que l'ABA active la synthèse d'H₂O₂ dans les cellules de garde, par une NADPH oxydase liée à la membrane et que l'H₂O₂ médiate la fermeture stomatique en activant les canaux Ca²⁺ de la membrane plasmique (Pei *et al.*, 2000 ; Kwak *et al.*, 2003). Comme pour la teneur relative en eau, une corrélation négative hautement significative est observée entre la g_s et la SOD ($r = -0,426$). Ces résultats confirment la forte implication de cette enzyme dans la réponse au déficit hydrique.

1.8.4. Détermination de la température foliaire

La température de surface d'un couvert végétal est un bon indicateur du degré de réduction de son évapotranspiration. Les températures foliaires des plantes témoins enregistrées à l'aide du thermomètre infrarouge varient entre 18,9 ° C et 20,73 ° C (Figure 36). En conditions de stress hydrique, la température foliaire a augmenté de 2,42 ° C à 4,35 ° C pour l'ensemble des géotypes étudiés. Les résultats montrent des différences significatives variétales ($p < 0,05$). Ce sont les géotypes COL, W, et DK qui ont enregistré les températures les plus élevées (> 24 ° C). Les températures minimales sont enregistrées chez AGY, BEL et OZ avec des valeurs de 22,09 ; 22,6 et 22,72 ° C respectivement, indiquant une meilleure aptitude à maintenir un état hydrique favorable par une meilleure ouverture de stomates.

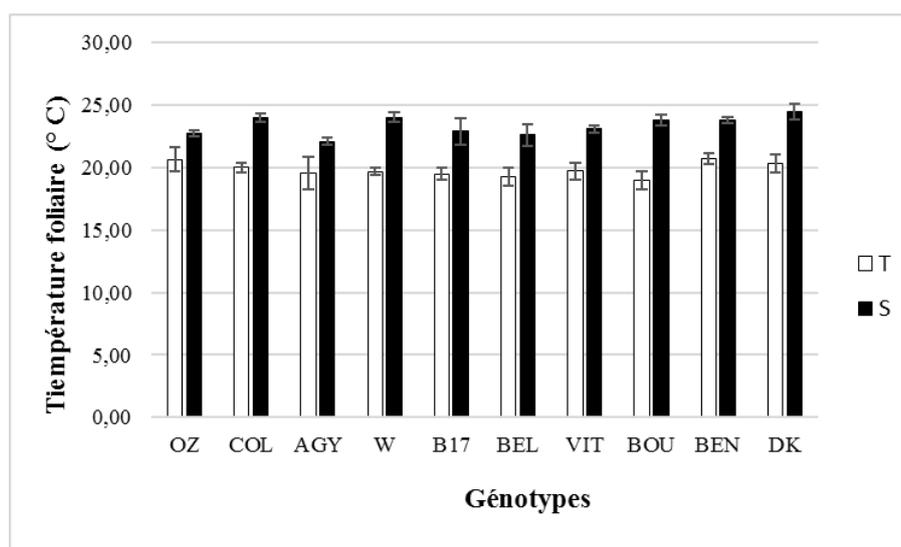


Figure 36 : Effet du déficit hydrique sur la température foliaire des 10 géotypes de blé dur
 T = Témoins, S = Stressés. Les valeurs représentent des moyennes \pm SE (n= 3)

Une des conséquences de la fermeture des stomates est la limitation des flux de gaz (sortie de l'eau mais aussi entrée/sortie de CO_2 et d' O_2) associée à l'accroissement de la dissipation sous forme thermique de l'énergie lumineuse en excès et à l'accroissement de la température foliaire (Faria *et al.*, 1998). Les résultats de notre étude montrent que les températures des feuilles de blé en conditions de stress étaient plus élevées de 2 à 4 °C que dans les conditions bien arrosées, ce qui est conforme aux résultats de Shahenshah et Isoda (2010) chez le coton et Siddique *et al.*, (2000) chez le blé, relevant un effet stress hydrique significatif sur la température foliaire. Selon Silva *et al.*, (2007), l'augmentation de la température foliaire de canne à sucre est plus importante chez les géotypes sensibles avec des taux d'élévation de 4 °C. D'après les résultats de la matrice de corrélation de Pearson (Tableau 15), une corrélation positive hautement significative est enregistrée entre la température foliaire et les marqueurs du stress oxydatif (MDA : $r = 0,648$; H_2O_2 : $r = 0,619$; REL : $r = 0,780$). Sans surprise, la température foliaire est aussi corrélée aux antioxydants enzymatiques étudiés (SOD : $r = 0,682$; CAT : $r = 0,5$; GPOX : $r = 0,561$). Cette corrélation peut être expliquée par les mécanismes résultants de la fermeture stomatique durant le stress hydrique, à savoir la diminution des échanges gazeux entraînant une diminution de l'activité photosynthétique, une accumulation des ROS et par conséquent une augmentation des activités enzymatiques antioxydantes (Cruz de Carvalho, 2008) et une augmentation de la température foliaire due à la dissipation de l'excès d'énergie emprisonnée dans la cellule (Siddique *et al.*, 2000).

1.8.5. Détermination du rendement quantique maximale (Fv/Fm)

Ce rapport est au maximum de 0,83 chez les plantes supérieures chez lesquelles le PSII n'a pas subi d'altérations (Maxwell et Johnson, 2000). Au niveau des plantes témoins, les Fv/Fm sont compris dans l'intervalle [0,817 – 0,827] ce qui reflète le bon fonctionnement du PSII (Figure 37). Pour l'ensemble des plantes étudiées, nous constatons que le déficit hydrique a réduit le Fv/Fm avec une baisse plus significative ($p < 0,05$) chez les géotypes COL et BEN (> 60%) suivi de VIT et W (> 42%) indiquant une photoinhibition associée à une sur-réduction du PSII (Maxwell et Johnson, 2000). Le Fv/Fm est moins affecté chez les géotypes B17, BEL, BOU, DK et AGY. La capacité à maintenir un Fv/Fm élevé en conditions de déficit hydrique chez ces derniers, traduit une meilleure efficacité d'utilisation des rayonnements pour la réaction photochimique et l'assimilation du CO₂.

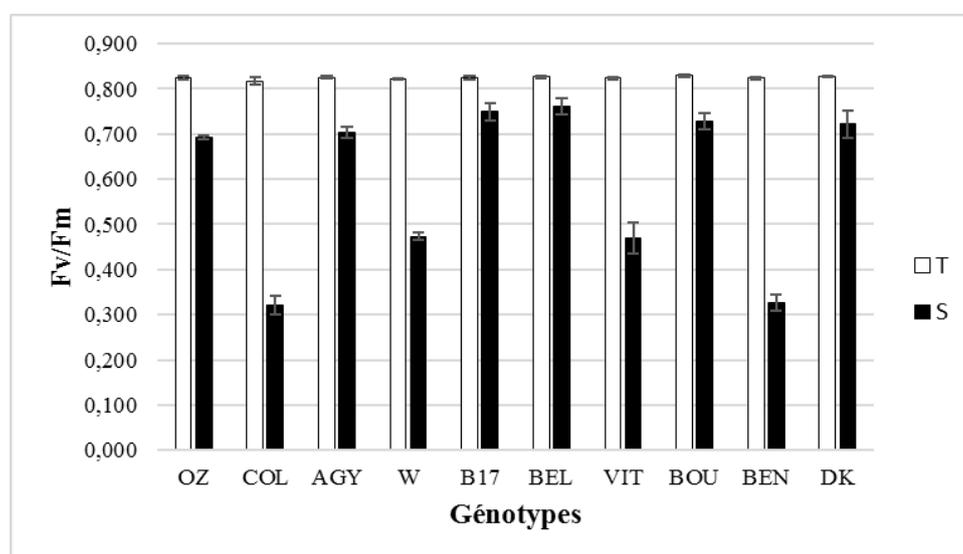


Figure 37 : Effet du déficit hydrique sur le rendement quantique maximale (Fv/Fm) des 10 géotypes de blé dur
T = Témoins, S = Stressés. Les valeurs représentent des moyennes \pm SE (n= 3)

La stabilité du rendement quantique maximal reflété par le rapport Fv/Fm est affectée par le régime hydrique appliqué (Figure 37). Živčák et ses collaborateurs (2008) ont rapporté des corrélations similaires entre le Fv/Fm et la tolérance au déficit hydrique chez des cultivars de blé tendre, avec des Fv/Fm élevés chez les géotypes tolérants et de faibles valeurs chez les géotypes sensibles. La diminution du Fv/Fm en conditions de stress hydrique a été signalée chez plusieurs espèces : canne à sucre (Silva *et al.*, 2007), maïs (Saglam *et al.*, 2014), riz (Sikuku *et al.*, 2012) et le blé (Živčák *et al.*, 2008). Une diminution qui peut s'expliquer

selon Fryer *et al.*, (1998) par le fait que le déficit hydrique réduit l'assimilation du CO₂ dans les feuilles, associée à une inhibition de la photosynthèse, ce qui provoque une augmentation de la dissipation de l'énergie d'excitation du PSII, entraînant des photo-endommagements des centres réactionnels du PSII. Une chute de Fv/Fm traduit l'inactivation, voire la destruction des photosystèmes II ou plus globalement une altération non réversible de la chaîne photosynthétique du transport des électrons (Adams III *et al.*, 2008). Une corrélation négative très significative est observée entre le Fv/Fm et le MDA ($r = -0,918$), l'H₂O₂ ($r = -0,873$), et la REL ($r = -0,894$) (Tableau 15). D'après (Adams III *et al.*, 2008), la dégradation des photosystèmes est généralement induite par une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène en réponse à un déficit hydrique réduisant ainsi le taux de Fv/Fm. Ceci est expliqué par la limitation de la fixation du CO₂ ce qui réduit la régénération du NADP⁺ à travers le cycle de Calvin, provoquant ainsi une réduction excessive de la chaîne de transport des électrons photosynthétiques et par conséquent, une augmentation de la production de ROS et une diminution du Fv/Fm (Cruz de Carvalho, 2008). La cause majeure en est l'altération de la protéine D1, une des deux grandes sous-unités des centres réactionnels du PSII dont l'abondance décroît fortement (Kingston-Smith *et al.*, 1999). Cette corrélation entre le Fv/Fm et les marqueurs du stress oxydatif suggère que la différence de tolérance au stress hydrique est étroitement associée à la capacité de supprimer le stress oxydatif.

Tableau 15 : Matrice de corrélation de Pearson (n) des variables mesurées des 10 géotypes de blé dur
 ns : non significative, * : significative (p<0,05), * : hautement significative (p<0,01), *** : très hautement significative

Variables	SOD	CAT	GPOX	MDA	H ₂ O ₂	REL	CHL	RWC	PO	gs	T°	Fv/Fm
SOD	1	0,791***	0,849***	0,295*	0,209 ^{ns}	0,546***	-0,402***	-0,390**	-0,480***	-0,426***	0,682***	-0,238 ^{ns}
CAT	1	1	0,913***	-0,136 ^{ns}	-0,133 ^{ns}	0,157 ^{ns}	-0,094 ^{ns}	-0,118 ^{ns}	-0,503***	-0,039 ^{ns}	0,500***	0,110 ^{ns}
GPOX	1	1	1	-0,030 ^{ns}	-0,090 ^{ns}	0,259*	-0,222 ^{ns}	-0,237 ^{ns}	-0,456***	-0,187 ^{ns}	0,561***	-0,023 ^{ns}
MDA	1	1	1	1	0,940***	0,914***	-0,752***	-0,769***	-0,170 ^{ns}	-0,914***	0,648***	-0,918***
H₂O₂	1	1	1	1	1	0,876***	-0,659***	-0,694***	-0,128 ^{ns}	-0,855***	0,619***	-0,873***
REL	1	1	1	1	1	1	-0,779***	-0,820***	-0,290*	-0,946***	0,780***	-0,894***
CHL	1	1	1	1	1	1	1	0,875***	0,203 ^{ns}	0,862***	-0,779***	0,841***
RWC	1	1	1	1	1	1	1	1	0,262*	0,899***	-0,766***	0,907***
OP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,288*	-0,386**	0,177 ^{ns}
gs	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0,762***	0,954***
T°	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-0,691***
Fv/Fm	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

1.9. Relation entre le statut oxydant et les paramètres physiologiques étudiés

La matrice de corrélation des variables (Tableau 15) permet de mettre en relief les corrélations significatives (positives ou négatives) entre les différents paramètres étudiés. Les variables (g_s , PO, CHL et RWC) sont significativement et négativement corrélées avec la SOD. Cette enzyme représente la première ligne de défense contre les ROS, où elle réduit le superoxyde, première espèce réactive d'oxygène produite lors de l'installation d'un stress oxydatif. Ces corrélations ont été mises en évidence dans plusieurs travaux (Ebrahimian et Bybordi, 2011 ; Ali *et al.*, 2014b ; Chakraborty et Pradhan, 2012) signalant le rôle majeur de cette enzyme dans la tolérance au stress oxydatif induit par le stress hydrique. Les résultats de notre étude suggèrent que l'augmentation de l'activité SOD en conditions de stress hydrique, contribue à maintenir la RWC et la CHL à des taux élevés, par la gestion du radical superoxyde et la protection de la membrane des dommages oxydatifs. Par ailleurs, l'augmentation de la REL, du MDA et du H_2O_2 des feuilles du blé dur est directement reliée par le régime hydrique imposé. En effet, il existe une corrélation négative, hautement significative entre ces derniers et les paramètres physiologiques de la plante à savoir la g_s , la CHL, la RWC et le Fv/Fm (Tableau 15). Le déficit hydrique a généré un stress oxydatif en catalysant la formation des ROS dont l' H_2O_2 par la dismutation du superoxyde qui s'attaque aux acides gras polyinsaturés des membranes des chloroplastes et provoquent leur peroxydation et la production des TBARS ainsi qu'une augmentation de la REL. Cette peroxydation des lipides chloroplastiques peut être responsable de perturbations dans l'ultrastructure des thylakoïdes entraînant le dysfonctionnement des protéines qui y sont imbriquées et en particulier les PSI et PSII (Gill et Tuteja, 2010). Ces marqueurs du stress oxydatif peuvent donc être utilisés comme bioindicateurs de l'état de stress chez les plantes.

Une analyse factorielle multidimensionnelle de type ACP a été effectuée sur l'ensemble des données relatives aux 10 géotypes de blé. L'objectif de cette analyse est de comprendre les interactions entre les différents paramètres physiologiques et biochimiques étudiés, évaluer d'éventuelles similitudes entre les différents géotypes et de caractériser les plus originaux qui sont soumis au stress hydrique. Le diagramme des valeurs propres (Figure 38- A) montre que la combinaison linéaire des variables qui génère les deux axes F1 et F2 est particulièrement importante pour décrire la variabilité entre les différents paramètres étudiés. En effet, les deux premières composantes expliquent la variance avec 59,91% et 25,25%, soit un pourcentage cumulé de 85,16% (valeurs propres >1).

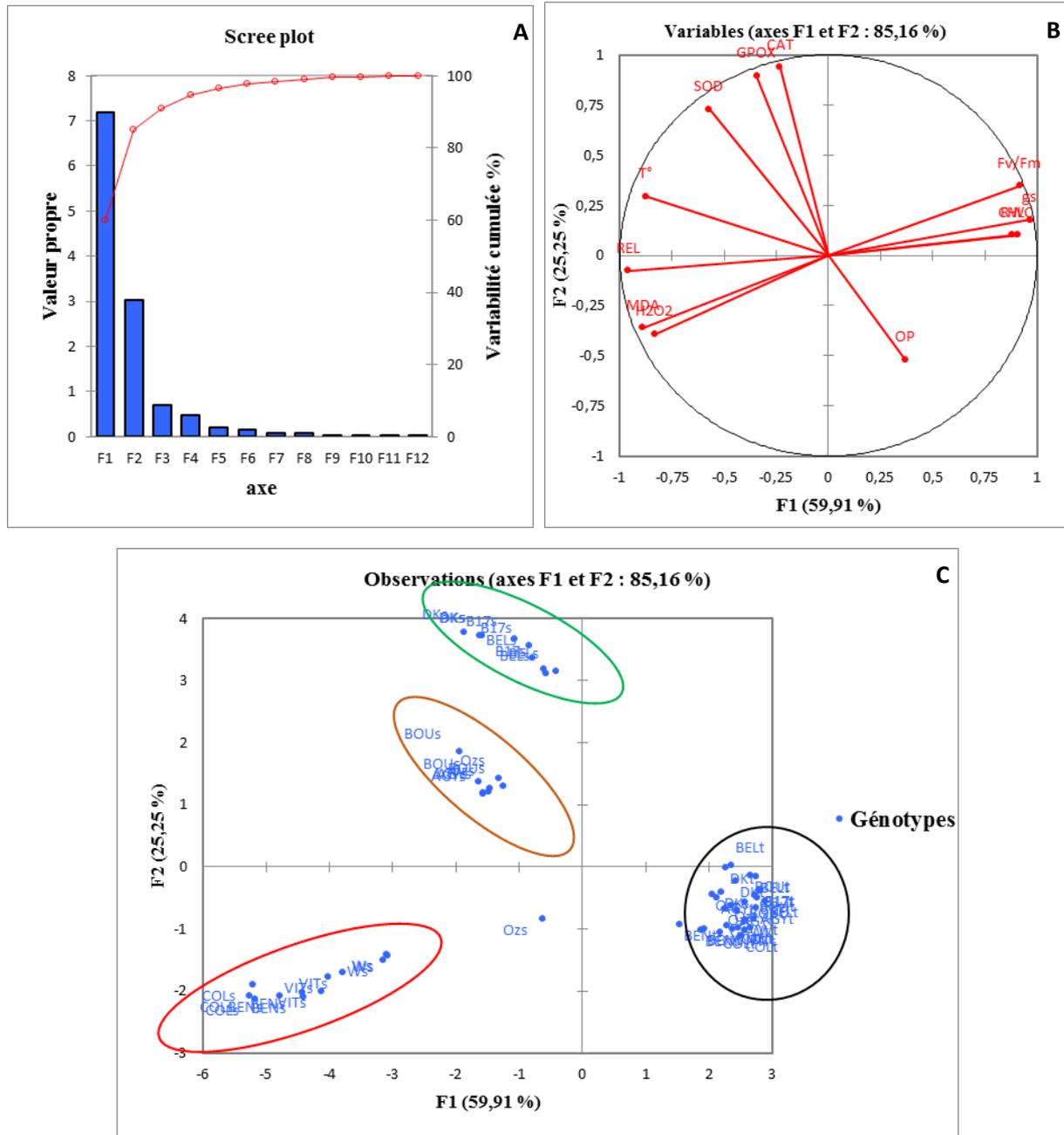


Figure 38 : Représentation descriptive par analyse en composantes principales (ACP) des valeurs des paramètres physiologiques et biochimiques suite à un stress hydrique.
 (A) Histogramme des valeurs propres, (B) cercle des corrélations des variables, (C) répartition des génotypes sur le plan factoriel F1 et F2.

D'après les résultats de l'ACP (Figure 38-B,C), l'axe F1 exprime principalement du côté positif, la singularité des plantes témoins très fortement liée aux paramètres physiologiques : teneur relative en eau (RWC) élevée, forte conductance stomatique (g_s), teneur en chlorophylle totale (CHL) élevée et un fort taux de rendement quantique maximale (F_v/F_m) reflétant un bon état hydrique de la plante. D'autre part, il est corrélé négativement et assez fortement avec la REL, suivi du MDA, du H_2O_2 et de la température foliaire. L'axe factoriel 2 qui n'extrait que 25,25% de l'inertie, est distingué par les 3 enzymes antioxydantes du côté positif et le PO du côté négatif. Les génotypes DK, B17 et BEL (en cercle vert) sont surtout caractérisés par des activités enzymatiques élevées de SOD, CAT et GPOX, indiquant une grande capacité antioxydante en conditions de stress hydrique. La position de COL, BEN, W et VIT (en cercle rouge) est fortement déterminée par les données des marqueurs oxydatifs (REL, H_2O_2 , MDA) couplée à des températures foliaires élevées. Enfin les génotypes BOU, AGY et OZ qui occupent le centre de la carte factorielle F1/F2 (en cercle orange) expriment des phénotypes intermédiaires caractérisés principalement par des valeurs moyennes des paramètres biochimiques mesurés.

Il est bien établi que le stress hydrique affecte la conductance stomatique, la teneur relative en eau, le potentiel osmotique, le rendement quantique maximal du PSII et altère la chlorophylle. Ces perturbations physiologiques sont accompagnées d'un stress oxydatif qui est déterminé par une production accrue d'espèces réactives d'oxygène dans les feuilles du blé dur. Les ROS, dont l' H_2O_2 , induisent des dommages oxydatifs aux molécules fonctionnelles dans la cellule végétale (Egert et Tevini, 2002). Nos résultats ont montré que la production du peroxyde d'hydrogène augmente significativement sous le régime hydrique. Le H_2O_2 peut provenir de la réaction de dismutation de l' $O_2^{\cdot -}$ par la SOD ou l'altération du transport d'électrons dans les chaînes photosynthétique et respiratoire (Gill et Tuteja, 2010). Il peut provenir aussi durant la photorépiration, où l'enzyme Rubisco qui catalyse la carboxylation de la RuBP pendant l'assimilation du carbone, utilise l' O_2 pour oxygéner celle-ci. Cette réaction va engendrer du glycolate qui est ensuite transporté des chloroplastes aux peroxysomes où il sera oxydé produisant aussi du H_2O_2 (Cruz de Carvalho, 2008). Par ailleurs, le H_2O_2 joue le rôle d'une molécule signal qui alerte la cellule de la présence d'un stress environnemental (Parent *et al.*, 2008). Selon Dat *et al.* (2000), le peroxyde d'hydrogène peut fonctionner comme un messager secondaire à faibles concentrations mais il devient toxique à fortes concentrations. La membrane des thylakoïdes est sujette aux attaques de l' H_2O_2 et des différentes formes radicalaires. En conditions de stress hydrique, les ROS

s'attaquent aux acides gras polyinsaturés et provoquent leur oxydation. Celle-ci est mise en évidence par la formation du MDA dans les feuilles des 10 génotypes étudiés. De plus, durant la photosynthèse et sous condition de stress hydrique, il y a une fuite d'électrons élevée vers l'O₂ par la réaction de Mehler (Smirnov, 1993). Des travaux de (Biehler et Fock, 1996), ont montré que la fuite des électrons photosynthétiques par la réaction de Mehler chez le blé en conditions de déficit hydrique, a augmenté de 50 % par rapport aux plantes témoins. L'augmentation des activités antioxydantes est considérée comme importante pour atténuer les effets délétères des ROS responsables des dommages oxydatifs dans les feuilles des plantes. La superoxyde dismutase, la peroxydase et la catalase sont des indices importants pour évaluer le statut redox du blé dont les activités supérieures affichent essentiellement une capacité antioxydante plus élevée, ce qui reflète une plus grande tolérance à la sécheresse (Zhang et Kirham, 1994 ; Shinozaki *et al.*, 2003). L'activité de ces enzymes a augmenté dans les 10 génotypes de blé dur en condition de stress, mais les génotypes BEL, DK et B17 ont montré une activité plus importante, ce qui implique que cette capacité enzymatique à éliminer les ROS, contribue à améliorer la tolérance au stress hydrique. La SOD intervient en premier dans l'élimination du O₂⁻, ce qui va générer l'H₂O₂. La détoxification de cette molécule peut être envisagée par plusieurs enzymes telles que la CAT localisée au niveau des peroxyosomes et des mitochondries, la GPOX localisée au niveau du cytoplasme et des parois cellulaires ainsi que les enzymes du cycle ascorbate-glutathion, localisées dans plusieurs compartiments cellulaires (Noctor et Foyer, 1998).

Conclusion

Nos résultats indiquent clairement que les différents stress appliqués (stress hydrique, thermique et au paraquat) sont responsables de l'induction du stress oxydatif et les dommages qui leurs sont liés, ce qui a été démontré par l'augmentation de la teneur en MDA, la fuite des électrolytes, l'accumulation du H_2O_2 , la dégradation de la chlorophylle et l'augmentation des réponses des enzymes antioxydantes. Il a été également démontré que les 10 génotypes du blé répondent différemment aux dommages oxydatifs en raison des variations de leurs défenses antioxydantes. Les génotypes DK, B17, BEL ont présenté une meilleure tolérance au stress oxydatif déclenché par le stress hydrique, avec des dommages oxydatifs mineurs associés à une réponse plus forte des enzymes antioxydantes. Bien que d'autres études soient nécessaires, ces génotypes pourraient être considérés comme cultivars adéquats dans les programmes visant à améliorer le développement des plantes plus tolérantes à la sécheresse.

En ce qui concerne les coefficients de corrélation entre les paramètres physiologiques et biochimiques dans les conditions de stress hydrique, nous avons constaté la singularité de l'enzyme SOD parmi les 3 enzymes étudiées, qui est particulièrement liée à la teneur relative en eau (RWC), la conductance stomatique (g_s) et la teneur en chlorophylle totale (CHL). Cette enzyme joue un rôle important dans l'élimination de l'anion superoxyde qui s'accumule suite au stress hydrique au niveau du PSII. L'activité de la SOD engendre par la suite, la formation de l' H_2O_2 qui sera contrôlé par la CAT et la GPOX.

Il existe une forte corrélation entre les paramètres physiologiques étudiés et les marqueurs du stress oxydatif ainsi que les antioxydants testés. Par conséquent, nous proposons ces paramètres comme indicateurs biochimiques pour la sélection de cultivars tolérants à la sécheresse.

2. Analyse des profils de séparation par PAGE des isoenzymes CAT, GPOX et SOD

L'analyse du polymorphisme isoenzymatique des 10 génotypes de blé dur, objet de la seconde partie de cette thèse, permet d'affiner les résultats de l'analyse de la variabilité biochimique et physiologique et de mettre en évidence l'influence du stress hydrique sur le métabolisme des systèmes enzymatiques foliaires de blé dur soumis à des conditions de déficit hydrique induit par ajout du PEG 6000. Une approche basée sur une PAGE en conditions natives a été développée afin d'évaluer si les variations globales des activités enzymatiques observées dans l'analyse biochimique, résultaient de variations qualitatives (présence/absence) ou quantitatives spécifiques à certaines isoenzymes. Les isoenzymes sont des marqueurs codominants, polymorphes et neutres vis-à-vis des facteurs du milieu, mais peuvent être aussi sélectifs (Wendel et Weeden, 1989 ; Soltis et Soltis, 1991). Ils constituent un moyen utile permettant d'estimer la diversité génétique des populations, d'évaluer leur degré de différenciation et d'appuyer les programmes d'amélioration des espèces (Batista *et al.*, 2001 ; Hedrick, 2001). 3 systèmes enzymatiques ont été révélés, la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la guaiacol peroxydase (GPOX). La teneur en chlorophylles a et b, en caroténoïdes et le potentiel osmotique foliaire, sont des paramètres qui ont été utilisés afin d'estimer l'effet du PEG 6000 et de caractériser la réponse des variétés de blé dur étudiés.

2.1. Effet du PEG sur le potentiel osmotique

Les potentiels osmotiques varient entre -0,95 MPa chez DK et -1,42 MPa chez AGY avant l'installation du déficit hydrique (Figure 39). Ces valeurs mesurées restent dans une gamme correspondant à des potentiels osmotiques de plantes de blé dur cultivées en hydroponie.

Les résultats obtenus avec le traitement PEG 6000 sont similaires à ceux observés en culture sous serre en arrêt d'arrosage. En effet, le PEG 6000 a entraîné une diminution significative ($p < 0,05$) du potentiel osmotique chez toutes les plantes de blé dur, avec des valeurs qui oscillent entre -2,02 MPa chez BEN et -2,69 MPa chez OZ. Les géotypes OZ, DK, AGY et BEL ont tendance à présenter les valeurs les plus basses.

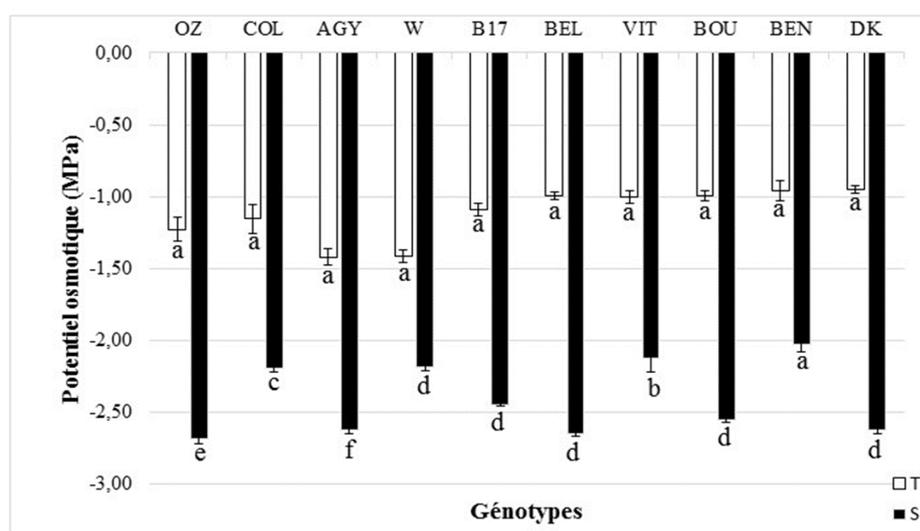


Figure 39 : Potentiel osmotique foliaire des 10 géotypes de blé dur traités au PEG 6000
T = Témoins, S = Stressés. Les valeurs représentent des moyennes \pm SE (n= 3)

Plusieurs auteurs ont rapporté l'utilisation du PEG in vitro pour l'étude du stress hydrique chez les plantes cultivées (Gopal et Iwama, 2007 ; Sakthivelu *et al.*, 2008). L'addition du PEG 6000 à la solution nutritive modifie le potentiel hydrique du milieu BD induisant un stress hydrique chez la plante d'une manière relativement contrôlée.

La diminution du potentiel osmotique foliaire des 10 géotypes de blé suite à l'application du PEG 6000 est considérée comme un mécanisme cellulaire potentiel de la résistance au stress hydrique, car il permet le maintien de la turgescence et la poursuite de la croissance grâce à l'accumulation active des solutés (Bajji *et al.*, 2000). Les plantes peuvent ainsi garder leurs stomates ouverts, afin de poursuivre les échanges gazeux et les échanges de vapeur d'eau, nécessaires à la réalisation de la photosynthèse et la transpiration (Clifford *et*

al., 1998). Les solutés, comme les sucres et la proline, protègent la cellule en équilibrant la résistance osmotique du cytosol avec celle de la vacuole et de l'environnement extérieur (Gadallah, 1999). De plus, ils peuvent interagir avec des macromolécules cellulaires telles que les enzymes antioxydantes, stabilisant ainsi leur structure et leur fonction (Sairam *et al.*, 2002).

2.2. Effet du PEG sur la chlorophylle totale et les caroténoïdes

La teneur en chlorophylle totale (Chl a+b) en présence de PEG 6000 est bien inférieure à celle en conditions normales (Figure 40). Comparativement entre les variétés étudiées, Les pertes de chlorophylle les plus élevées sont observées chez les génotypes BEN, VIT et W, estimées à (36,94%, 34,3% et 29,93%,) respectivement. Parallèlement à cette diminution dans les teneurs en pigments chlorophylliens totaux, une baisse significative de la teneur en Car a également été enregistrée chez tous les génotypes de blé dur (Figure 41). Cette diminution est plus marquée chez les génotypes VIT, BEN et COL, ce qui suggère que les dommages oxydatifs chez ces derniers causés par l'accumulation des ROS, sont plus élevés par rapport aux autres génotypes.

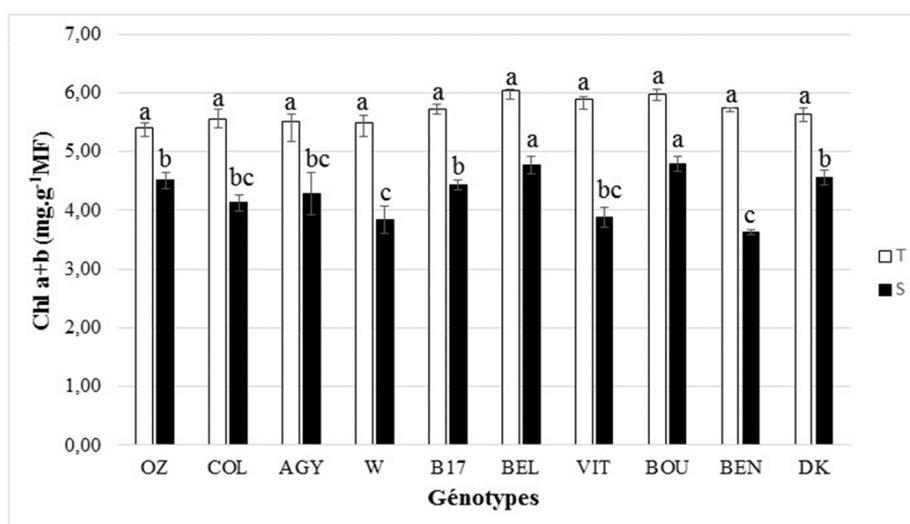


Figure 40 : Teneur en chlorophylle totale (Chl a+b) foliaire des 10 génotypes de blé dur traités au PEG 6000

T = Témoins, S = Stressés. Les valeurs représentent des moyennes \pm SE (n= 3)

La chlorophylle et les caroténoïdes sont les principaux pigments photosynthétiques de la plante et représentent de bons indicateurs de la capacité photosynthétique foliaire. La teneur en chlorophylle totale a été utilisée dans plusieurs études pour détecter les différences

génotypiques en réponse au stress hydrique chez le blé (Bousba *et al.*, 2013 ; Khayatnezhad *et al.*, 2011 ; Paknejad *et al.*, 2007). Guo et ses collaborateurs (2013), ont montré que la teneur des pigments chlorophylliens 'a' et 'b' chez le blé tendre, diminuait à fur et à mesure que la concentration en PEG augmentait. La diminution du taux de la chlorophylle totale (a+b) en conditions de stress hydrique est due, en grande partie, aux dommages causés au niveau des chloroplastes par les ROS tels que l'O₂⁻ et l'H₂O₂, ce qui peut conduire à une peroxydation lipidique, et par conséquent à la destruction de la chlorophylle (Smirnov, 1993). Meeta *et al.*, (2013) ont démontré un déclin significatif dans les activités des enzymes du métabolisme de la chlorophylle chez le maïs, en conditions de stress osmotique infligé par le PEG 6000. Selon Mascher *et al.*, (2005), la diminution des pigments chlorophylliens est due à la fermeture des stomates et le manque de CO₂ associées à une production accentuée des ROS.

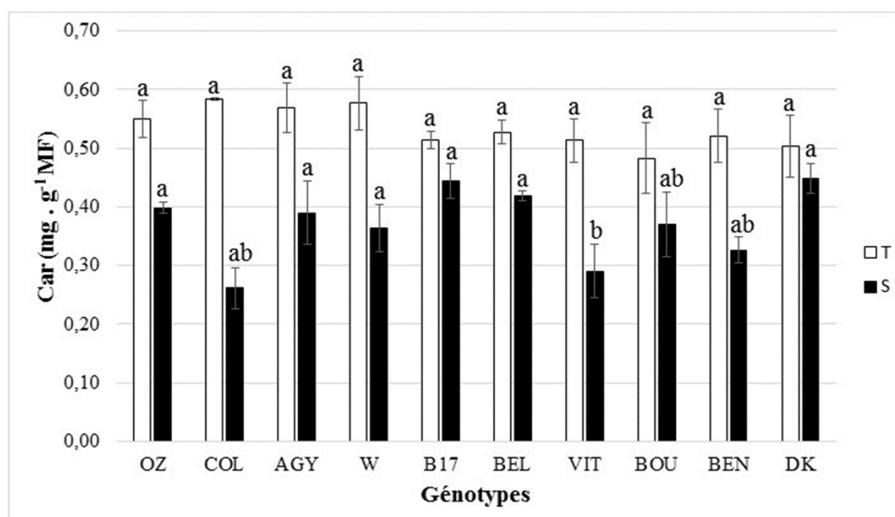


Figure 41 : Teneur en caroténoïdes (Car) foliaires des 10 génotypes de blé dur traités au PEG 6000
T = Témoins, S = Stressés. Les valeurs représentent des moyennes ± SE (n= 3)

Outre les dommages causés au niveau de la chlorophylle, le stress hydrique réduit également la concentration des caroténoïdes due essentiellement à une production accentuée des ROS dans les thylakoïdes (Reddy *et al.*, 2004). Des résultats similaires sont obtenus chez de nombreuses espèces en réponse au stress hydrique tels que le riz (Cha-um *et al.*, 2010), le blé tendre (Hammad et Ali 2014 ; Khalilzadeh *et al.*, 2016) et le blé dur (Chahbar et Belkhouja 2016). Les Car jouent un rôle très important dans la tolérance à la sécheresse, en dissipant l'excès de l'énergie lumineuse sous forme de chaleur et en protégeant la plante des dommages oxydatifs (Gill et Tuteja, 2010). En effet, les Car assurent la protection de l'appareil photosynthétique en neutralisant la molécule de chlorophylle excitée à son état

triplet (Chl^3), limitant ainsi la production des radicaux libres. Cependant, elles sont très sensibles à la destruction oxydative des membranes photosynthétiques, causées par l'accumulation des ROS générées pendant un stress hydrique sévère. Guo *et al.*, (2013) ont relevé une diminution de la teneur en Car, en conditions de stress hydrique sévère, générée par des concentrations de PEG 6000 supérieures à 15%. Khalilzadeh *et al.*, (2016) ont également rapporté un effet significatif d'un stress hydrique sévère sur la chute de la concentration en Car chez différentes variétés de blé tendre. Selon Xiao *et al.*, (2008), cette diminution est due aux dommages causés par l'accumulation des ROS au niveau de la membrane des thylakoïdes. D'autres auteurs expliquent la réduction en Car comme un mécanisme de photoprotection afin de réduire l'absorbance de la lumière et éviter ainsi les dommages oxydatifs (Galmés *et al.*, 2007 ; Elsheery et Cao, 2008). D'après Paleg et Aspinall (1981), les pigments photosynthétiques et la proline sont tous deux synthétisés à partir du même substrat. Par conséquent, une augmentation de la photosynthèse de la proline entraîne une diminution de la synthèse des pigments photosynthétiques sous le déficit hydrique.

2.3. Analyse du profil électrophorétique des SOD

Différents facteurs interviennent dans la complexité des zymogrammes obtenus : **a)** présence de plusieurs loci codants pour des isoenzymes différentes, **b)** existence d'allèles multiples au niveau d'un seul locus déterminant ainsi des versions différentes des chaînes polypeptidiques, **c)** nature tétraploïde des cultivars utilisés dans cette étude, **d)** structure quaternaire de l'enzyme et **e)** modifications post-traductionnelles potentielles de la structure enzymatique.

Le profil électrophorétique des SOD des 10 génotypes étudiés (Figure 42) montre l'existence de 3 zones de migration ou loci (1, 2 et 3) chez toutes les plantes témoins, chacune représentée par 2 bandes (allèles) à intensité différente. On remarque une variation qualitative chez les génotypes DK, OZ, W, où on note l'absence de la bande SOD3 ($R_f = 0,45$) au niveau du locus (2) ce qui induit un polymorphisme de 16,67%. Pour les plantes stressées, 4 zones de migration sont détectées dont l'apparition d'un nouveau locus (4) et de 3 nouvelles bandes : SOD9 ($R_f = 0,11$) au niveau du locus (1), SOD7 ($R_f = 0,3$) et SOD4 ($R_f = 0,47$) au niveau du deuxième locus, témoignant l'effet du stress hydrique sur la synthèse de nouvelles isozymes de SOD. Au moins 10 isozymes distinctes sont détectées sur le gel avec une intensité qui diffère d'une variété à une autre. Ces derniers ont augmenté d'intensité en conditions de stress notamment dans les zones de migration (2) et (3) et leur R_f tend à diminuer. Les bandes des génotypes BEN, VIT, AGY, DK et W sont moins intenses au niveau du locus 2.

Des résultats similaires ont été rapportés par Huseynova et *al.*, 2014, où ils ont décelé jusqu'à 4 zones de migration de SOD chez le blé dur sous conditions de stress hydrique avec une activité plus intense de la MnSOD. Salekjalali et ses collaborateurs (2012) ont également rapporté les effets d'un stress hydrique sévère sur l'apparition de nouvelles isozymes de SOD chez des variétés d'orge. Le profile enzymatique des plantes stressées comporte 4 loci dont 2 monomorphes et 2 polymorphes (loci 2 et 4) avec un taux de polymorphisme de 30%. La fréquence allélique du locus 2 varie entre 0,3 et 0,4 chez l'ensemble des génotypes. Cette variation est due principalement à la présence/absence des 2 bandes SOD7 et SOD4.

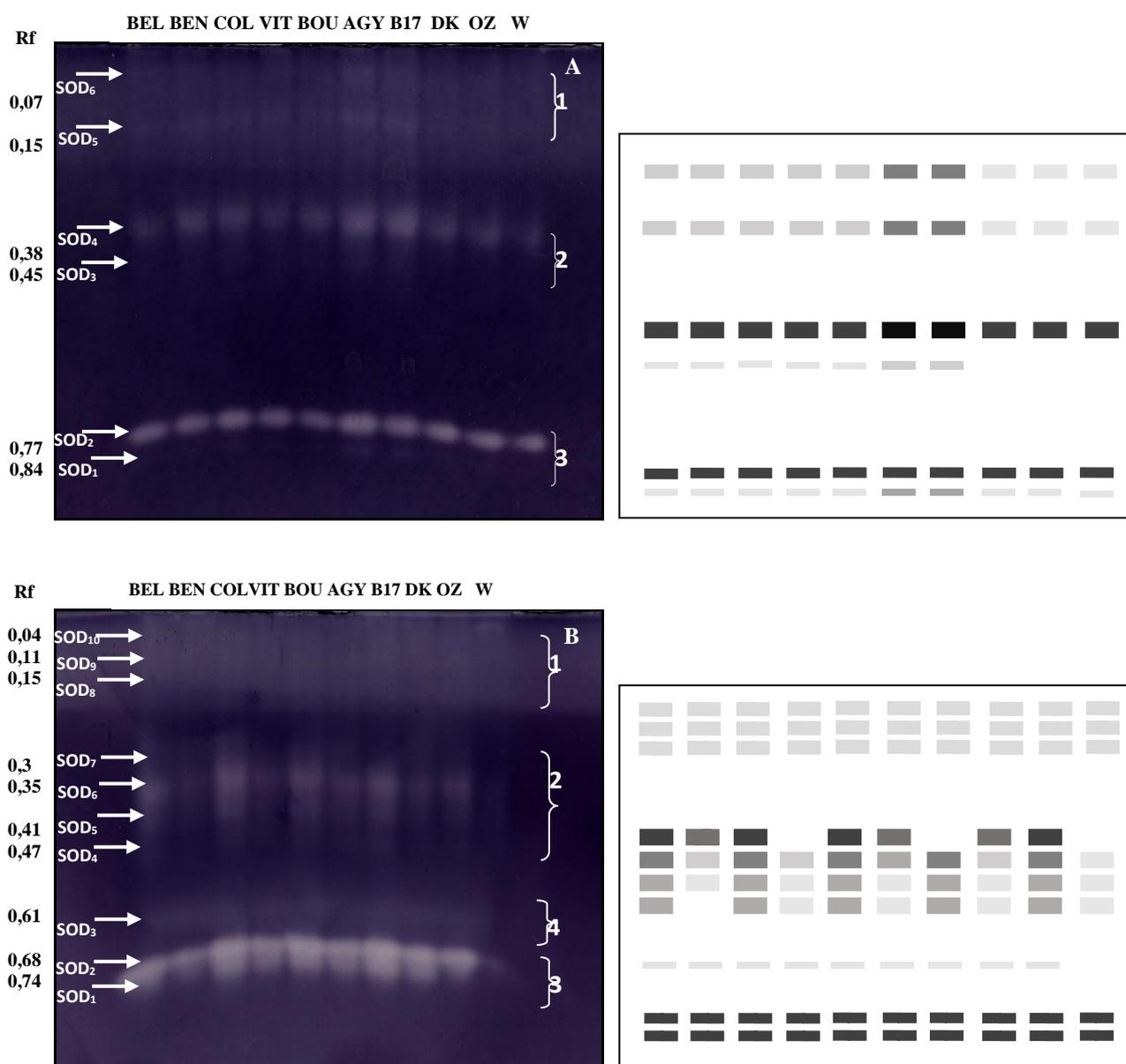


Figure 42 : Zymogramme de l'activité SOD des feuilles de blé dur

(A) : Témoins, (B) : Stressés

Tableau 16 : Variations génétiques spécifiques à l'enzyme SOD chez 10 géotypes de blé dur

T = Témoins, S = Stressés.

Variété	Nombre de loci	Fréquence allélique							Taux de polymorphisme (%)
		Locus1		Locus2		Locus3		Locus4	
		T	S	T	S	T	S	S	
BEL	T : 3 S : 4	0,33	0,30	0,33	0,4	0,33	0,2	0,1	T : 16,67 S : 30,00
BEN		0,33	0,30	0,33	0,3	0,33	0,2	0,1	
VIT		0,33	0,30	0,33	0,4	0,33	0,2	0,1	
COL		0,33	0,30	0,33	0,3	0,33	0,2	0,1	
BOU		0,33	0,30	0,33	0,4	0,33	0,2	0,1	
AGY		0,33	0,30	0,33	0,4	0,33	0,2	0,1	
B17		0,33	0,30	0,33	0,3	0,33	0,2	0,1	
DK		0,33	0,30	0,16	0,4	0,33	0,2	0,1	
OZ		0,33	0,30	0,16	0,4	0,33	0,2	0,1	
W		0,33	0,30	0,16	0,3	0,33	0,2	0	

Le nombre des bandes SOD observé chez les géotypes BEL, VIT, BOU, AGY, DK et OZ, suggère que l'enzyme est tétramérique homozygote tandis que les géotypes BEN, COL, B17 et W présentent des enzymes dimériques hétérozygotes avec 3 bandes observées. Le locus 4 exprime une enzyme (SOD3) monomérique homozygote qui est présente chez tous les géotypes à l'exception de W (allèle nul non révélé). Cette absence pourrait aussi résulter d'un défaut de migration. La diversité génétique du système enzymatique SOD est due principalement à la présence de 4 loci qui codent pour les différentes isoenzymes de SOD, aux différents allèles présents dans le même gène (situé au même locus) et à la structure de l'enzyme qui peut être dimérique (Cu/Zn-SOD et Fe-SOD) ou bien tétramérique (Mn-SOD).

2.4. Analyse du profil électrophorétique des CAT

Les résultats obtenus de la séparation des isoenzymes de CAT sont présentés dans la figure 43. Une seule zone de migration est détectée chez les plantes témoins et stressées avec une faible mobilité électrophorétique, ce qui correspond aux données de la littérature (Nabizadeh *et al.*, 2015 ; Huseynova *et al.*, 2015). Vu la difficulté d'interprétation des zymogrammes de la CAT, nous avons tenu compte uniquement de la présence/absence des bandes et considéré la bande CAT1 comme une bande majeure.

Chez les plantes témoins, la zone d'activité enzymatique est représentée par un seul locus polymorphe avec 2 bandes dont une majeure. On note l'absence de la CAT2 (Rf = 0,11) chez les géotypes W, B17, AGY, Ben et Bel mais qui apparaît sous conditions de stress

hydrique. Un changement qualitatif a pu être mis en évidence chez les plantes stressées par l'apparition d'une troisième bande CAT3 (Rf = 0,05), ce qui indique que le stress hydrique a un effet significatif sur la synthèse de cette nouvelle isoenzyme. Cependant, une absence totale de la CAT3 est observée chez les génotypes COL, VIT et BOU, contribuant ainsi à structurer la diversité génétique entre les différents génotypes. On note aussi un changement quantitatif qui résulte dans l'augmentation de l'intensité des bandes qui varie d'une variété à une autre reflétant l'augmentation de l'activité de l'enzyme en conditions de stress.

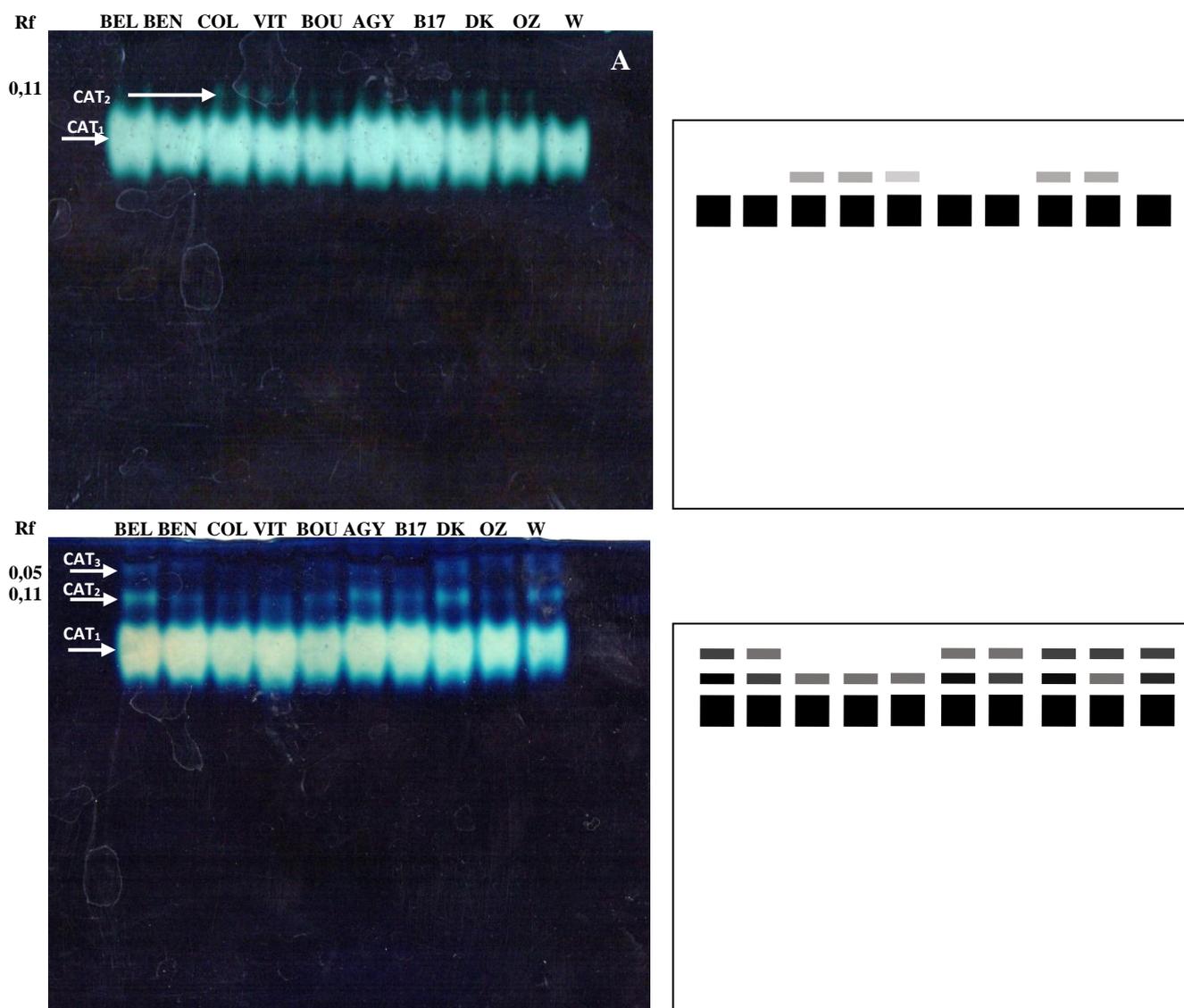


Figure 43 : Zymogramme de l'activité CAT des feuilles de blé dur
 (A) : Témoins, (B) : Stressés

Les résultats de cette étude sont similaires à ceux de Naderi *et al.*, (2014), où ils ont rapporté une augmentation de l'activité CAT dans des bandes plus intenses en conditions de stress hydrique modéré et sévère chez le blé tendre. Des travaux de Huseynova *et al.*, 2015 sur le blé dur, ont mis en évidence l'effet du stress hydrique sur l'activité de la CAT, en décelant la synthèse de 2 nouvelles isoformes : CAT2 et CAT3. La complexité de ce zymogramme peut être expliquée par la présence de 3 CAT dont une majeure condensée (présence de plusieurs allèles) due à la structure hétérotetramérique de la CAT et à la nature tétraploïde des variétés utilisées.

2.5. Analyse du profil électrophorétique des GPOX

Le profil électrophorétique des GPOX montre la présence de 2 loci dont un polymorphe et un monomorphe chez les deux types de plantes témoins et stressées avec la présence de 4 GPOX distinctes (Figure 44). Une variation qualitative est observée au niveau du locus 1 des plantes témoins, due à la présence/absence de GPOX2 ($R_f = 0,16$), GPOX3 ($R_f = 0,13$) et GPOX4 ($R_f = 0,1$) où la fréquence allélique varie de 0,25 à 1 avec un taux de polymorphisme de 75% (Tableau 17). Une absence totale de l'activité enzymatique est observée chez la variété BEL. Une dégradation des extraits protéiques en cours de migration est cependant peu probable. Pour le locus 2, une seule bande est présente chez tous les génotypes GPOX1 ($R_f = 0,79$), indiquant la présence d'une enzyme monomérique homozygote. Le même profil apparaît aussi bien pour les témoins que pour les stressés structuré par 2 zones de migrations avec un taux de polymorphisme de 75%. Cependant, une augmentation dans l'intensité des bandes est observée chez les plantes stressées avec l'apparition des 2 bandes GPOX2 ($R_f = 0,16$) chez les génotypes B17, COL et GPOX3 ($R_f = 0,13$) chez le génotype BOU. D'après le nombre de GPOX observées dans le locus 1, on peut déduire que l'enzyme est monomérique homozygote chez les génotypes W, OZ, DK, et BEN, dimérique homozygote chez le génotype VIT, COL, BOU, B17 et BEL et dimérique hétérozygote chez le génotype AGY. La complexité du profil électrophorétique des GPOX résulte de la présence de 2 loci dont un polymorphe avec la présence de 1 à 3 allèles et de la structure quaternaire de la GPOX qui peut être monomérique ou dimérique.

Des données similaires pour la GPOX ont été obtenues chez des semis de blé tendre en conditions de stress combiné hydrique et thermique (Sharma *et al.*, 2013) et des semis de blé dur acclimatés au stress hydrique (Huseynova *et al.*, 2015). Les travaux de ces derniers montrent la présence de 2 zones de migration de GPOX : une polymorphe à migration lente et la seconde monomorphe à migration rapide avec la distinction de certaines bandes en

conditions de stress hydrique. Plusieurs formes de peroxydases agissant dans différents stades de croissance et de développement des plantes, sont caractérisées par leur capacité à oxyder divers substrats et à fonctionner dans différentes conditions environnementales, à savoir la détoxification des ROS comme l' H_2O_2 générée en conditions de stress oxydatif (Scebba *et al.*, 1998). Salekjalali *et al.*, (2012) ont rapporté que le stress hydrique entraîne une augmentation des isoformes de GPOX chez des variétés d'orges avec une apparition de nouvelles isoenzymes désignées par GPOX1 et GPOX2.

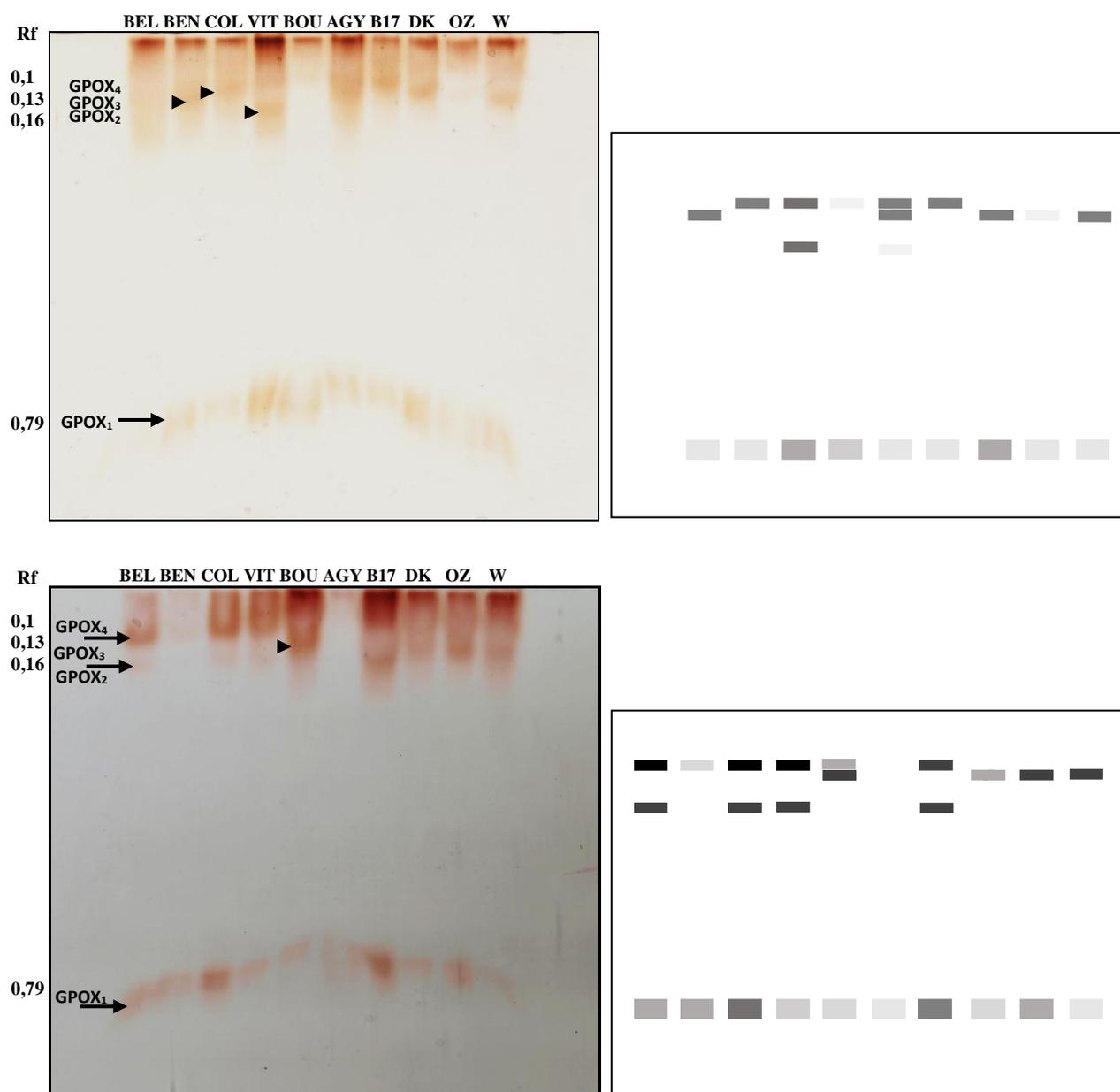


Figure 44 : Zymogramme de l'activité GPOX des feuilles de blé dur
(A) : Témoins, (B) : Stressés

Tableau 17 : Variations génétiques spécifiques à l'enzyme GPOX chez 10 génotypes de blé dur
T = Témoins, S = Stressés.

Variété	Nombre de loci	Fréquence allélique				Taux de polymorphisme (%)
		Locus1		Locus2		
		T	S	T	S	
BEL	T : 2 S : 2	//	0,50	//	0,25	T : 75 S : 75
BEN		0,25	0,25	0,25	0,25	
VIT		0,50	0,50	0,25	0,25	
COL		0,25	0,50	0,25	0,25	
BOU		0,25	0,50	0,25	0,25	
AGY		1,00	//	0,25	0,25	
B17		0,25	0,50	0,25	0,25	
DK		0,25	0,25	0,25	0,25	
OZ		0,25	0,25	0,25	0,25	
W		0,25	0,25	0,25	0,25	

2.6. Analyse du dendrogramme

Un dendrogramme de similarité a été établi à partir des données des 3 systèmes enzymatiques SOD, CAT et GPOX (Figure 45). À la distance 0,83, le dendrogramme montre que les génotypes étudiés se répartissent en 4 clusters majeurs. Le premier cluster est réparti en 2 sous cluster (I1 et I2) ($d = 0,854$), le premier sous cluster contient les génotypes OZ, DK et AGY qui sont liés au génotype BOU. Le coefficient de similarité le plus élevé (coef = 1) est présenté par la combinaison des deux génotypes OZ et DK (Tableau 18). Le cluster II contient un seul génotype, BEN qui est proche aux génotypes AGY, OZ, DK et BOU. Le troisième cluster (III) semble plus diversifié avec 2 sous cluster III1 et III2 ($d=0,851$), ce dernier présente un seul génotype (B17). Le premier sous cluster III1 est lui-même réparti en sous cluster (III1a et III1b) ($d=0,90$) composés des génotypes COL, BEL et VIT qui sont similaires entre eux. D'après la matrice de similarité (Tableau 18), le coefficient le plus élevé pour ce groupe, est obtenu avec la combinaison de COL et BEL (coef = 0,938). Les plus faibles coefficients sont obtenus avec la combinaison de W située dans le cluster IV et les génotypes COL, BEN, VIT, et BEL.

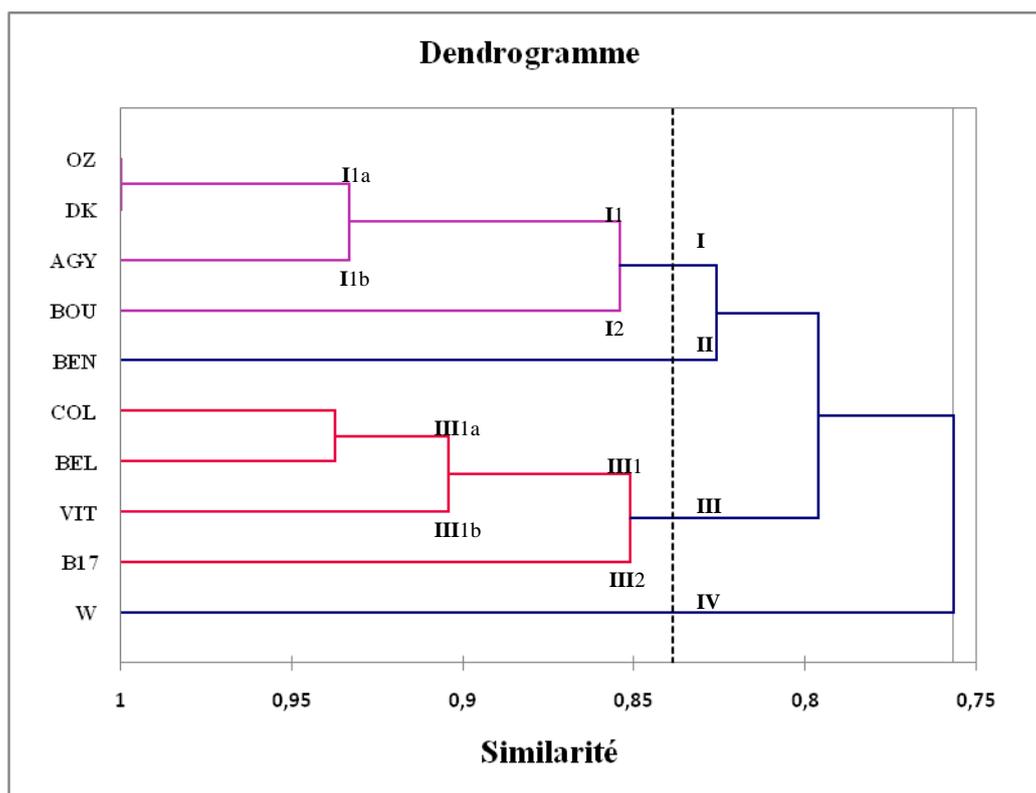


Figure 45 : Dendrogramme de similarité (utilisant la méthode UPGMA) basé sur les profils électrophorétiques des SOD, CAT et GPOX des 10 génotypes de blé dur

Tableau 18 : Matrice de similarité génétique pour les 3 systèmes enzymatiques basée sur le coefficient de Jaccard entre les différents génotypes étudiés.

	BEL	BEN	COL	VIT	BOU	AGY	B17	DK	OZ	W
BEL	1	0,875	0,938	0,875	0,824	0,875	0,875	0,824	0,824	0,706
BEN	0,875	1	0,813	0,750	0,813	0,867	0,750	0,813	0,813	0,688
COL	0,938	0,813	1	0,933	0,875	0,813	0,813	0,765	0,765	0,647
VIT	0,875	0,750	0,933	1	0,813	0,750	0,867	0,706	0,706	0,688
BOU	0,824	0,813	0,875	0,813	1	0,813	0,706	0,875	0,875	0,750
AGY	0,875	0,867	0,813	0,750	0,813	1	0,867	0,933	0,933	0,800
B17	0,875	0,750	0,813	0,867	0,706	0,867	1	0,813	0,813	0,800
DK	0,824	0,813	0,765	0,706	0,875	0,933	0,813	1	1,000	0,867
OZ	0,824	0,813	0,765	0,706	0,875	0,933	0,813	1,000	1	0,867
W	0,706	0,688	0,647	0,688	0,750	0,800	0,800	0,867	0,867	1

Cette étude comparative qui a pour but de mettre en évidence l'influence du stress hydrique sur le métabolisme des 3 systèmes enzymatiques foliaires chez le blé dur, a montré que la réponse à cet aléa diffère d'une variété à une autre. Les modifications d'activité observées sont complexes et impliquent de nombreuses isoenzymes subissant des variations qualitatives ou quantitatives individuelles. Plusieurs études ont été portées sur la corrélation entre la tolérance au stress hydrique et des activités accrues des enzymes du système antioxydant. Weng *et al.*, (2015), ont conclu que les plantes qui ont une forte capacité de tolérance à la sécheresse expriment une abondance d'isozymes de SOD, CAT et POX en conditions de stress hydrique. Ces enzymes existent sous plusieurs isoformes et parfois sous différents types n'ayant pas la même localisation cellulaire. Ainsi, Chez les plantes supérieures, les peroxidases présentent de très nombreuses isoformes encodées par des familles multigéniques (Yoshida *et al.*, 2003). D'après les résultats de Baaziz *et al.*, (2006), 3 formes de POX sont présentes chez les céréales : des formes solubles et des formes liées à la paroi de façon covalente ou ionique. Chaque fraction enzymatique peut contenir des formes acides et des formes basiques. Les aspects quantitatifs et qualitatifs des POX peuvent être utilisés comme marqueurs de tolérance des plantes à plusieurs contraintes abiotiques. Néanmoins, le rôle exact joué par ces enzymes demande encore plus d'investigations. Lee *et al.*, (2007b) suggèrent que les différentes isoenzymes de GPOX observées chez des variétés tolérantes de trèfle blanc, contribuent dans le contrôle des niveaux d' H_2O_2 , mais aussi dans la synthèse de la lignine dont l'augmentation pourrait modifier la structure de la paroi cellulaire comme réponse adaptative à la sécheresse. Plusieurs travaux chez différentes espèces ont rapporté la synthèse de nouvelles isozymes de GPOX en réponse au stress hydrique : chez la canne à sucre (Sen et Alikamanoglu, 2014), le colza (Abedi et Pakniyat 2010), le riz (Srivalli *et al.*, 2003) et le blé (Zala *et al.*, 2014).

Les SOD sont classés par leurs cofacteurs métalliques en 3 types connus : le cuivre/zinc (Cu/Zn-SOD), le manganèse (Mn-SOD) et le fer (Fe-SOD), localisés dans différents compartiments cellulaires (Perry *et al.*, 2010). L'analyse individuelle des isozymes de SOD est importante car elle peut aider à comprendre comment le stress peut affecter les différents compartiments subcellulaires de la plante. Les travaux de Huseynova *et al.*, 2014 sur le blé dur ont montré que la contribution la plus importante à l'augmentation de l'activité de la SOD était assurée par la Mn-SOD, qui est présente dans les mitochondries, liée probablement à la génération de $O_2^{\cdot-}$ par la chaîne de transport mitochondriale. Nos résultats suggèrent que les compartiments mitochondriaux et cytosoliques sont cruciaux dans la protection des isozymes

de SOD contre la formation du radical superoxyde au cours d'un stress hydrique, fait confirmé par les travaux de Brou *et al.*, 2007 ; Abedi et Pakniyat (2010) et Huseynova *et al.*, (2015). D'autre part, l'apparition d'une nouvelle isoenzyme (SOD3) (Figure 42-B) d'une structure monomérique en conditions de stress hydrique, suggère que le Cu/Zn-SOD joue un rôle important dans le contrôle des ROS. Boaretto *et al.*, (2014) ont noté un effet marqué du déficit hydrique sur l'augmentation des isozymes de Cu/Zn-SOD chez des cultivars de canne à sucre. Cia *et al.*, (2012) ont également souligné le rôle important de ces isoenzymes dans les mécanismes de défense des plantes.

Les CAT sont des enzymes impliquées dans la réponse au stress hydrique par élimination de l' H_2O_2 produit par la photorespiration dans les peroxysomes (Noctor *et al.*, 2000). Dans notre étude, une augmentation de l'intensité des isoformes de CAT avec l'apparition d'une nouvelle isoforme (CAT3) dans les plantes stressées, indique une augmentation de l'activité de cette enzyme. Cette dynamique d'augmentation de l'activité enzymatique en conditions de stress hydrique, est associée à une augmentation progressive de la concentration du peroxyde d'hydrogène, due à la réaction de dismutation du radical superoxyde Huseynova *et al.*, (2015). Selon (Weng *et al.*, 2015), l'expression prolongée d'isoenzymes de CAT sous stress hydrique réduit efficacement les dégâts pouvant être causés par l' H_2O_2 dans les cellules. L'hétérogénéité de ces isoenzymes a été associée à la tolérance au stress hydrique chez différentes espèces végétales, y compris chez le blé dur (Srivalli *et al.*, 2003 ; Boaretto *et al.*, 2014 ; Huseynova *et al.*, 2015).

Les différentes mobilités électrophorétiques des zymogrammes résultent des différentes tailles et formes des molécules d'enzymes ; par conséquent, leurs variations indiquent une variation génétique induite par le stress. Selon Karaca (2013), les profils électrophorétiques des isoenzymes (zymogrammes) générés peuvent être corrélés efficacement aux changements dans la séquence du gène, aux mutations et à l'interaction du gène avec le stress. D'autre part, ces modifications de mobilité électrophorétique peuvent résulter des **i)** changements dans le niveau d'expression des isoenzymes, **ii)** transcription génétique de différents loci et **iii)** des modifications post-traductionnelles de la structure enzymatique. L'analyse du polymorphisme isoenzymatique des SOD, GPOX et CAT chez le blé dur a révélé une diversité génétique intra-variétale assez importante, témoignant de la richesse génotypique de l'espèce. Les fréquences alléliques pour les 4 loci polymorphes identifiés (deux pour la SOD, un pour la CAT et un pour la GPOX), accusent des différences entre les 10 variétés étudiées.

Les variétés analysées manifestent un niveau relativement modéré de diversité génétique et une forte similarité génétique entre elles. En effet, en se basant sur la liaison entre les distances génétiques, les variétés de blé dur ont été classées en 4 groupes de ressemblance (Figure 45). Cette représentation confirme en partie la configuration qui ressort de l'ACP de la première partie de ce chapitre. Nos résultats suggèrent que les génotypes BEL, COL, DK, OZ, AGY et BOU montrent un meilleur démarquage des profils enzymatiques pour leurs présence ou absence des bandes. Cependant, l'intensité de ces bandes reste très recommandée pour une bonne discrimination entre les génotypes tolérants et sensibles. Ceci est illustré par exemple dans le locus 2 du profil électrophorétique des SOD, par la comparaison entre le génotype BEL avec une intensité des bandes élevées et le génotype BEN avec une faible intensité. Ces informations peuvent être utilisées pour identifier spécialement les nuances entre les différents génotypes sous stress hydrique.

Conclusion

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que l'ensemble des géotypes de blé dur présentent une aptitude à tolérer le stress hydrique par une baisse du potentiel osmotique, indiquant une accumulation de solutés qui permettraient probablement le maintien de la turgescence cellulaire. Les dommages oxydatifs au niveau des membranes cellulaires, suite à la contrainte hydrique, font diminuer la teneur en chlorophylle totale et en caroténoïdes.

Les données obtenues caractérisent aussi des changements quantitatifs et qualitatifs des isoenzymes SOD, CAT et GPOX foliaires des géotypes de blé dur, sous conditions de stress hydrique sévère représentées par des profils électrophorétiques ou zymogrammes. Ces profils sont révélés par PAGE qui s'avère appropriée pour l'identification des cultivars et l'élucidation ultérieure des combinaisons appropriées en isozymes variables par le nombre de bandes, valeurs des RF et l'intensité des bandes. Les résultats ont montré une forte corrélation entre l'activité antioxydante et la tolérance au stress hydrique ainsi qu'une variation génétique importante entre les géotypes étudiés.

Nos résultats suggèrent que la présence de plusieurs isoenzymes qui exercent la même fonction catalytique, est une caractéristique très importante qui étend la capacité d'adaptation au stress hydrique. En effet, L'hétérogénéité observée des formes individuelles des isozymes peut avoir une valeur adaptative et est une mesure de tolérance au stress hydrique.

L'existence d'une variation infraspécifique chez le blé dur pour les traits étudiés peut être utilisée pour la sélection de géotypes résistants à la sécheresse.

3. Effets du stress hydrique sur l'expression des gènes liés au stress oxydatif

La tolérance au stress hydrique chez les plantes est un trait quantitatif complexe régulé par de nombreux gènes (Hassan *et al.*, 2015). Les stratégies de la sélection classique pour l'amélioration des plantes sont limitées par la complexité des caractères de tolérance au stress et le manque de techniques de sélection efficaces (Rodriguez *et al.*, 2005). Le profilage des gènes exprimés de manière différentielle est un moyen alternatif pour identifier les voies liées aux réponses au stress en utilisant des techniques moléculaires modernes, telles que la PCR quantitative en temps réel. Cette technique peut permettre aux sélectionneurs de manipuler uniquement un caractère d'intérêt.

Pour faire face au stress oxydatif, les cellules végétales modifient l'expression de certains gènes responsables de la synthèse des enzymes antioxydantes qui interviennent dans la détoxification des espèces radicalaires induites par le stress hydrique. L'étude de l'expression de ces gènes au niveau des cellules foliaires du blé dur traité avec du PEG 6000 a fait l'objet de cette dernière partie de la thèse. Les niveaux d'expression des gènes codants pour la catalase, la peroxydase et la superoxyde dismutase ont été évalués par PCR quantitative en temps réel. Après une recherche bibliographique approfondie, suivie d'une approche bioinformatique, nous avons analysé l'expression de 3 gènes codants pour la POX, 2 gènes codant pour la SOD et 3 gènes de CAT. Ceux-ci pourraient être utilisés comme critères de sélection pour étudier les réponses de différents génotypes aux mêmes conditions de stress et le criblage de variétés adaptées à la sécheresse.

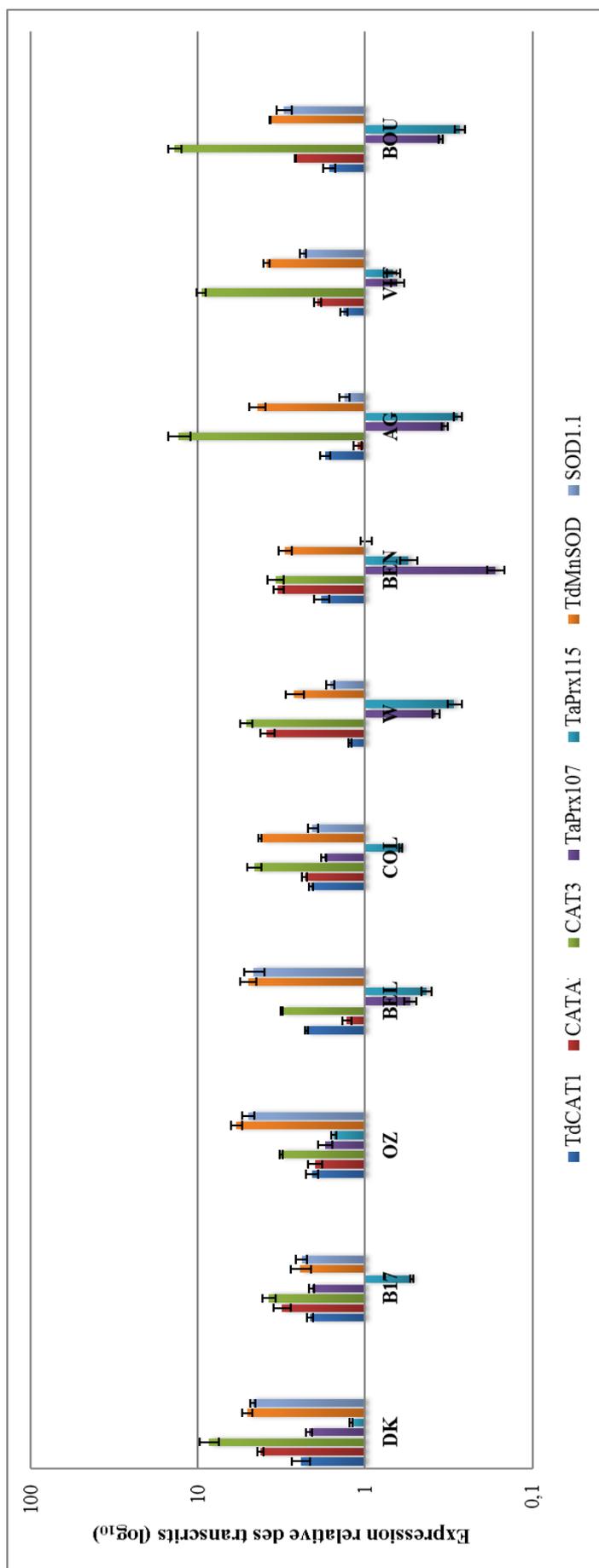


Figure 46 : Niveaux d'expression des gènes candidats

Accumulation relative des transcrits TaPrx107, TaPrx115, TdCAT1, CATA, CAT3, TdMnSOD, SOD1.1 dans les feuilles de blé dur (*Triticum durum* Desf.) obtenus par PCR quantitative en réponse au stress hydrique au PEG 6000. Les valeurs d'expression sont normalisées en utilisant le gène de référence ACT. Les barres représentent les niveaux moyens d'expression \pm SE de 10 génotypes de blé dur, avec 2 répétitions biologiques et 2 répétitions techniques

3.1. Analyse des profils d'expression des transcrits

Comme cela a été présenté auparavant, les expériences de PCR quantitative demandent l'utilisation d'un gène contrôle d'expression supposée constante et stable, dans toutes les conditions et entre toutes les variétés étudiées. Le gène contrôle servira donc à corriger les variations expérimentales reliées à l'échantillon. Les 2 gènes les plus stables qui ont été choisis avec le logiciel GeNorm Plus sont : ACT et TaFNRII. On choisira de conserver le gène ACT en tant que gène de référence pour la suite des mesures d'expression.

L'information importante attendue et obtenue est l'observation d'une expression différentielle des gènes choisis en réponse au stress hydrique. La figure 46 représente les niveaux d'expression moyens des gènes candidats étudiés, normalisés en utilisant le gène de référence ACT.

3.1.1. L'expression relative des gènes CAT

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les catalases végétales peuvent être groupées phylogénétiquement en 3 classes distinctes. Les différents gènes CAT se caractérisent par différents profils et niveaux d'expression. En particulier chez le maïs, chez qui l'expression de ces gènes a été beaucoup étudiée où il a été montré l'existence de 3 gènes CAT : cat1 situé sur le chromosome 5, cat2 situé sur le chromosome 1S et cat3 situé sur la moitié distale du chromosome 1L (Roupakias *et al.*, 1980). Chacun de ces gènes présente une spécificité temporelle et spatiale dans son expression (Redinbaugh *et al.*, 1990) et chacun réagit différemment aux divers signaux environnementaux (Guan et Scandalios, 1995). 3 gènes de catalases sont également rapportés chez *Arabidopsis thaliana* dont 2 (cat1 et cat3) sont localisés sur le chromosome 1 et un (cat2) localisé sur le chromosome 4 (Frugoli *et al.*, 1996). cat2 et cat3 régulent l'homéostasie des ROS dans la lumière et l'obscurité, respectivement. Cat2 est activé par le froid et la sécheresse, tandis que cat3 est renforcée par l'acide abscisique. D'autre part, cat1 est presque impliqué dans la réponse à divers stress abiotiques (Du *et al.*, 2008).

Il existe peu d'informations concernant les gènes CAT du blé dur et leur rôle en réponse au stress hydrique. Ainsi, dans notre travail, nous avons utilisé des analyses PCR en temps réel pour établir le profil d'expression de 3 gènes CAT : TdCAT1, CATA et CAT3, ce qui nous a permis d'étudier leur comportement dynamique et de caractériser leurs changements dans le temps et sous stress hydrique.

Les résultats de la RT-PCR quantitative en temps réel indiquent que le gène TdCAT1 est surexprimé chez l'ensemble des génotypes de blé dur. Cependant, le niveau d'expression

de ce gène reste très faible (de 1,22 chez W à 2,42 chez DK). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de Feki *et al.*, 2015, où ils ont rapporté une abondance dans l'expression de ce gène chez une variété de blé dur traité avec du PEG 6000. Ceci peut être expliqué par la différence des conditions de traitement à savoir la durée et l'intensité du stress ou le stade du développement de la plante auxquelles on a appliqué le stress. Il devra donc être à nouveau testé en qPCR afin de confirmer ou d'invalidier le résultat de l'analyse pour ce gène. Le gène TdCAT1 isolé du blé dur, présente une association étroite avec le groupe des protéines catalases appartenant à la classe I. L'enzyme qu'il code est vraisemblablement adressée aux peroxysomes (Feki *et al.*, 2015). Il a été prouvé que cette enzyme contient un complexe calcium/calmoduline qui joue un rôle très important dans le contrôle de l'homéostasie de l'H₂O₂ par sa stimulation de l'activité catalytique de l'enzyme. Une augmentation de la tolérance à différents stress abiotiques a été observée chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques surexprimant le gène TdCAT1 du blé dur, illustrée par un taux de croissance plus élevé et une accumulation de proline, ainsi que des teneurs en H₂O₂ inférieures aux plantes sauvages (Feki *et al.*, 2015). Les travaux de Feki *et al.*, 2015, ont montré que le gène TdCAT1 est surexprimé en conditions de stress hydrique, salin et oxydatif. D'après ces auteurs, le gène TdCAT1 est un gène prometteur pour le développement de cultures avec des tolérances à de multiples stress.

L'expression relative du gène CATA en conditions de stress hydrique est constatée chez l'ensemble des plantes de blé dur, malgré un niveau relatif très faible chez le génotype AGY. Les 10 génotypes se différencient par des niveaux d'expression différents. L'expression la plus élevée est observée chez le génotype DK où il accumule 4 fois plus de transcrits que le génotype AGY. Le gène CATA code pour l'enzyme CAT2, il est similaire au gène cat1 du maïs, sa fonction principale est la conversion de l'H₂O₂ en eau et oxygène au niveau des peroxysomes (Luna *et al.*, 2005). Des réponses similaires ont été rapportées dans des études précédentes sur l'expression du gène CATA chez le blé tendre (Luna *et al.*, 2005 ; Wei *et al.*, 2013). Il a été montré que l'expression de ce gène chez le blé est modulée par la lumière comme chez le maïs et *Arabidopsis* et que celle-ci est largement corrélée à l'accumulation de l'H₂O₂ formé par photorespiration en condition de stress hydrique.

Le gène CAT3 présente une surexpression bien effective pour tous les génotypes de blé dur notamment dans les génotypes BOU (13,6), AGY (12,9), VIT (9,5) et DK (8,6) (Figure 46). Ceci montre que dans nos conditions de culture, l'expression du gène CAT3 est fortement influencé par le stress hydrique. La séquence de ce gène a été récemment

incorporée à la base de données GenBank. À l'heure actuel, les bases de données ne permettent pas d'identifier précisément la localisation subcellulaire de l'enzyme qu'il code. Toutefois, les résultats obtenus laissent supposer que l'enzyme CAT3 est active au niveau des mitochondries ou les chloroplastes, deux sites principaux de la formation des ROS. En effet plusieurs études ont montré l'accumulation excessive de l'H₂O₂ au niveau de ces organites (Luna *et al.*, 2005 ; Abedi et Pakniat, 2010 ; Noctor et Foyer, 1998.). Ces auteurs affirment que les catalases agissent aussi bien au niveau des peroxysomes qu'au niveau des mitochondries et des chloroplastes.

3.1.2. L'expression relative des gènes POX

Les peroxydases de classe III forment une famille multigénique chez les plantes supérieures. À ce jour, la base de données PeroxiBase (<http://peroxibase.toulouse.inra.fr/>) répertorie 115 séquences de gènes POX de classe III chez le blé tendre. Les informations concernant l'investigation des gènes POX en conditions de déficit hydrique sont encore très limitées. Les profils d'expression de 2 peroxydases TaPrx107 et TaPrx115 ont été analysés dans 10 génotypes de blé dur (Figure 46). Le niveau d'expression du gène TaPrx107 diverge entre les 10 génotypes de blé. Il est sous-exprimé chez les génotypes BOU, AGY, BEN, W, VIT et BEL et surexprimé chez les génotypes OZ, B17 et DK d'un facteur 1,73, 2,08, et 2,15 respectivement. On note aussi que l'expression du gène TaPrx115 n'a pas été induite par le stress hydrique appliqué et est à peine détectable chez les génotypes DK (1,21) et OZ (1,53). Cependant, nous ne pouvons pas valider les résultats d'expression des 2 gènes POX car de trop grandes variations d'expression ont été mises en évidence entre les 3 répétitions biologiques effectuées. Selon les données de la base Peroxibase, le gène TaPrx107 est localisé au niveau des racines et des feuilles du blé tendre (*Triticum aestivum*). Il a été choisi en raison de son expression en conditions de stress hydrique. En effet, des travaux réalisés sur le blé tendre ont montré une surexpression de ce gène par la réduction de la quantité d'eau utilisée en arrosage (Sečenji *et al.*, 2010). D'autres études sur le système racinaire du blé tendre ont confirmé l'implication de ce gène dans la réponse au stress hydrique en utilisant le PEG 6000 (Csiszár *et al.*, 2012). La séquence du gène TaPrx115 a été isolée à partir de différents tissus du blé tendre. La littérature ne donne cependant pas d'informations sur l'expression de ce gène dans les différents compartiments de la plante. Les seules données disponibles concernent la stimulation par le stress hydrique de l'expression de son orthologue chez l'orge (le gène HvPrx59) (base PeroxiBase). Dans notre étude, nous pouvons constater une régulation négative du gène TaPrx115 dans la plupart des génotypes de blé dur. Dans la

cellule, différentes formes de peroxydases contrôlées par des gènes distincts sont présentes. L'expression de certains membres de cette famille pourrait être co-réglée avec les voies métaboliques génératrices de ROS tandis que d'autres seraient liés à la réponse au stress (Appel et Hirt, 2004). Dans le cas présent, la régulation négative de ce gène pourrait indiquer une diminution de l'activité d'une voie métabolique associée. Une autre possibilité est que dans ce cas, ce gène ne participe pas de façon majeure à la réponse au stress hydrique et que d'autres gènes puissent être impliqués dans l'élimination des ROS.

3.1.3. L'expression relative des gènes SOD

Parmi les gènes significativement induits suite à l'application du PEG 6000, une surexpression du gène TdMnSOD a été observée dans les feuilles des 10 génotypes de blé dur par un facteur de 2,43 (B17) à 5,87 (OZ) (Figure 46). Le gène TdMnSOD a été isolé pour la première fois d'une variété de blé dur nommé Om Rabia3 par Feki *et al.*, (2016). Ces auteurs ont rapporté une surexpression de ce gène dans différents stress, notamment le stress hydrique chez le blé dur, *Arabidopsis thaliana* et la levure. Des lignées transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* porteuses du gène TdMnSOD et soumises à un stress hydrique, ont révélées de faibles taux d'H₂O₂ par rapport à des plantes sauvages ainsi qu'une augmentation de l'activité des 3 systèmes enzymatiques : SOD, POX et CAT. Les mêmes auteurs ont démontré que l'expression du gène TdMnSOD dans des cellules de levures transformées augmente la tolérance aux contraintes oxydatives induites par le stress hydrique, le froid, le stress salin et l'H₂O₂. L'analyse par qRT-PCR de l'expression du gène TdMnSOD indiquent clairement une surexpression de celui-ci dans les feuilles du blé dur sous stress hydrique. Il en est de même dans les résultats obtenus par Feki *et al.*, (2016), où ils ont traité une variété de blé dur avec du PEG 6000 (15%) pendant 6 jours. Le gène TdMnSOD code pour une manganèse superoxyde dismutase mitochondriale qui a pour fonction d'éliminer le radical superoxyde (O₂^{•-}) qui s'accumule en conditions de stress.

Le stress hydrique affecte également l'expression du gène SOD1.1 (Figure 46). Globalement, il est surexprimé chez l'ensemble des génotypes de blé mais de façon plus importante chez OZ, DK, et BEL, d'un facteur de 4,99, 4,70, et 4,62 respectivement. Par ailleurs, il est en limite de significativité en étant surexprimé d'un facteur 1,63 chez W et 1,33 chez AGY. Une analyse transcriptomique réalisée par Wei *et al.*, (2013) a également montré une modification significative de l'expression du gène SOD1.1 chez deux cultivars de blé tendre traités avec du PEG 6000. Ce gène a été cartographié sur le bras long des chromosomes

Homologues du groupe 7 du blé tendre. L'enzyme qu'il code est un Cu/Zn superoxyde dismutase dont la fonction principale est la catalyse de la dismutation du radical hydroxyle au niveau des chloroplastes (Wu *et al.*, 1999). Des études menées chez le blé tendre ont montré que l'expression du gène SOD1.1 est induite par différents stress abiotiques : stress par chaleur (Kumar *et al.*, 2013), basses températures (Wu *et al.*, 1999) et à l'ozone (Li *et al.*, 2013). Cela permet de dire que l'enzyme Cu/ZnSOD intervient dans la tolérance du blé à de multiples stress.

L'exposition à la sécheresse peut entraîner une augmentation de la production des ROS dans les plantes. Les ROS peuvent attaquer les composants cellulaires de la plante et/ou délivrer des signaux pour détecter l'environnement modifié (Fridovich, 1991 ; Prasad *et al.*, 1994). L'exposition du blé à de longues périodes de sécheresse conduit à une tolérance accrue au stress oxydatif (Khanna-Chopra et Selote, 2007). De plus, les activités de plusieurs enzymes antioxydantes ont tendance à augmenter durant l'acclimatation au stress hydrique. Ces données suggèrent qu'une augmentation de la tolérance au stress hydrique peut s'accompagner d'une expression accrue de gènes spécifiques codant pour des enzymes antioxydantes. Les données de la RT-PCR quantitative ont montré une expression inductible des gènes CAT et SOD dans les feuilles de blé dur par application du PEG 6000 pendant une période de 10 jours. Les travaux de Melloul *et al.*, (2014) ont montré que l'expression la plus élevée des gènes impliqués dans la tolérance au stress hydrique chez le blé dur, a été observée à 10 jours de stress, ce qui suggère que l'intensité du stress peut affecter les profils d'expression génique lorsque *Triticum durum* est exposé à de plus longues périodes de stress hydrique.

Dans notre étude, le profil d'expression des différents gènes étudiés était spécifique à chaque génotype de blé dur. La surexpression des gènes de catalase notamment la *CAT3* durant l'acclimatation au stress, suggère leur rôle important dans la réponse au stress hydrique chez *Triticum durum*. Des gènes *CAT* insérés dans des plantes par transformation étaient capables d'améliorer la tolérance à de multiples stress abiotiques dans les cultures agricoles, notamment le riz (Matsumura *et al.*, 2002 ; Nagamiya *et al.*, 2007), la pomme de terre (M'Hamdi *et al.*, 2009), la tomate (El-Awady *et al.*, 2003) et le tabac (Guan *et al.*, 2009). Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques surexprimant constitutivement des gènes *CAT1* et *CAT2*, présentaient une tolérance à la chaleur significativement élevée par élimination du H₂O₂ (Chiang *et al.*, 2013). Le rôle de l'H₂O₂ dans les dommages induits par le stress est reconnu depuis longtemps mais il est désormais plus admis que cette ROS fait partie

intégrante des cascades de signalisation cellulaire et est un second messager indispensable dans les situations de stress biotiques et abiotiques. Il a été donc conclu que la régulation de l'expression des gènes CAT sert à limiter l'accumulation excessive de l' H_2O_2 tout en permettant aux fonctions de signalisation cellulaires essentielles de se produire (Luna *et al.*, 2005). Il a été prouvé que la surexpression des gènes SOD en conditions de sécheresse confère à la plante une meilleure tolérance au stress (Shiriga *et al.*, 2014 ; Harb *et al.*, 2015 ; Feki *et al.*, 2016). Dans nos conditions de travail, les transcrits codant pour les enzymes SOD, particulièrement la TdMnSOD, sont fortement induits par le PEG 6000. Les gènes MnSOD sont des gènes nucléaires dont les produits protéiques ciblent les mitochondries (Baek et Skinner, 2003). La surexpression de TdMnSOD observée dans cette étude suggère un mécanisme de protection ciblé sur les mitochondries. Le système de transport des électrons des mitochondries est bien connu pour être une source importante de production des ROS. En effet, la chaîne de transport des électrons s'est avérée très labile en conditions de stress hydrique (Tripathy et Oelmüller, 2012) et les électrons qui ne sont pas transportés vers l'accepteur d'électrons final de l' O_2 pour produire de l' H_2O , pourraient être utilisés pour former du superoxyde (O_2^\cdot). Eventuellement, en réponse à l'accumulation des ROS, le niveau d'expression du gène TdMnSOD a augmenté significativement (Figure 46) et semble montrer une expression accrue dans les feuilles des 10 génotypes de blé dur. Le gène SOD1.1 que nous avons mesuré est situé au niveau des chloroplastes, suggérant que la surexpression de celui-ci pourrait suffire à protéger les chloroplastes contre les dommages causés par les superoxydes durant la tolérance au déficit hydrique des blés dur. Si on considère que la SOD a un taux de catalyse très rapide, de la dismutation du O_2^\cdot en H_2O_2 et que les Cu/ZnSOD chloroplastiques sont très sensibles à l' H_2O_2 (Baek et Skinner, 2003), il semble raisonnable qu'un système de protection contre les ROS soit capable de maintenir une expression constante des Cu/ZnSOD par l'augmentation des niveaux d'expression des gènes responsables de l'élimination du H_2O_2 , produit par les SOD durant le stress hydrique. Cette possibilité peut être confirmée par le niveau accru d'expression du gène *CAT3*. D'autres enzymes peuvent aussi intervenir dans le piégeage de l' H_2O_2 comme l'APX et le GSH.

Il y a eu de nombreux rapports sur la production de plantes transgéniques tolérantes au stress abiotiques surexprimant différentes formes de SOD. Des protoplastes transformés de blé tendre avec une surexpression de Mn-SOD ont montré moins de dommages oxydatifs, une teneur plus élevée en H_2O_2 et une augmentation significative des activités SOD et GR sous stress photooxydatif (Melchiorre *et al.*, 2009). La surexpression d'une Mn-SOD chez des

plantes transgéniques d'*Arabidopsis* a également montré une tolérance accrue au sel (Wang *et al.*, 2004). En outre, ils ont montré que l'activité Mn-SOD ainsi que les activités Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, CAT et POX étaient significativement plus élevées chez les plantes transgéniques que chez les témoins. Des plantes transgéniques de tabac surexprimant le gène MnSOD ont montré une meilleure tolérance à de multiples stress abiotiques (Hamid Badawi *et al.*, 2004). Enfin, des travaux de Lee *et al.*, (2007a) ont montré que l'expression combinée des gènes Cu/Zn-SOD et APX dans des plantes transgéniques de la fétuque roseau, leur procurait une tolérance accrue aux stress des métaux lourds, à l'H₂O₂ et au paraquat.

La surexpression des gènes CAT et SOD ne peut pas être corrélée directement à l'augmentation de l'activité enzymatique. En effet, au niveau de l'expression génique, une seule isoforme a été testée alors que l'activité enzymatique testée est l'activité de plus d'une isoforme. (Furlan *et al.*, 2014).

L'expression des gènes peroxydases de classe III est régulée par divers facteurs environnementaux, dont le stress salin (Fan *et al.*, 2014), stress à l'aluminium (Kumari *et al.*, 2008), les polluants atmosphériques et les rayonnements ultraviolets (Kim *et al.*, 2007), le froid (Kim *et al.*, 2012), les dommages causés par les maladies des plantes et les ravageurs (Ansari *et al.*, 2007, Severino *et al.*, 2012). Cependant, à ce jour, les informations concernant l'expression des gènes POX de classe III médiée par le stress hydrique sont encore très limitées. Dans notre travail, les gènes POX (TaPrx107, TaPrx115) semblent ne pas être induits par le stress appliqué. Une observation frappante a été que le gène TaPrx107 est surexprimé dans certains génotypes de blé dur et sous exprimé chez d'autres. La raison de cette régulation négative et positive de ce gène reste encore inconnue. Peu de travaux ont associé l'expression des gènes POX au stress hydrique (Mohammadi *et al.*, 2008 ; Sečenji *et al.*, 2010 ; Csiszár *et al.*, 2012). Une étude menée sur 21 peroxydases dans le riz a montré une diversité importante dans les profils d'expression des gènes étudiés, principalement en réponse à différents stimuli (Hiraga *et al.*, 2000). Kim *et al.*, (2012) ont montré que des mutants d'*Arabidopsis thaliana* surexprimant 2 gènes de POX toléraient mieux le froid que l'écotype sauvage et présentaient moins de morphologies foliaires endommagées et de fuites d'ions. Ces auteurs suggèrent que la manipulation de l'expression d'un certain groupe de gènes POX peut fournir un outil pratique pour le développement des plantes avec une tolérance accrue au stress. La surexpression du gène AtPrx3 (POX3) chez *A. thaliana* a montré une meilleure tolérance au déficits hydrique et salin alors que la suppression de ce gène par un transcrit d'ARN antisens a donné des phénotypes sensibles et moins tolérants (Llorente *et al.*, 2002).

Collinge et Boller (2001) et Hiraga *et al.*, (2001) affirment que les gènes codants pour les POX répondent aux signaux liés aux stress biotiques et abiotiques et sont supposés jouer un rôle clé dans ces processus.

Conclusion

Le profil d'expression génique est devenu un outil important pour comprendre la réponse des plantes dans des conditions environnementales défavorables. Cette étude a clairement démontré que différents gènes ont été exprimés ou réprimés en réponse au stress et que le niveau de la réponse du même gène a été spécifique pour chaque génotype.

Les gènes de tolérance, marqueurs de différence d'expression supérieure à 1,5 entre les génotypes de blé dur, sont au nombre de 4 : CATA, CAT3, TdMnSOD et SOD1.1. La surexpression de ces gènes peut conduire à une meilleure tolérance au déficit hydrique et à une réponse cellulaire appropriée par plusieurs mécanismes foliaires afin d'éviter les dommages oxydatifs induits par le stress hydrique. Sur la base de l'ampleur de l'expression des gènes étudiés, il est apparu que la TdMnSOD dans les mitochondries, la SOD1.1 dans les chloroplastes et la CAT3, font partie des enzymes antioxydantes primaires qui interviennent dans la protection de la machinerie photosynthétique des chloroplastes et des mitochondries qui sont des sites majeurs de la production des ROS dans la plante. L'induction de ces gènes lors du stress en font des candidats privilégiés pour la dynamique de la réponse adaptative au stress hydrique.

Notre étude suggère que le blé dur peut reprogrammer efficacement et globalement l'expression régulée de certains gènes codants pour des enzymes antioxydantes sous stress hydrique. Cette approche moléculaire a élargi nos connaissances sur les gènes induits par le stress hydrique et a permis d'identifier les gènes CATA, CAT3, TdMnSOD et SOD1.1 comme gènes candidats pour d'éventuelles cibles de génie génétique dans le but d'améliorer le blé dur.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

La mise en évidence des mécanismes impliqués dans la tolérance au stress hydrique du blé dur, notamment ceux des antioxydants enzymatiques, a pour objectif d'augmenter les connaissances dans ce domaine, mais aussi de caractériser aux niveaux physiologique, génétique et moléculaire, les déterminants majeurs contrôlant les niveaux des ROS cellulaires et de les désigner comme indicateurs adéquats pour la sélection de cultivars tolérants à la sécheresse. Dans ce contexte, 3 constituants majeurs du système antioxydant (SOD, CAT et GPOX) ont été évalués dans les parties végétatives de 10 géotypes de blé dur, afin d'établir d'éventuelles corrélations entre l'activité enzymatique, la diversité génétique de ces enzymes et la tolérance de la plante au stress appliqué.

Une première approche a consisté à étudier l'impact du stress oxydatif sur la physiologie des feuilles des plantes choisies, sous conditions de divers stress abiotiques. Une analyse de diversité nous a permis de décrire la capacité à tolérer le stress des 10 géotypes étudiés. Nous avons montré que les différents stress appliqués engendrent des perturbations relatives à l'accumulation des ROS cellulaires et qui se manifestent par une diminution de la stabilité membranaire, de la teneur en chlorophylle totale et une augmentation de la peroxydation lipidique, du taux d' H_2O_2 et de l'activité des enzymes antioxydantes. À l'issue de cette étude, nous avons constaté que les géotypes ayant des activités SOD, CAT et GPOX élevées présentaient moins de dommages oxydatifs. Au niveau biochimique, les géotypes DK, B17 et BEL tolèrent mieux le stress oxydatif déclenché par les 3 types de stress, avec des dommages oxydatifs mineurs associés à une réponse plus élevée des enzymes antioxydantes. Ces géotypes pourraient être considérés comme cultivars adéquats dans les programmes visant à améliorer le développement des plantes plus tolérantes à la sécheresse. L'analyse de corrélation entre les paramètres biochimiques et physiologiques a fait ressortir la singularité de l'enzyme SOD, qui est particulièrement liée à la teneur relative en eau (RWC), la conductance stomatique (g_s) et la teneur en chlorophylle totale (CHL). En effet, cette enzyme constitue le premier et l'un des principaux maillons du processus de défense contre les radicaux libres de par son rôle dans l'élimination du radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Le peroxyde d'hydrogène engendré par la dismutation du radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ sera contrôlé par la CAT, la GPOX et d'autres enzymes du système antioxydant comme l'APX et la GPX. D'autres part, la corrélation entre les paramètres physiologiques liés à l'état hydrique des plantes et les biomarqueurs du stress

oxydatif à savoir le taux du MDA, la teneur en H₂O₂, la REL et les activités enzymatiques suggère que ces derniers peuvent être utilisés comme indicateurs biochimiques pour la sélection de cultivars tolérants à la sécheresse.

Dans une seconde partie de notre travail, une analyse par électrophorèse native (PAGE) d'isoenzymes de GPOX, CAT et SOD a été élaborée, afin d'évaluer si les variations globales observées dans l'analyse biochimique résultaient de variations qualitatives (présence/absence) ou quantitatives spécifiques à certaines isoenzymes. Le stress hydrique a été simulé à l'aide du PEG 6000. Le test de comparaison des moyennes a été réalisé pour déterminer l'effet du PEG sur le potentiel osmotique, la teneur en chlorophylle totale (a+b) et la teneur en caroténoïdes. D'après nos résultats, le stress causé par le PEG 6000 dans la solution nutritive a entraîné une baisse du potentiel osmotique foliaire des 10 génotypes de blé dur, indiquant une accumulation de solutés qui permettraient probablement le maintien de la turgescence cellulaire. Le stress hydrique a également induit des dommages oxydatifs, qui se sont manifestés par des diminutions dans la teneur en chlorophylle totale et en caroténoïdes. Ces altérations étaient plus importantes chez les génotypes VIT, BEN, COL et W. La PAGE a permis d'identifier au total 10 isoformes de SOD, 3 de CAT, et 4 isoformes de GPOX sous conditions de stress hydrique. Les profils électrophorétiques ont montré une augmentation dans l'intensité des enzymes étudiées et une apparition d'isoformes supplémentaires dont une de CAT et de 4 de SOD chez les plantes stressées. Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux antérieurs (Boaretto *et al.*, 2014 ; Huseynova *et al.*, 2015) qui ont confirmé que les modifications quantitatives et qualitatives des systèmes antioxydants enzymatiques, sont souvent liées aux niveaux de tolérance au stress, avec des changements observés dans l'intensité et le nombre des bandes, qui sont relatifs à l'augmentation de l'activité isoenzymatique. Les zymogrammes exprimant des bandes avec une intensité et un nombre différentiels chez les 10 génotypes de blé, montrent l'état variable des isoenzymes affectées par le stress hydrique. Ces données suggèrent que la présence de plusieurs isoenzymes qui exercent la même fonction catalytique, est une caractéristique très importante qui étend la capacité d'adaptation au stress hydrique. On peut conclure que les 3 systèmes enzymatiques SOD, CAT et GPOX sont de bons indicateurs du stress hydrique, qui peuvent être appliqués pour la caractérisation de cultivars de blé dur en termes de tolérance à cet aléa.

Les données bibliographiques d'expression des gènes codants pour ces enzymes nous apprennent qu'ils sont généralement surexprimés en cas de stress. Nous avons donc complété les approches d'analyse biochimique et électrophorétique par une approche moléculaire. Une recherche bibliographique couplée à une approche bioinformatique nous a d'abord conduit à identifier des gènes réputés pour leur rôle dans la détoxification des espèces réactives d'oxygènes chez le blé. L'utilisation de la RT-PCR quantitative suivie d'une interprétation des résultats en termes d'induction et de quantification des gènes, nous a permis d'évaluer l'expression relative des transcrits CAT, POX et SOD. Les résultats obtenus ont mis en évidence la surexpression de 4 gènes impliqués dans la réponse des plantes au stress hydrique, qui sont : CATA, CAT3, TdMnSOD et SOD1.1. Le profil d'expression de ces différents gènes était spécifique à chaque génotype de blé dur.

Les plantes perçoivent et répondent aux stress abiotiques. Lors de la perception du stress, un signal est communiqué aux composants en aval, ce qui entraîne un changement dans l'expression des gènes et donc des protéines nécessaires à la réparation initiale des dommages et à la reprogrammation physiologique pour une meilleure adaptation (Melloul *et al.*, 2014). La surexpression des gènes CATA, CAT3, TdMnSOD et SOD1 peut donc conduire à une meilleure tolérance au déficit hydrique et à une réponse cellulaire appropriée, par plusieurs mécanismes, afin d'éviter les dommages oxydatifs foliaires. Par conséquent, ces gènes peuvent être validés comme marqueurs de stress pour l'étude du déficit en eau chez le blé dur.

Perspectives

Une meilleure compréhension des dommages oxydatifs induits par la sécheresse, ainsi que des mécanismes de protection inhérents aux plantes par des approches métabolomiques et transcriptomiques nous aideraient à concevoir de nouvelles stratégies pour le développement de variétés de blé tolérantes à la sécheresse. Ainsi, nos travaux de thèse ont permis de caractériser certaines modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires s'opérant sur les parties végétatives des plantules de blé dur en conditions de stress. Nous avons pu démontrer que le caractère de détoxification des ROS par les SOD, POX et CAT est un caractère complexe, multigénique, contrôlé par plusieurs acteurs moléculaires. Notre étude a permis d'ajouter de nouvelles informations au tableau général des gènes activés et peut également être considérée comme un point de départ pour une analyse plus poussée de l'expression des gènes sous stress hydrique. En perspective, nos résultats pourraient être utilement complétés par :

- Diverses approches de renforcement du système de défense antioxydant enzymatique : l'amélioration des activités enzymatiques est considérée comme une approche plausible pour la tolérance du blé à la sécheresse. Celles-ci comprennent la manipulation génétique et/ou l'utilisation de protecteurs exogènes tels que des nutriments végétaux (B, K, P, N, Si, Zn, SNP, SOP), des phytohormones (ABA, SA), des antioxydants (AsA, GSH, tocophérol, composés phénoliques), des osmolytes (glycine-bétaïne, tréhalose), des molécules de signalisation (Ca, H₂O₂, NO) et des bactéries probiotiques (endophytes et épiphytes).
- L'étude de l'activité des antioxydants enzymatiques du système racinaire : notamment des POX pariétales, qui constituent une famille multigénique impliquées dans plusieurs processus physiologiques, dont l'élongation cellulaire des racines sous conditions de déficit hydrique.
- L'utilisation des gènes identifiés dans cette étude pour une démarche de sélection assistée par marqueurs, ainsi qu'une évaluation du pouvoir antioxydant de ces gènes sur les composantes du rendement : la structuration des ressources génétiques chez le blé dur permettra d'optimiser le choix des géniteurs en sélectionnant les cultivars possédant les segments d'intérêt. Une plante qui accumule plusieurs gènes de tolérance au stress oxydatif est une plante qui peut présenter un meilleur rendement.
- La poursuite de l'identification des gènes codants pour des enzymes antioxydantes impliquées dans la réponse au stress hydrique : malgré les similitudes entre les différentes plantes, il ne faut pas oublier que des espèces telles que le blé dur, avec un génome beaucoup moins caractérisé par rapport aux plantes modèles, peut offrir des caractéristiques uniques et intéressantes. Son niveau élevé de tolérance et de diversité peut fournir des ressources importantes pour la validation des gènes candidats et accélérer les programmes de sélection.
- L'étude de la réponse antioxydante des enzymes SOD, CAT, et POX dans diverses conditions de stress : exposer des plantes de blé dur à des stress multiples permettrait d'identifier les gènes intervenant dans la tolérance au stress oxydant en cas de « multistress » et le développement de cultures avec des tolérances améliorées.
- L'extension de l'étude sur d'autres systèmes enzymatiques connus également pour leurs rôles dans la détoxification des ROS, comme l'APX, la GPX, et la GST et établir les synergies potentielles s'opérant entre antioxydants. Ainsi, une étude plus complète des antioxydants enzymatiques et des marqueurs du stress oxydant comme les $\cdot\text{OH}$ et

les $O_2^{\cdot-}$, permettrait une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans la régulation des ROS.

Références bibliographiques

- Abedi T, Pakniyat H. 2010.** Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **46**: 27–34.
- Abeles FB, Dunn LJ, Morgens P, Callahan A, Dinterman RE, Schmidt J. 1988.** Induction of 33-kD and 60-kD peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiology* **87**: 609–615.
- Adams III WW, Zarter CR, Mueh KE, Amiard V, Demmig-Adams B. 2008.** Energy dissipation and photoinhibition: A Continuum of Photoprotection In: Adams B, III WWA, Mattoo AK, (eds). *Advances in photosynthesis and respiration. Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment*. Springer Netherlands, 49–64.
- Adjabi A. 2011.** Etude de la tolérance aux stress abiotiques chez le blé dur (*Triticum durum* Desf) sous étage du semi-aride. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat Es-Sciences en agronomie. Ecole nationale supérieure d'agronomie El Harrach-Alger
- Ahmad P, Jamsheed S, Hameed A, et al. 2014.** Chapter 11 - drought stress induced oxidative damage and antioxidants in plants In: *Oxidative Damage to Plants*. San Diego: Academic Press, 345–367.
- Aibara S, Yamashita H, Mori E, Kato M, Morita Y. 1982.** Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase. *Journal of Biochemistry* **92**: 531–539.
- Aldaoui A, Hartani M. 2000.** Gestion de l'irrigation du blé par des indicateurs de l'état hydrique. In : Royo C, Nachit M, Di Fonzo N, Araus J.L, (eds). *Durum wheat improvement in the mediterranean region : New challenges*. Zaragoza : CIHEAM. p. 579–582 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 40)
- Ali A, Arshad M, Naqvi SMS, et al. 2014b.** Exploitation of synthetic-derived wheats through osmotic stress responses for drought tolerance improvement. *Acta Physiologiae Plantarum* **36**: 2453–2465.
- Ali S, Amar M, Kahina HC. 2014a.** Mise en évidence de la caractérisation variétale la distinction inter-variétale et contrôle de l'homogénéité de quatre variétés de blé dans la région de Guelma (Algérie). *Journal of Applied Biosciences* **80**: 6983–6999.
- Ali-Benali MA, Alary R, Joudrier P, Gautier M-F. 2005.** Comparative expression of five Lea Genes during wheat seed development and in response to abiotic stresses by real-time quantitative RT-PCR. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1730**: 56–65.
- Almagro L, Gómez Ros LV, Belchi-Navarro S, Bru R, Ros Barceló A, Pedreño MA. 2009.** Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of Experimental Botany* **60**: 377–390.
- Almeselmani M, Deshmukh PS, Sairam RK, Kushwaha SR, Singh TP. 2006.** Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. *Plant Science* **171**: 382–388.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002.** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1331–1341.
- Amirjani M. 2012.** Estimation of wheat responses to “high” heat stress. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* **6**: 222–233.

- Ananieva EA, Alexieva VS, Popova LP. 2002.** Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* **159**: 685–693.
- Anaya F, Fghire R, Wahbi S, Loutfi K. 2016.** Antioxidant enzymes and physiological traits of *Vicia faba* L. as affected by salicylic acid under salt stress. *Journal of Materials and Environmental Sciences* **8**: 2549–2563.
- Ansari KI, Walter S, Brennan JM, et al. 2007.** Retrotransposon and gene activation in wheat in response to mycotoxigenic and non-mycotoxigenic-associated Fusarium stress. *Theor. Appl. Genet.* **114**: 927–937.
- Apel K, Hirt H. 2004.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**: 373–399.
- Aprile A, Havlickova L, Panna R, et al. 2013.** Different stress responsive strategies to drought and heat in two durum wheat cultivars with contrasting water use efficiency. *BMC Genomics* **14**: 1–18.
- Arabidopsis Genome Initiative. 2000.** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796–815.
- Arnon DI. 1949.** Copper Enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* **24**: 1–15.
- Asada K, Takahashi M. 1987.** Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis In: D.J. Kyle et al, eds. *Photoinhibition*. Elsevier, Amsterdam. 227–287.
- Asada K. 1994.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissue In: Foyer CH, Mullineaux PM, (eds). *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. Boca Raton: CRC Press, 77–104.
- Asada K. 2006.** Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* **141**: 391–396.
- Atkin OK, Macherel D. 2009.** The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of Botany* **103**: 581–597.
- Avery SV. 2011.** Molecular targets of oxidative stress. *The Biochemical Journal* **434**: 201–210.
- Baaziz M, Quacif N, Bendiab K, Aouad A. 2006.** Les peroxydases des plantes. Aspects théoriques et applications pratiques. *Deuxième Congrès International de Biochimie, Agadir, Maroc*, 9–12.
- Baaziz M. 1989.** The activity and preliminary characterization of peroxidases in leaves of cultivars of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *New Phytologist* **111**: 403–411.
- Badawi GH, Tahir ISA, Nakata N, Tanaka K. 2007.** Induction of some antioxidant enzymes in selected wheat genotypes. *8th African Crop Science Society Conference, El-Minia, Egypt*, 841–848.
- Baek K-H, Skinner DZ. 2003.** Alteration of antioxidant enzyme gene expression during cold acclimation of near-isogenic wheat lines. *Plant Science* **165**: 1221–1227.

- Bahlouli F, Bouzerzour H, Benmahammed A, Hassous KL. 2005.** Selection of High Yielding and Risk Efficient Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Cultivars under Semi-arid Conditions. *Journal of Agronomy* **4**: 360–365.
- Bajji M, Lutts S, Kinet JM. 2000.** Physiological changes after exposure to and recovery from polyethylene glycol-induced water deficit in roots and leaves of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars differing in drought resistance. *Journal of Plant Physiology* **157**: 100–108.
- Bajji M, Lutts S, Kinet J-M. 2001.** Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology* **160**: 669–681.
- Bakalovic N, Passardi F, Ioannidis V, et al. 2006.** PeroxiBase: A class III plant peroxidase database. *Phytochemistry* **67**: 534–539.
- Baker CJ, Deahl K, Domek J, Orlandi EW. 2000.** Scavenging of H₂O₂ and production of oxygen by horseradish peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **382**: 232–237.
- Baker NR. 1991.** A possible role for photosystem II in environmental perturbation of photosynthesis. *Physiologia Plantarum* **81**: 563–570.
- Balouchi HR. 2010.** Screening wheat parents of mapping population for heat and drought tolerance, detection of wheat genetic variation. *World Acad Sci Eng Technol* **37**: 981–991.
- Barker DJ, Sullivan CY, Moser LE. 1993.** Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity, and proline in five forage grasses. *Agronomy & Horticulture -- Faculty Publications* **85**: 270–275.
- Barrs HD, Weatherley PE. 1962.** A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* **15**: 413–428.
- Bartoli CG, Gómez F, Martínez DE, Guiamet JJ. 2004.** Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* **55**: 1663–1669.
- Batista F, Bañares A, Caujapé-Castells J, Carqué E, Marrero-Gómez M, Sosa PA. 2001.** Allozyme diversity in three endemic species of *Cistus* (Cistaceae) from the Canary Islands: intraspecific and interspecific comparisons and implications for genetic conservation. *American Journal of Botany* **88**: 1582–1592.
- Bauwe H, Hagemann M, Kern R, Timm S. 2012.** Photorespiration has a dual origin and manifold links to central metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 269–275.
- Bayoumi TY, Eid MH, Metwali EM. 2008.** Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology* **7**: 2341–2352.
- Beauchamp C, Fridovich I. 1971.** Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* **44**: 276–287.
- Belkharchouche H, Benbelkacem A, Bouzerzour H, Benmahammed A. 2015.** Flag leaf and awns ablation and spike shading effects on spike yield and kernel weight of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. *durum*) under rainfed conditions. *Adv Environ Biol* **9**: 184–191.

- Benmahammed A, Nouar H, Haddad L, Laala Z, Abdelmalek O, Bouzerzour H. 2010.** Analyse de la stabilité des performances de rendement du blé dur (*Triticum durum* Desf.) sous conditions semi-arides. *BASE* **14**: 177–186.
- Berry EA, Guergova-Kuras M, Huang LS, Crofts AR. 2000.** Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annual Review of Biochemistry* **69**: 1005–1075.
- Biehler K, Fock H. 1996.** Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiology* **112**: 265–272.
- Bitá CE, Gerats T. 2013.** Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science* **4**: 1–18.
- Blackman SA, Obendorf RL, Leopold AC. 1995.** Desiccation tolerance in developing soybean seeds: The role of stress proteins. *Physiologia Plantarum* **93**: 630–638.
- Blokhina O, Fagerstedt KV. 2010.** Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum* **138**: 447–462.
- Boaretto LF, Carvalho G, Borgo L, et al. 2014.** Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant physiology and biochemistry* **74**: 165–175.
- Bolwell GP, Wojtaszek P. 1997.** Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 347–366.
- Boo YC, Jung J. 1999.** Water deficit — Induced oxidative stress and antioxidative defenses in rice plants. *Journal of Plant Physiology* **155**: 255–261.
- Bousba R, Djekoun A, Duraa S, Ykhlef N. 2013.** Caractérisation moléculaire et association marqueur SSR phénotype pour la tolérance au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). *European Scientific Journal* **9**: 186–201.
- Bousba R, Ykhlef N, Djekoun A. 2009.** Water use efficiency and flat leaf photosynthetic in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum* Desf). *World Journal of Agricultural Sciences* **5**: 609–616.
- Bozzini A. 1988.** Origin, distribution, and production of durum wheat in the world In: Fabriani G and Lintas C, (eds). *Durum wheat: chemistry and technology*. AACCC, Minnesota, USA., 1–16.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Britt AB. 1999.** Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science* **4**: 20–25.
- Brou YC, Zézé A, Diouf O, Eyletters M. 2007.** Water stress induces overexpression of superoxide dismutases that contribute to the protection of cowpea plants against oxidative stress. *African Journal of Biotechnology* **6**: 1982–1986.

- Broughton WJ, Dilworth MJ. 1971.** Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal* **125**: 1075–1080.
- Bueno P, Varela J, Gimeénez-Gallego G, del Río LA. 1995.** Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiology* **108**: 1151–1160.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. 2009.** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* **55**: 611–622.
- Caglar O, Ozturk A, Aydin M, Bayram S. 2011.** Paraquat tolerance of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **10**: 3363–3367.
- Cakmak I, Marschner H. 1992.** Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiology* **98**: 1222–1227.
- Cakmak I, Strbac D, Marschner H. 1993.** Activities of Hydrogen Peroxide-Scavenging Enzymes in Germinating Wheat Seeds. *Journal of Experimental Botany* **44**: 127–132.
- Cannon RE, White JA, Scandalios JG. 1987.** Cloning of cDNA for maize superoxide dismutase 2 (SOD2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 179–183.
- Carpita N, Sabularse D, Montezinos D, Delmer DP. 1979.** Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science* **205**: 1144–1147.
- Chahbar S, Belkhodja M. 2016.** Water deficit effects on osmolyts traits in five durum wheat varieties (*Triticum durum*). *International Journal of Innovation and Applied Studies* **17**: 757–767.
- Chai T-T, Fadzillah NM, Kusnan M, Mahmood M. 2005.** The effect of oxidative stress on “Berangan” and “Mas” cultivars. *Infomusa* **14**: 32–36.
- Chakraborty U, Pradhan B. 2012.** Drought stress-induced oxidative stress and antioxidative responses in four wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Archives of Agronomy and Soil Science* **58**: 617–630.
- Chang CJ, Kao CH. 1997.** Paraquat toxicity is reduced by metal chelators in rice leaves. *Physiologia Plantarum* **101**: 471–476.
- Cha-Um S, Yooyongwech S, Supaibulwatana K. 2010.** Water deficit stress in the reproductive stage of four indica rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. *Pakistan Journal of Botany* **42**: 3387–3398.
- Chelikani P, Carpena X, Fita I, Loewen PC. 2003.** An electrical potential in the access channel of catalases enhances catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 31290–31296.
- Chen C, Dickman MB. 2005.** Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3459–3464.

- Chennafi H, Aidaoui A, Bouzerzour H, Saci A. 2006.** Yield Response of Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Cultivar Waha to Deficit Irrigation under Semi Arid Growth Conditions. *Asian Journal of Plant Sciences* **5**: 854–860.
- Chiang C, Chen S-P, Chen L-F, Chiang M-C, Chien H-L, Lin K-H. 2013.** Expression of the broccoli catalase gene (BoCAT) enhances heat tolerance in transgenic Arabidopsis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **23**: 266–277.
- Chiang Y-J, Wu Y-X, Chiang M-Y, Wang C-Y. 2008.** Role of Antioxidative System in Paraquat Resistance of Tall Fleabane (*Conyza sumatrensis*). *Weed Science* **56**: 350–355.
- China B, Ghafir Y, Daube G. 2002.** Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Annales de médecine vétérinaire* **146**: 99–109.
- Choi SM, Suh KH, Kim J-S, Park Y-I. 2001.** Inactivation of photosystem I in cucumber leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress. *Journal of Photoscience* **8**: 13–17.
- Cia M c., Guimarães A c. r., Medici L o., Chabregas S m., Azevedo R a. 2012.** Antioxidant responses to water deficit by drought-tolerant and -sensitive sugarcane varieties. *Annals of Applied Biology* **161**: 313–324.
- Clifford SC, Arndt SK, Corlett JE, et al. 1998.** The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *Journal of Experimental Botany* **49**: 967–977.
- Collinge M, Boller T. 2001.** Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Molecular Biology* **46**: 521–529.
- Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, et al. 1999.** Purification of catalase from pea leaf peroxisomes: identification of five different isoforms. *Free Radical Research* **31**: 235–241.
- Couée I, Sulmon C, Gouesbet G, El Amrani A. 2006.** Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 449–459.
- Cruz de Carvalho MH. 2008.** Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 156–165.
- Csiszár J, Gallé A, Horváth E, et al. 2012.** Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant physiology and biochemistry* **52**: 119–129.
- Cuin TA, Shabala S. 2007.** Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in Arabidopsis roots. *Plant, Cell & Environment* **30**: 875–885.
- Das K, Roychoudhury A. 2014.** Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* **2**: 1–13.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F. 2000.** Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **57**: 779–795.

- Dat JF, Lopez-Delgado H, Foyer CH, Scott IM. 1998.** Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology* **116**: 1351–1357.
- Davies KJ. 2000.** Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life* **50**: 279–289.
- Dehury B, Sarma K, Sarmah R, et al. 2013.** In silico analyses of superoxide dismutases (SODs) of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* **22**: 150–156.
- del Río LA del, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB. 2006.** Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* **141**: 330–335.
- del Río LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA. 2003.** Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* **54**: 923–933.
- Delannoy É, Marmey P, Penel C, Nicole M. 2004.** Les peroxydases végétales de classe III. *Acta Botanica Gallica* **151**: 353–380.
- Demidchik V, Cuin TA, Svistunenko D, et al. 2010.** Arabidopsis root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death. *Journal of Cell Science* **123**: 1468–1479.
- Demidchik V. 2014.** Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* **109**: 212–228.
- Deshmukh PS, Sairam RK, Shukla DS. 1991.** Measurement of ion leakage as a screening technique for drought resistance in wheat genotypes. *Indian J. Plant Physiol.* **34**: 89–91.
- Desikan R, Clarke A, Hancock JT, Neill SJ. 1999.** H₂O₂ activates a MAP kinase-like enzyme in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1863–1866.
- Devi R, Kaur N, Gupta AK. 2012.** Potential of antioxidant enzymes in depicting drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **49**: 257–265.
- Dmochowska M, Nadolska-Orczyk A, Orczyk W. 2013.** Roles of peroxidases and NADPH oxidases in the oxidative response of wheat (*Triticum aestivum*) to brown rust (*Puccinia triticina*) infection. *Plant Pathology* **62**: 993–1002.
- Dodge AD. 1971.** The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Endeavour* **30**: 130–135.
- Drumm H, Schopfer P. 1974.** Effect of phytochrome on development of catalase activity and isoenzyme pattern in mustard (*Sinapis alba* L.) seedlings : A reinvestigation. *Planta* **120**: 13–30.
- Du Y-Y, Wang P-C, Chen J, Song C-P. 2008.** Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**: 1318–1326.

- Ebrahimian E, Bybordi A. 2011.** Influence of different proportion of nitrate, ammonium and silicium on activity of antioxidant enzymes and some physiological traits in sunflower under conditions of salt stress. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **9**: 1052–1058.
- Egert M, Tevini M. 2002.** Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany* **48**: 43–49.
- Eising R, Trelease RN, Ni W. 1990.** Biogenesis of catalase in glyoxysomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **278**: 258–264.
- Ekmekci Y, Terzioglu S. 2005.** Effects of oxidative stress induced by paraquat on wild and cultivated wheats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **83**: 69–81.
- El-Awady M, Iwaki T, Iqbal M, Tamoi M, Shigeoka S, Wadano A. 2003.** Overexpression of bacterial catalase in tomato leaf chloroplast enhances photo-oxidative stress tolerance. *Plant, Cell & Environment* **26**: 2037–2046.
- Elsheery NI, Cao K-F. 2008.** Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* **30**: 769–777.
- Elstner E. 1991.** Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells In: Pell E.J. and Steffen K.L, (eds). *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. Rockville, M.D: American Soc. Plant Physiol, 13–25.
- El-Tayeb MA. 2005.** Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation* **45**: 215–224.
- Erchidi A.E., Talouizte A., Benbella M. 2000.** Relation entre certains paramètres contrôlant les pertes en eau et le rendement grain chez neuf variétés de blé dur soumises au stress hydrique. In : Royo C, Nachit M, Di Fonzo N, Araus J.L, (eds). *Durum wheat improvement in the Mediterranean region : New challenges*. Zaragoza : CIHEAM. p. 279–282. (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n. 40).
- Ermias HH. 2013.** The Effect of Natural Variation at Ppd-H1 and HvELF3 on Responses to Osmotic Stress in Barley (*Hordeum vulgare*). Thèse de doctorat en mathématiques et sciences naturelles. Université de Cologne-Allemagne.
- Esaka M, Yamada N, Kitabayashi M, et al. 1997.** cDNA cloning and differential gene expression of three catalases in pumpkin. *Plant Molecular Biology* **33**: 141–155.
- Esfandiari E, Shekari F, Shekari F, Esfandiari M. 2007.** The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **35**: 48–56.
- Espelie KE, Franceschi VR, Kolattukudy PE. 1986.** Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. *Plant Physiology* **81**: 487–492.
- Fan H-F, Chen W, Yu Z, Du C-X. 2014.** Isolation and characterization of a class III peroxidase cDNA from cucumber under salt stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **139**: 529–536.

FAO. 2016. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>

FAO. 2017.

<http://www.fao.org/giews/earthobservation/country/index.jsp?lang=fr&type=21&code=DZA>

Faria T, Silvério D, Breia E, et al. 1998. Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia Plantarum* **102**: 419–428.

Farmer EE, Mueller MJ. 2013. ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 429–450.

Farooq S, Azam F. 2001. Co-existence of salt and drought tolerance in Triticeae. *Hereditas* **135**: 205–210.

Fath A, Bethke P, Beligni V, Jones R. 2002. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1273–1282.

Favier A. 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'actualité chimique*: 108–115.

Feillet P. 2000. *Le grain de blé: Composition et utilisation*. Editions Quae. INRA, Paris. p. 308

Feki K, Farhat-Khemakhem A, Kamoun Y, Saibi W, Gargouri A, Brini F. 2016. Responses of transgenic Arabidopsis plants and recombinant yeast cells expressing a novel durum wheat manganese superoxide dismutase TdMnSOD to various abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* **198**: 56–68.

Feki K, Kamoun Y, Ben Mahmoud R, Farhat-Khemakhem A, Gargouri A, Brini F. 2015. Multiple abiotic stress tolerance of the transformants yeast cells and the transgenic Arabidopsis plants expressing a novel durum wheat catalase. *Plant physiology and biochemistry* **97**: 420–431.

Feng W, Hongbin W, Bing L, Jinfa W. 2006. Cloning and characterization of a novel splicing isoform of the iron-superoxide dismutase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* **24**: 734–742.

Fink RC, Scandalios JG. 2002. Molecular evolution and structure--function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **399**: 19–36.

Foyer C, Noctor G. 2003. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**: 355–364

Foyer CH, Descourvières P, Kunert KJ. 1994. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell & Environment* **17**: 507–523.

Foyer CH, Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* **17**: 1866–1875.

Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L. 2002. *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. *Journal of Bacteriology* **184**: 6351–6356.

- Fridovich I. 1991.** Molecular oxygen; Friend and foe In: Pell EJ, Steffen KL, (eds). *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1–5.
- Fridovich I. 1995.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **64**: 97–112.
- Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, et al. 1996.** Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology* **112**: 327–336.
- Fry SC. 1986.** Cross-Linking of Matrix Polymers in the Growing Cell Walls of Angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 165–186.
- Fryer MJ, Andrews JR, Oxborough K, Blowers DA, Baker NR. 1998.** Relationship between CO₂ assimilation, photosynthetic electron transport, and active O₂ metabolism in leaves of maize in the field during periods of low temperature. *Plant Physiology* **116**: 571–580.
- Furlan AL, Bianucci E, Tordable M del C, Castro S, Dietz K-J. 2014.** Antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in peanut nodules during a drought and rehydration cycle. *Functional Plant Biology* **41**: 704–713.
- Gadallah M a. A. 1999.** Effects of proline and glycinebetaine on *Vicia Faba* responses to salt stress. *Biologia Plantarum* **42**: 249–257.
- Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL. 1997.** Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology* **4**: 1032–1038.
- Gajhede M. 2001a.** Plant peroxidases: substrate complexes with mechanistic implications. *Biochemical Society Transactions* **29**: 91–98.
- Gajhede M. 2001b.** Horseradish Peroxidase In: Messerschmidt A, Huber R, Poulos TL, Wieghardt K., (eds). *Handbook of Metalloproteins*. John-Wiley and Sons: New York. 195–210.
- Galmés J, Abadía A, Medrano H, Flexas J. 2007.** Photosynthesis and photoprotection responses to water stress in the wild-extinct plant *Lysimachia minoricensis*. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 308–317.
- Ganji Arjenaki F, Jabbari R, Morshedi A. 2012.** Evaluation of drought stress on relative water content, chlorophyll content and mineral elements of wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. *Intl J Agri Crop Sc* **4**: 726–729.
- Garcia R, Kaid N, Vignaud C, Nicolas J. 2000.** Purification and some properties of catalase from wheat germ (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 1050–1057.
- Garg N, Manchanda G. 2009.** ROS generation in plants: Boon or bane? *Plant Biosystems* **143**: 81–96.
- Gaspar T, Penel C, Thorpe T, Greppin H. 1982.** Peroxidases at the subcellular level, their biosynthesis and its regulation. In: Penel, T. Gaspar, Greppin, H. *Peroxidases: A Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants*. University of Geneva: Geneva. 71–87.

- Gaussorgues G. 1999.** *La thermographie infrarouge. Principes, Technologie, Applications, 4ème édition.* Paris: Tec & Doc Lavoisier. p. 584.
- Gibson UE, Heid CA, Williams PM. 1996.** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* **6**: 995–1001.
- Gill SS, Tuteja N. 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 909–930.
- Girardi CL. 2006.** Caractérisation fonctionnelle d'un facteur d'élongation mitochondrial LeEF-Tsmt chez la tomate. Approches par transgénèse et protéomique. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse en Qualité et Sécurité des Aliments. Ecole doctorale SEVAB : Université Toulouse III.
- Goff SA, Ricke D, Lan T-H, et al. 2002.** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**: 92–100.
- Gopal J, Iwama K. 2007.** In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Reports* **26**: 693–700.
- Grene R. 2002.** Oxidative Stress and Acclimation Mechanisms in Plants. *The Arabidopsis Book* **1**: 1–20.
- Guan L, Scandalios JG. 1995.** Developmentally related responses of maize catalase genes to salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 5930–5934.
- Guan L, Scandalios JG. 1996.** Molecular evolution of maize catalases and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic catalases. *Journal of Molecular Evolution* **42**: 570–579.
- Guan Z, Chai T, Zhang Y, Xu J, Wei W. 2009.** Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. *Chemosphere* **76**: 623–630.
- Gulen H, Eris A. 2004.** Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* **166**: 739–744.
- Guo R, Hao WP, Gong DZ, Zhong XL, Gu FX. 2013.** Effects of water stress on germination and growth of wheat, photosynthetic efficiency and accumulation of metabolites In: Maria C. Hernandez Soriano, (ed). *Soil Processes and Current Trends in Quality Assessment.* IntechOpen. 367–380.
- Guo Z, Chen D, Schnurbusch T. 2015.** Variance components, heritability and correlation analysis of anther and ovary size during the floral development of bread wheat. *Journal of Experimental Botany* **66**: 3099–3111.
- Gür A, Demirel U, Özden M, Kahraman A, Çopur O. 2010.** Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* **9**: 1008–1015.
- Habash DZ, Baudo M, Hindle M, et al. 2014.** Systems Responses to Progressive Water Stress in Durum Wheat. *PLOS ONE* **9**: 1–21.
- Hafsi M, Mechmeche W, Bouamama L, Djekoune A, Zaharieva M, Monneveux P. 2008.** Flag Leaf Senescence, as Evaluated by Numerical Image Analysis, and its Relationship with Yield under Drought in Durum Wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* **185**: 275–280.

- Halliwell B. 2006.** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* **141**: 312–322.
- Hameed A, Bibi N, Akhter J, Iqbal N. 2011.** Differential changes in antioxidants, proteases, and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. *Plant physiology and biochemistry* **49**: 178–185.
- Hamid Badawi G, Yamauchi Y, Shimada E, et al. 2004.** Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science* **166**: 919–928.
- Hammad SAR, Ali OAM. 2014.** Physiological and biochemical studies on drought tolerance of wheat plants by application of amino acids and yeast extract. *Annals of Agricultural Sciences* **59**: 133–145.
- Han C, Liu Q, Yang Y. 2009.** Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regulation* **58**: 153–162.
- Harb A, Awad D, Samarah N. 2015.** Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions* **10**: 109–116.
- Hasheminasab H, Assad MT, Aliakbari A, Sakhafi SR. 2012.** Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Journal of Agricultural Science* **4**: 20–30.
- Hassan NM, El-Bastawisy ZM, El-Sayed AK, Ebeed HT, Nemat Alla MM. 2015.** Roles of dehydrin genes in wheat tolerance to drought stress. *Journal of Advanced Research* **6**: 179–188.
- Heath RL, Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**: 189–198.
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH. 2004.** Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *The Plant Cell* **16**: 241–256.
- Hedrick PW. 2001.** Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 629–636.
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F. 2000.** Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell & Environment* **23**: 853–862.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H. 2001.** A large family of class III plant peroxidases. *Plant & Cell Physiology* **42**: 462–468.
- Hiraga S, Yamamoto K, Ito H, et al. 2000.** Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS letters* **471**: 245–250.
- Hoque MA, Banu MNA, Okuma E, et al. 2007.** Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves

salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1457–1468.

Huseynova IM, Aliyeva DR, Aliyev JA. 2014. Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. *Plant physiology and biochemistry*: **81**: 54–60.

Huseynova IM, Aliyeva DR, Mammadov AC, Aliyev JA. 2015. Hydrogen peroxide generation and antioxidant enzyme activities in the leaves and roots of wheat cultivars subjected to long-term soil drought stress. *Photosynthesis Research* **125**: 279–289.

Iqbal S, Bano A. 2009. Water stress induced changes in antioxidant enzymes, membrane stability and seed protein profile of different wheat accessions. *African Journal of Biotechnology* **8**: 6576–6587.

Islam MM, Hoque MA, Okuma E, et al. 2009. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1587–1597.

Ito H, Hiraoka N, Ohbayashi A, Ohashi Y. 1991. Purification and characterization of rice peroxidases. *Agricultural and Biological Chemistry* **55**: 2445–2454.

Iwamoto M, Higo H, Higo K. 2000. Differential diurnal expression of rice catalase genes: the 5'-flanking region of CatA is not sufficient for circadian control. *Plant Science* **151**: 39–46.

Jakob B, Heber U. 1996. Photoproduction and Detoxification of Hydroxyl radicals in Chloroplasts and Leaves and Relation to Photoinactivation of Photosystems I and II. *Plant and Cell Physiology* **37**: 629–635.

Jiang F, Hartung W. 2008. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* **59**: 37–43.

Kabiri R, Nasibi F, Farahbakhsh H. 2014. Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of drought stress in *Nigella sativa* plant under hydroponic culture. *Plant Protection Science* **50**: 43–51.

Kaminaka H, Morita S, Tokumoto M, Yokoyama H, Masumura T, Tanaka K. 1999. Molecular cloning and characterization of a cDNA for an iron-superoxide dismutase in rice (*Oryza sativa* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **63**: 302–308.

Kanematsu S, Asada K. 1990. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant and Cell Physiology* **31**: 99–112.

Karaca M. 2013. Isozymes as biochemical markers in plant genetics. *International Journal of AgriScience* **3**: 851–861.

Kelly FJ, Mudway IS. 2003. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids* **25**: 375–396.

Kesici M, Gulen H, Ergin S, Turhan E, Ipek A, Koksal N. 2013. Heat-stress tolerance of some strawberry (*Fragaria x Ananassa*) sultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **41**: 244–249.

- Keyvan S. 2010.** The effects of drought stress on yield, relative water content, proline, soluble carbohydrates and chlorophyll of bread wheat cultivars. *Journal of Animal and Plant Sciences* **8**: 1051–1060.
- Khalilzadeh R, Sharifi RS, Jalilian J. 2016.** Antioxidant status and physiological responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to cycocel application and bio fertilizers under water limitation condition. *Journal of Plant Interactions* **11**: 130–137.
- Khanna-Chopra R, Selote DS. 2007.** Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than -susceptible wheat cultivar under field conditions. *Environmental and Experimental Botany* **60**: 276–283.
- Khayatnezhad M, Gholamin R, Somarin SJ, Mahmoodabad RZ. 2011.** Scrutiny of hexaploid and tetraploid (*Triticum durum*) wheat's genotypes to some physiological responses in drought stress. *Middle-East Journal of Scientific Research* **7**: 12–16.
- Kim BH, Kim SY, Nam KH. 2012.** Genes encoding plant-specific class III peroxidases are responsible for increased cold tolerance of the brassinosteroid-insensitive 1 mutant. *Molecules and Cells* **34**: 539–548.
- Kim HJ, Kato N, Kim S, Triplett B. 2008.** Cu/Zn superoxide dismutases in developing cotton fibers: evidence for an extracellular form. *Planta* **228**: 281–292.
- Kim Y-H, Lim S, Han S-H, et al. 2007.** Differential expression of 10 sweetpotato peroxidases in response to sulfur dioxide, ozone, and ultraviolet radiation. *Plant physiology and biochemistry* **45**: 908–914.
- Kingston-Smith AH, Harbinson J, Foyer CH. 1999.** Acclimation of photosynthesis, H₂O₂ content and antioxidants in maize (*Zea mays*) grown at sub-optimal temperatures. *Plant, Cell & Environment* **22**: 1071–1083.
- Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL. 1998.** Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. *Plant Physiology* **118**: 637–650.
- Kumar RR, Goswami S, Sharma SK, et al. 2012.** Protection against heat stress in wheat involves change in cell membrane stability, antioxidant enzymes, osmolyte, H₂O₂ and transcript of heat shock protein. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* **4**: 83–91.
- Kumar RR, Sharma SK, Goswami S, et al. 2013.** Characterization of differentially expressed stress-associated proteins in starch granule development under heat stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* **50**: 126–138.
- Kumari M, Taylor GJ, Deyholos MK. 2008.** Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular genetics and genomics* **279**: 339–357.
- Kwak JM, Mori IC, Pei Z-M, et al. 2003.** NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *The EMBO journal* **22**: 2623–2633.
- Laemmli UK. 1970.** Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

- Lagrimini LM, Rothstein S. 1987.** Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **84**: 438–442.
- Larkindale J, Knight MR. 2002.** Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* **128**: 682–695.
- Lascano HR, Melchiorre MN, Luna CM, Trippi VS. 2003.** Effect of photooxidative stress induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress. *Plant Science* **164**: 841–848.
- Lee B-R, Kim K-Y, Jung W-J, Avice J-C, Ourry A, Kim T-H. 2007b.** Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **58**: 1271–1279.
- Lee S-H, Ahsan N, Lee K-W, et al. 2007a.** Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. *Journal of Plant Physiology* **164**: 1626–1638.
- Lepeduš H, Cesar V, Krsnik-Rasol M. 2004.** Guaiacol peroxidases in carrot (*Daucus carota* L.) root. *Food technology and biotechnology* **42**: 33–36.
- Levitt J. 1972.** *Responses of plants to environmental stresses*. New York : Academic Press. p. 698 .
- Levy D, Fogelman E, Itzhak Y, Ma Q, Turner DW, Cowling W. 2006.** Osmotic adjustment in leaves of Brassica oilseeds in response to water deficit. *Canadian Journal of Plant Science* **86**: 389–397.
- Lev-Yadun S, Gopher A, Abbo S. 2000.** Archaeology. The cradle of agriculture. *Science* **288**: 1602–1603.
- Li C-H, Wang T-Z, Li Y, Zheng Y-H, Jiang G-M. 2013.** Flixweed is more competitive than winter wheat under ozone pollution: evidences from membrane lipid peroxidation, antioxidant enzymes and biomass. *PLOS ONE* **8**: 1–8.
- Liang Z, Zhang F, Shao M, Zhang J. 2002.** The relations of stomatal conductance, water consumption, growth rate to leaf water potential during soil drying and rewatering cycle of wheat (*Triticum aestivum*). *Bot. Bull. Acad. Sin.* **43**: 187–192.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR. 1983.** Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* **11**: 591–592.
- Liu C, Liu Y, Guo K, et al. 2011.** Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 174–183.
- Llorente F, López-Cobollo RM, Catalá R, Martínez-Zapater JM, Salinas J. 2002.** A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *The Plant Journal* **32**: 13–24.

- Lovisolò C, Perrone I, Carra A, et al. 2010.** Drought-induced changes in development and function of grapevine (*Vitis* spp.) organs and in their hydraulic and non-hydraulic interactions at the whole-plant level: a physiological and molecular update. *Functional Plant Biology* **37**: 98–116.
- Lugojan C, Ciulca S. 2011.** Evaluation of relative water content in winter wheat. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* **15**: 173–177.
- Luna CM, Pastori GM, Driscoll S, Groten K, Bernard S, Foyer CH. 2005.** Drought controls on H₂O₂ accumulation, catalase (CAT) activity and CAT gene expression in wheat. *Journal of Experimental Botany* **56**: 417–423.
- M'Hamdi M, Bettaieb T, Harbaoui Y, Aziz Mougou A, du Jardin P. 2009.** Insight into the role of catalases in salt stress in potato (*Solanum tuberosum* L.). *BASE* **13**: 373–379.
- Mandal C, Ghosh N, Adak MK, Dey N. 2013.** Interaction of polyamine on oxidative stress induced by exogenously applied hydrogen peroxide in *Salvinia natans* Linn. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **25**: 223–230.
- Marques AT, Santos SP, Rosa MG, et al. 2014.** Expression, purification and crystallization of MnSOD from *Arabidopsis thaliana*. *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications* **70**: 669–672.
- Mascher R, Nagy E, Lippmann B, et al. 2005.** Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultrastructure. *Plant Science* **168**: 691–698.
- Masoumi A, Kafi M, Khazaei Z, Davari K. 2010.** Effect of drought stress on water status, electrolyte leakage and enzymatic antioxidants of kochia (*kochia scoparia*) under saline condition. *Pakistan Journal of Botany* **42**: 3517–3524.
- Masoumi H, Darvish F, Daneshian J, Nourmohammadi G, Habibi D. 2011.** Chemical and biochemical responses of soybean (*Glycine max* L.) cultivars to water deficit stress. *Australian Journal of Crop Science* **5**: 544–553.
- Matsumuraa T, Tabayashib N, Kamagata Y, Souma C, Saruyama H. 2002.** Wheat catalase expressed in transgenic rice plants can improve tolerance against low temperature injury. *Plant Cold Hardiness*: 277–287.
- Mattos LM, Moretti CL. 2015.** Oxidative stress in plants under drought conditions and the role of different enzymes. *Enzyme Engineering* **5**: 1–6.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000.** Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659–668.
- Mazars C, Thuleau P, Lamotte O, Bourque S. 2010.** Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Molecular Plant* **3**: 706–718.
- Meeta J, Mini M, Rekha G. 2013.** Effect of PEG-6000 imposed water deficit on chlorophyll metabolism in maize leaves. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* **9**: 262–271.
- Mehler AH. 1951.** Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **33**: 65–77.

- Melchiorre M, Robert G, Trippi V, Racca R, Lascano HR. 2009.** Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state. *Plant Growth Regulation* **57**: 57–68.
- Melloul M, Iraqi D, Udupa SM, et al. 2014.** Analysis of mRNA levels of ten genes under water stress in *Triticum turgidum* subsp. *durum*. *Journal of Plant Studies* **3**: 65–79.
- Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Van Breusegem F, Noctor G. 2010.** Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany* **61**: 4197–4220.
- Miller A-F. 2012.** Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS letters* **586**: 585–595.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010.** Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* **33**: 453–467.
- Ministère de l'Agriculture et du développement rural. 2016.** <http://www.minagri.dz/>
- Miszalski Z, Ślesak I, Niewiadomska E, Baczek-Kwinta R, Lüttge U, Ratajczak R. 1998.** Subcellular localization and stress responses of superoxide dismutase isoforms from leaves in the C3-CAM intermediate halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant, Cell & Environment* **21**: 169–179.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. 2004.** Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**: 490–498.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**: 405–410.
- Moaveni P. 2011.** Effect of water deficit stress on some physiological traits of wheat (*Triticum aestivum*). **1**: 64–68.
- Mohammadi M, Kav NNV, Deyholos MK. 2008.** Transcript expression profile of water-limited roots of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* 'Opata'). *Genome* **51**: 357–367.
- Møller I. 2001.** Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**: 561–591.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A. 2007.** Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 459–481.
- Monneveux P, Rekika D, Acevedo E, Merah O. 2006.** Effect of drought on leaf gas exchange, carbon isotope discrimination, transpiration efficiency and productivity in field grown durum wheat genotypes. *Plant Science* **170**: 867–872.
- Monneveux P, This D. 1997.** La génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse: espoirs et difficultés. *Science et changements planétaires / Sécheresse* **8**: 29–37.
- Moran JF, James EK, Rubio MC, Sarath G, Klucas RV, Becana M. 2003.** Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from Cowpea root nodules. *Plant Physiology* **133**: 773–782.

- Munné-Bosch S, Jubany-Marí T, Alegre L. 2001.** Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant, Cell & Environment* **24**: 1319–1327.
- Muñoz IG, Moran JF, Becana M, Montoya G. 2005.** The crystal structure of an eukaryotic iron superoxide dismutase suggests intersubunit cooperation during catalysis. *Protein Science* **14**: 387–394.
- Murphy EJ, Metcalfe CL, Nnamchi C, Moody PCE, Raven EL. 2012.** Crystal structure of guaiacol and phenol bound to a heme peroxidase. *The FEBS journal* **279**: 1632–1639.
- Mustafa MG. 1990.** Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biology & Medicine* **9**: 245–265.
- Nabizadeh H, Valizadeh M, Norouzi M, Vajovi MB. 2015.** Effect of different levels of NaCl salinity on antioxidant enzyme's activity in seedling of different wheat cultivars. *Biological Forum – An International Journal* **7**: 180–186.
- Naderi R, Valizadeh M, Toorchi M, Shakiba M. 2014.** Antioxidant enzyme changes in response to osmotic stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Acta Biologica Szegediensis* **58**: 95–101.
- Nagamiya K, Motohashi T, Nakao K, et al. 2007.** Enhancement of salt tolerance in transgenic rice expressing an *Escherichia coli* catalase gene, katE. *Plant Biotechnology Reports* **1**: 49–55.
- Neill S, Desikan R, Hancock J. 2002.** Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 388–395.
- Noctor G, Foyer CH. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 249–279.
- Noctor G, Mhamdi A, Foyer CH. 2014.** The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiology* **164**: 1636–1648.
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH. 2002.** Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? *Annals of Botany* **89**: 841–850.
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Foyer CH. 2000.** Peroxide processing in photosynthesis: antioxidant coupling and redox signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **355**: 1465–1475.
- Nogués S, Baker NR. 2000.** Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants grown under enhanced UV-B radiation. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1309–1317.
- Nouar H, Bouzerzour H, Haddad L, Menad A, Hazmoune T, Zerargui H. 2012.** Genotype x Environment Interaction Assessment in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf) using AMMI and GGE Models. *Advances in Environmental Biology* **6**: 3007–3015.
- Nyachiro JM, Briggs KG, Hoddinott J, Johnson-Flanagan AM. 2001.** Chlorophyll content, chlorophyll fluorescence and water deficit in spring wheat. *Cereal Research Communications* **29**: 135–142.

- Ogawa K, Kanematsu S, Asada K. 1996.** Intra- and Extra-Cellular Localization of “Cytosolic” CuZn-Superoxide Dismutase in Spinach Leaf and Hypocotyl. *Plant and Cell Physiology* **37**: 790–799.
- Ogawa K, Kanematsu S, Takebe K, Asada K. 1995.** Attachment of Cu, Zn SOD to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PS1) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labelling after rapid freezing. *Plant Cell Physiology* **36**: 565–573.
- Okuda T, Matsuda Y, Sugawara M, Sagisaka S. 1992.** Metabolic response to treatment with cold, paraquat, or 3-amino-1,2,4-triazole in leaves of winter wheat. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56**: 1911–1915.
- Okuma E, Murakami Y, Shimoishi Y, Tada M, Murata Y. 2004.** Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition* **50**: 1301–1305.
- Paknejad F, Nasri M, Tohidi Moghadam HR, Zahedi H, Alahmadi MJ. 2007.** Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. *Journal of Biological Sciences* **6**: 841–847.
- Paleg LG, Aspinall D. 1981.** *The Physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press. University of California. p. 492.
- Parent C, Capelli N, Dat J. 2008.** Formes réactives de l’oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *Comptes Rendus Biologies* **331**: 255–261.
- Passardi F, Longet D, Penel C, Dunand C. 2004.** The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* **65**: 1879–1893.
- Pasteur N, Pasteur G, Bonhomme F. 1987.** *Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines*. Tec & Doc, impr. Paris, France. p. 217
- Pastore D, Trono D, Laus MN, Di Fonzo N, Flagella Z. 2007.** Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria. *Journal of Experimental Botany* **58**: 195–210.
- Pearson RG. 1986.** Absolute electronegativity and hardness correlated with molecular orbital theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 8440–8441.
- Pei Z-M, Murata Y, Benning G, et al. 2000.** Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731–734.
- Pérez FJ, Lira W. 2005.** Possible role of catalase in post-dormancy bud break in grapevines. *Journal of Plant Physiology* **162**: 301–308.
- Pérez FJ, Villegas D, Mejia N. 2002.** Ascorbic acid and flavonoid-peroxidase reaction as a detoxifying system of H₂O₂ in grapevine leaves. *Phytochemistry* **60**: 573–580.
- Pérez R, Cuadrado A, Chen IP, Puchta H, Jouve N, De Bustos A. 2011.** The Rad50 genes of diploid and polyploid wheat species. Analysis of homologue and homoeologue expression and interactions with Mre11. *Theor. Appl. Genet* **122**: 251–262.
- Perry JJP, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. 2010.** The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et biophysica acta* **1804**: 245–262.

- Pfaffl MW. 2001.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: 2002–2007.
- Pfannschmidt T. 2003.** Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science* **8**: 33–41.
- Pilon M, Ravet K, Tapken W. 2011.** The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1807**: 989–998.
- Poulik MD. 1957.** Starch Gel Electrophoresis in a Discontinuous System of Buffers. *Nature* **180**: 1477–1479.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. 1994.** Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell* **6**: 65–74.
- Prášil I, Zámečník J. 1998.** The use of a conductivity measurement method for assessing freezing injury: I. Influence of leakage time, segment number, size and shape in a sample on evaluation of the degree of injury. *Environmental and Experimental Botany* **40**: 1–10.
- Reddy AR, Chaitanya KV, Vivekanandan M. 2004.** Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* **161**: 1189–1202.
- Redinbaugh MG, Sabre M, Scandalios JG. 1990.** The distribution of catalase activity, isozyme protein, and transcript in the tissues of the developing maize seedling. *Plant Physiology* **92**: 375–380.
- Regelsberger G, Jakopitsch C, Plasser L, et al. 2002.** Occurrence and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 479–490.
- Rejeb KB, Abdelly C, Savouré A. 2012.** La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biologie Aujourd'hui* **206**: 291–299.
- Rhoads DM, Umbach AL, Subbaiah CC, Siedow JN. 2006.** Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiology* **141**: 357–366.
- Riaz S, Aftab B, Sarwar MB, et al. 2016.** Adaptations of plant responses in *Agave sisalana* under drought stress conditions. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences* **9**: 114–123.
- Ribaut J-M, Pilet P-E. 1991.** Effects of water stress on growth, osmotic potential and abscisic acid content of maize roots. *Physiologia Plantarum* **81**: 156–162.
- Ristic Z, Bukovnik U, Prasad PVV. 2007.** Correlation between heat stability of thylakoid membranes and loss of chlorophyll in winter wheat under heat stress. *Crop Science* **47**: 2067–2073.
- Rodriguez M, Canales E, Borrás-Hidalgo O. 2005.** Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotecnologia Aplicada* **22**: 1–10.
- Romo S, Labrador E, Dopico B. 2001.** Water stress-regulated gene expression in *Cicer arietinum* seedlings and plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **39**: 1017–1026.

- Roupakias DG, McMillin DE, Scandalios JG. 1980.** Chromosomal location of the catalase structural genes in *Zea mays* using B-A translocations. *Theoretical and Applied Genetics* **58**: 211–218.
- Rubio MC, Becana M, Sato S, James EK, Tabata S, Spaink HP. 2007.** Characterization of genomic clones and expression analysis of the three types of superoxide dismutases during nodule development in *Lotus japonicus*. *Molecular plant-microbe interactions* **20**: 262–275.
- Saglam A, Kadioglu A, Demiralay M, Terzi R. 2014.** Leaf rolling reduces photosynthetic loss in maize under severe drought. *Acta Botanica Croatica* **73**: 315–332.
- Saglam A, Saruhan N, Terzi R, Kadioglu A. 2011.** The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**: 60–68.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC. 2002.** Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* **163**: 1037–1046.
- Sairam RK, Srivastava GC. 2000.** Induction of oxidative stress and antioxidant activity by hydrogen peroxide treatment in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biologia Plantarum* **43**: 381–386.
- Sairam RK, Srivastava GC. 2001.** Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): variations in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science* **186**: 63–70.
- Sakthivelu G, Akitha Devi MK, Giridhar P, Rajasekaran T. 2008.** Drought-induced alterations in growth, osmotic potential and in vitro regeneration of soybean cultivars. *General and Applied Plant Physiology* **34**: 103–112.
- Salekjalali M, Haddad R, Jafari B. 2012.** Effects of soil water shortages on the activity of antioxidant enzymes and the contents of chlorophylls and proteins in barley. *Am Eurasian J Agric Environ Sci* **12**: 57–63.
- Salguero J, Böttger M. 1995.** Secreted catalase activity from roots of developing maize (*Zea mays* L.) seedlings. *Protoplasma* **184**: 72–78.
- Samarah HN. 2005.** Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development* **25**: 145–149.
- Samuel MA, Miles GP, Ellis BE. 2000.** Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* **22**: 367–376.
- Sanders D, Pelloux J, Brownlee C, Harper JF. 2002.** Calcium at the Crossroads of Signaling. *The Plant Cell* **14**: 401–417.
- Sassi K, Abid G, Jemni L, Dridi-Al Mohandes B, Boubaker M. 2012.** Étude comparative de six variétés de blé dur (*Triticum durum*. Desf.) vis-à-vis du stress hydrique. *Journal of Animal & Plant Sciences* **15**: 2157–2170.
- Savicka M, Škute N. 2010.** Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Ekologija* **56**: 26–33.

- Scandalios JG, Tong W-F, Roupakias DG. 1980.** Cat3, a third gene locus coding for a tissue-specific catalase in maize: Genetics, intracellular location, and some biochemical properties. *Molecular and General Genetics* **179**: 33–41.
- Scandalios JG. 1993.** Oxygen Stress and Superoxide Dismutases. *Plant Physiology* **101**: 7–12.
- Scandalios JG. 1997.** Molecular genetics of superoxide dismutase in plants In: Scandalios, J.G, (Ed). *Oxidative Stress and Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 527–568.
- Scebba F, Sebastiani L, Vitagliano C. 1998.** Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum* **104**: 747–752.
- Schwanz P, Polle A. 2001.** Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pendunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany* **52**: 133–143.
- Sečenji M, Lendvai Á, Miskolczi P, et al. 2010.** Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. *Plant Biol* **12**: 871–882.
- Sembdner G, Gross D, Liebisch H-W, Schneider G. 1980.** Biosynthesis and Metabolism of Plant Hormones In: MacMillan, J, (ed). *Encyclopedia of Plant Physiology. Hormonal Regulation of Development I*. Springer, Berlin, Heidelberg, 281–444.
- Sen A, Alikamanoglu S. 2014.** Characterization of drought-tolerant sugar beet mutants induced with gamma radiation using biochemical analysis and isozyme variations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **94**: 367–372.
- Severino FE, Brandalise M, Costa CS, et al. 2012.** CaPrx, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection. *Plant Science* **191–192**: 35–42.
- Sgherri CLM, Pinzino C, Navari-Izzo F. 1993.** Chemical changes and O₂^{•-} production in thylakoid membranes under water stress. *Physiologia Plantarum* **87**: 211–216.
- Shahenshah, Isoda A. 2010.** Effects of water stress on leaf temperature and chlorophyll fluorescence parameters in cotton and peanut. *Plant Production Science* **13**: 269–278.
- Shao H-B, Chu L-Y, Wu G, Zhang J-H, Lu Z-H, Hu Y-C. 2007a.** Changes of some antioxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at tillering stage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **54**: 143–149.
- Shao L, Shu Z, Sun S-L, Peng C-L, Wang X-J, Lin Z-F. 2007b.** Antioxidation of anthocyanins in photosynthesis under high temperature stress. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 1341–1351.
- Sharma AD, Rakhra G, Kaur S, Kaur H. 2013.** Expression of boiling-stable peroxidase (PRX) isoenzymes under combined effect of drought and heat in different tissues of *Triticum aestivum*. *International Journal of Agricultural Technology* **9**: 901–913.
- Sharma P, Dubey RS. 2005.** Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **46**: 209–221.

- Sharma P, Jha A, Shanker Dubey R, Pessarakli M. 2012.** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* **2012**: 1–26.
- Sheptovitsky YG, Brudvig GW. 1996.** Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry* **35**: 16255–16263.
- Shewry PR. 2009.** Wheat. *Journal of Experimental Botany* **60**: 1537–1553.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M. 2003.** Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 410–417.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 1997.** Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* **115**: 327–334.
- Shiriga K, Sharma R, Kumar K, Kumar Yadav S, Hossain F, Thirunavukkarasu N. 2014.** Expression pattern of superoxide dismutase under drought stress in maize. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology* **3**: 11333–11337.
- Shivakumar PD, Geetha HM, Shetty HS. 2003.** Peroxidase activity and isozyme analysis of pearl millet seedlings and their implications in downy mildew disease resistance. *Plant Science* **164**: 85–93.
- Shugaev AG, Lashtabega DA, Shugaeva NA, Vyskrebentseva EI. 2011.** Activities of antioxidant enzymes in mitochondria of growing and dormant sugar beet roots. *Russian Journal of Plant Physiology* **58**: 387–393.
- Siddique M, Hamid A, Sirajul Islam M. 2000.** Drought stress effects on water relation of wheat. *Botanical Bulletin- Academia Sinica Taipei* **41**: 35–39.
- Sikuku P, Onyango J, Netondo G. 2012.** Physiological and biochemical responses of five nerica rice varieties (*Oryza sativa* L.) to water deficit at vegetative and reproductive stage. *Agric. Biol. J. N. Am* **3**: 93–104.
- Silaghi-Dumitrescu R. 2010.** Assays for peroxidase activity: The HRP case. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chimia* **55**: 207–222.
- Silva M de A, Jifon JL, Silva JAG da, Sharma V. 2007.** Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**: 193–201.
- Simova-Stoilova L, Vassileva V, Petrova T, Tsenov N, Demirevska K, Feller U. 2006.** Proteolytic activity in wheat leaves during drought stress and recovery. *Gen Appl Plant Physiol*: 91–100.
- Singh A, Mantri S, Sharma M, Chaudhury A, Tuli R, Roy J. 2014.** Genome-wide transcriptome study in wheat identified candidate genes related to processing quality, majority of them showing interaction (quality x development) and having temporal and spatial distributions. *BMC genomics* **15**: 1–19.
- Singh HP, Batish DR, Kaur G, Arora K, Kohli RK. 2008.** Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany* **63**: 158–167.

- Slama A, Salem MB, Naceur MB, Zid E. 2005.** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Science et changements planétaires / Sécheresse* **16**: 225–229.
- Slama A. 2002.** Étude comparative de la contribution des différentes parties du plant du blé dur dans la contribution du rendement en grains en irrigué et en conditions de déficit hydrique. Thèse de doctorat en biologie. Faculté des sciences de Tunis.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989.** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* **28**: 1057–1060.
- Smirnoff N. 1993.** The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* **125**: 27–58.
- Sofa A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A. 2015.** Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 13561–13578.
- Soltis PS, Soltis DE. 1991.** Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from Saxifragaceae and Polystichum (Dryopteridaceae). *Aliso* **13**: 215–223.
- Soltner D. 1998.** *Les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairies.* 19ème éd. Editions sciences et techniques agricoles. Sainte Gemmes sur Loire. p. 464.
- Sooch BS, Kauldhar BS, Puri M. 2014.** Recent insights into microbial catalases: isolation, production and purification. *Biotechnology Advances* **32**: 1429–1447.
- Srivalli B, Sharma G, Khanna-Chopra R. 2003.** Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum* **119**: 503–512.
- Stadtman ER. 1990.** Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* **9**: 315–325.
- Stallings WC, Pattridge KA, Strong RK, Ludwig ML. 1984.** Manganese and iron superoxide dismutases are structural homologs. *The Journal of Biological Chemistry* **259**: 10695–10699.
- Stevanović B, Šinzčar J, Glišić O. 1997.** Electrolyte leakage differences between poikilohydrous and homoiohydrous species of Gesneriaceae. *Biologia Plantarum* **40**: 299–303.
- Šukalović VH-T, Vuletić M. 2003.** The characterization of peroxidases in mitochondria of maize roots. *Plant Science* **164**: 999–1007.
- Sulmon C, Gouesbet G, Amrani AE, Couée I. 2006.** Sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in Arabidopsis seedlings involves activation of oxidative and xenobiotic stress responses. *Plant Cell Reports* **25**: 489–498.
- Sultan M a. RF, Hui L, Yang LJ, Xian ZH. 2012.** Assessment of drought tolerance of some *Triticum* L. species through physiological indices. *Czech J. Genet. Plant Breed* **48**: 178–184
- Takabe K, Takeuchi M, Sato T, Ito M, Fujita M. 2001.** Immunocytochemical Localization of Enzymes Involved in Lignification of the Cell Wall. *Journal of Plant Research* **114**: 509–515.

- Takahashi MA, Asada K. 1983.** Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **226**: 558–566.
- Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G. 2009.** Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany* **65**: 270–281.
- Tartoura K a. H. 2010.** Alleviation of oxidative-stress induced by drought through application of compost in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* **9**: 208–216.
- Tenea GN, Peres Bota A, Cordeiro Raposo F, Maquet A. 2011.** Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming conditions. *BMC Research Notes* **4**: 1–12.
- Tognolli M, Penel C, Greppin H, Simon P. 2002.** Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **288**: 129–138.
- Trinh CH, Hunter T, Stewart EE, Phillips SEV, Hunter GJ. 2008.** Purification, crystallization and X-ray structures of the two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**: 1110–1114.
- Tripathy BC, Oelmüller R. 2012.** Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior* **7**: 1621–1633.
- Turrens JF. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* **552**: 335–344.
- Vacca RA, de Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L. 2004.** Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology* **134**: 1100–1112.
- Valizadeh M, Mohayeji M, Yasinzadeh N, Nasrullazadeh S, Moghadam M. 2011.** Genetic diversity of synthetic alfalfa generations and cultivars using tetrasomic inherited allozyme markers. *Journal of Agricultural Science and Technology* **13**: 425–430.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. 2002.** Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**: 532–538.
- Veitch NC. 2004.** Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**: 249–259.
- Velikova V, Yordanov I, Edreva A. 2000.** Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* **151**: 59–66.
- Verslues PE, Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Zhu J, Zhu J-K. 2006.** Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *The Plant Journal* **45**: 523–539.
- Verslues PE, Bray EA. 2006.** Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *Journal of Experimental Botany* **57**: 201–212.

- Verslues PE, Zhu J-K. 2005.** Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochemical Society Transactions* **33**: 375–379.
- Vicente R, Pérez P, Martínez-Carrasco R, Usadel B, Kostadinova S, Morcuende R. 2015.** Quantitative RT-PCR Platform to Measure Transcript Levels of C and N Metabolism-Related Genes in Durum Wheat: Transcript Profiles in Elevated [CO₂] and High Temperature at Different Levels of N Supply. *Plant & Cell Physiology* **56**: 1556–1573.
- Vinya R, Malhi Y, Fisher JB, Brown N, Brodribb TJ, Aragao LE. 2013.** Xylem cavitation vulnerability influences tree species' habitat preferences in miombo woodlands. *Oecologia* **173**: 711–720.
- Volkov RA, Panchuk II, Mullineaux PM, Schöffl F. 2006.** Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology* **61**: 733–746.
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F. 2002.** Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1227–1236.
- Wang S-G, Li Z-Q, Jia S-S, et al. 2013.** Relationships of wheat leaf stomatal traits with wheat yield and drought-resistance. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **24**: 1609–1614.
- Wang W, Vinocur B, Altman A. 2003.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1–14.
- Wang Y, Ying Y, Chen J, Wang X. 2004.** Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. *Plant Science* **167**: 671–677.
- Wang Z, Rhee DB, Lu J, et al. 2010.** Characterization of oxidative guanine damage and repair in mammalian telomeres. *PLoS genetics* **6**: 1–13.
- Wei J, Li C, Li Y, Jiang G, Cheng G, Zheng Y. 2013.** Effects of external potassium (k) supply on drought tolerances of two contrasting winter wheat cultivars. *PloS One* **8**: 1–11.
- Welinder KG. 1992.** Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 388–393.
- Wendel JF, Weeden NF. 1989.** Visualization and Interpretation of Plant Isozymes In: Soltis DE, Soltis PS, Dudley TR, (eds). *Isozymes in Plant Biology*. Springer Netherlands, 5–45.
- Weng M, Gui L, Liu F, Zhang M, Shan L, Deng X. 2015.** Effects of drought stress on antioxidant enzymes in seedlings of different wheat genotypes. *Pakistan Journal of Botany* **47**: 49–56.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, et al. 1997.** Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. *The EMBO Journal* **16**: 4806–4816.
- Willekens H, Inzé D, Montagu MV, Camp W van. 1995.** Catalases in plants. *Molecular Breeding* **1**: 207–228.
- Wingler A, Lea PJ, Quick WP, Leegood RC. 2000.** Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**: 1517–1529.
- Woodbury W, Spencer AK, Stahmann MA. 1971.** An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* **44**: 301–305.

- Wu G, Wilen RW, Robertson AJ, Gusta LV. 1999.** Isolation, chromosomal localization, and differential expression of mitochondrial manganese superoxide dismutase and chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase genes in wheat. *Plant Physiology* **120**: 513–520.
- Xiao X, Xu X, Yang F. 2008.** Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cathayana* populations. *silva fennica* **42**: 705–719.
- Xu Z, Zhou G. 2008.** Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3317–3325.
- Yan L, Shi Y. 2013.** Effect of drought stress on growth and development in winter wheat with aquasorb-fertilizer. *J Food Sci Technol* **5**: 1502–1504.
- Yeh DM, Lin HF. 2003.** Thermostability of cell membranes as a measure of heat tolerance and relationship to flowering delay in chrysanthemum. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **128**: 656–660.
- Ykhlef N, Djekoun A. 2000.** Adaptation photosynthétique et résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum turgidum* L. var. *durum*): Analyse de la variabilité génotypique. In : Royo C, Nachit M, Di Fonzo N, Araus JL, (eds). *Durum wheat improvement in the Mediterranean region : New challenges*. Zaragoza : CIHEAM. p. 327–330 (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n . 40).
- Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A, Shinmyo A. 2003.** Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**: 665–670.
- Yoshiyama KO, Sakaguchi K, Kimura S. 2013.** DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals. *Biology* **2**: 1338–1356.
- Yu J, Hu S, Wang J, et al. 2002.** A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**: 79–92.
- Zala HN, Bosamia TC, Kulkarni KS, Shukla YM. 2014.** Physiological and biochemical characterization for drought stress at seedling stage in wheat genotypes. *International Journal of Bio-resource and Stress Management* **5**: 386–394.
- Zeeshan HMA, Lee GH, Kim H-R, Chae H-J. 2016.** Endoplasmic reticulum stress and associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 1–20
- Zhang H, Guo C, Li C, Xiao K. 2008.** Cloning, characterization and expression analysis of two superoxide dismutase (SOD) genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers of Agriculture in China* **2**: 141–149.
- Zhang J, Kirkham MB. 1994.** Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant and Cell Physiology* **35**: 785–791.
- Zhang J, Kirkham MB. 1996.** Antioxidant responses to drought in sunflower and sorghum seedlings. *The New Phytologist* **132**: 361–373.
- Zhang J, Nguyen HT, Blum A. 1999.** Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of Experimental Botany* **50**: 291–302.
- Zhang L, Chen J, Zhang H, Ren Z, Luo P. 2013.** Effects of paraquat-induced oxidative stress on antioxidants and chlorophyll fluorescence in stay-green wheat (*Triticum aestivum* L.) flag leaves. *Bangladesh Journal of Botany* **42**: 239–245.

Zhang Y, Zhu H, Zhang Q, et al. 2009. Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**: 2357–2377.

Zhao F, Zhang H. 2006. Salt and paraquat stress tolerance results from co-expression of the *Suaeda salsa* glutathione S-transferase and catalase in transgenic rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **86**: 349–358.

Zheng X, van Huystee RB. 1992. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. *Plant Science* **81**: 47–56.

Zimmermann P, Heinlein C, Orendi G, Zentgraf U. 2006. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant, Cell & Environment* **29**: 1049–1060.

Živčák M, Brestic M, Olsovska K, Slamka P. 2008. Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant, Soil and Environment* **54**: 133–139.

Zlatev ZS, Lidon FC, Ramalho JC, Yordanov IT. 2006. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biologia Plantarum* **50**: 389–394.

Annexes

Annexe 1

Protocole d'extraction des ARN totaux utilisant le kit NucleoSpin®RNA

<p>1. Broyer le tissu végétal dans de l'azote liquide</p>	 <p>30 mg</p>
<p>2. Ajouter une solution de lyse (tampon dénaturant : RA1, utilisé à raison de 350µl par 30 mg d'échantillon) additionné de 3,5µl β-Mercaptoethanol. Mélanger le tout au vortex.</p>	 <p>350 µL RA1 3.5 µL β-mercaptoethanol Mix</p>
<p>3. Placer la première colonne dans un tube (2 ml) puis déposer le mélange et centrifuger pendant 1 minute à 11,000 x g.</p>	  <p>11,000 x g, 1 min</p>
<p>4. jeter la colonne, puis ajouter 350 µl d'éthanol (70 %) à l'éluât et homogénéiser l'ensemble par pipetages successifs (5 fois)</p>	 <p>350 µL 70 % ethanol Mix</p>
<p>5. Placer une deuxième colonne dans un tube collecteur puis déposer la suspension. Centrifuger 30 s à 11,000 x g. Placer la colonne dans un nouveau tube (2 ml)</p>	  <p>Load sample 11,000 x g, 30 s</p>
<p>6. Ajouter 350 µl de tampon MDB (membrane Desalting Buffer) puis centrifuger à 11,000 x g pendant 1 min.</p>	  <p>350 µL MDB 11,000 x g, 1 min</p>
<p>7. Préparer un mélange réactionnel de DNase dans un tube stérile (1,5ml) en ajoutant 10 µl de rDNase à 90 µl de tampon pour DNase, puis mélanger en tapotant le tube. Appliquer 95 µl du mélange de DNase sur le centre de la membrane de la colonne. Incuber 15 min à température ambiante.</p>	 <p>95 µL DNase reaction mixture RT, 15 min</p>

<p>8. Laver la colonne en ajoutant 200 μl de tampon RAW2 à puis centrifuger à 11,000 x g pendant 30 s. Placer la colonne dans un nouveau tube (2 ml).</p> <p>2^{ème} lavage : ajouter 600 μl de tampon RA3 à la colonne, puis centrifuger à 11,000 x g pendant 30 s. placer la colonne dans un nouveau tube</p> <p>3^{ème} lavage : ajouter 250 μl de tampon RA3 à la colonne. Centrifuger à 11,000 x g pendant 2 min pour faire sécher la membrane. Placer la colonne dans un nouveau tube (1,5 ml)</p>	 <table border="0"> <tr> <td>1st wash</td> <td>200 μL RAW2</td> </tr> <tr> <td>2nd wash</td> <td>600 μL RA3</td> </tr> <tr> <td>3rd wash</td> <td>250 μL RA3</td> </tr> </table> <table border="0"> <tr> <td>1st and 2nd</td> <td></td> <td>11,000 x g, 30 s</td> </tr> <tr> <td>3rd</td> <td></td> <td>11,000 x g, 2 min</td> </tr> </table>	1 st wash	200 μL RAW2	2 nd wash	600 μL RA3	3 rd wash	250 μL RA3	1 st and 2 nd		11,000 x g, 30 s	3 rd		11,000 x g, 2 min
1 st wash	200 μL RAW2												
2 nd wash	600 μL RA3												
3 rd wash	250 μL RA3												
1 st and 2 nd		11,000 x g, 30 s											
3 rd		11,000 x g, 2 min											
<p>9. Eluer l'ARN dans 40 μl de RNase-free H₂O puis centrifuger à 11,000 x g pendant 1 min</p>	  <table border="0"> <tr> <td>60 μL RNase-free H₂O</td> </tr> <tr> <td>11,000 x g, 1 min</td> </tr> </table>	60 μL RNase-free H ₂ O	11,000 x g, 1 min										
60 μL RNase-free H ₂ O													
11,000 x g, 1 min													

Annexe 2

Résultats du dosage des ARN totaux au Nanodrop

1) Plantes témoins

Échantillon	[ARN] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	A260/A280	A260/A230
DKt1	2,16	2,24	2,31
DKt2	7,03	2,17	2,11
DKt3	8,83	2,24	2,31
B17t1	2,13	2,12	2,20
B17t2	2,14	2,11	2,12
B17t3	3,30	2,20	2,17
OZt1	1,49	2,08	1,50
OZt2	1,20	2,13	1,45
OZt3	1,06	2,13	2,10
Belt1	4,45	2,08	2,20
Belt2	3,63	2,20	2,28
Belt3	3,31	2,05	1,64
Colt1	4,33	2,15	2,27
Colt2	6,83	2,15	2,09
Colt3	4,31	2,13	2,20
Wt1	3,51	2,10	2,12
Wt2	6,02	2,25	2,29
Wt3	2,15	2,14	2,21
Bent1	3,10	2,20	2,26
Bent2	2,56	2,23	2,24
Bent3	5,87	2,20	2,19
Agt1	2,79	2,22	2,31
Agt2	4,05	2,13	2,20
Agt3	4,46	2,13	2,18
Vitt1	3,63	2,19	2,08
Vitt2	7,93	2,25	2,28
Vitt3	2,45	2,18	1,69
Bout1	2,59	2,10	2,16
Bout2	7,80	2,20	2,24
Bout3	5,30	2,25	2,28

2) Plantes stressées

Échantillon	[ARN] (µg/µl)	A260/A280	A260/A230
DKs1	2,56	2,13	2,03
DKs2	1,80	2,09	2,14
DKs3	3,27	2,21	2,20
B17s1	1,99	2,07	1,97
B17s2	2,03	2,09	2,14
B17s3	1,99	2,23	2,30
OZs1	2,33	2,06	2,21
OZs2	2,07	2,22	2,17
OZs3	6,13	2,14	2,14
Bels1	2,21	2,16	2,17
Bels2	2,03	2,13	2,03
Bels3	2,59	2,24	2,24
Cols1	3,17	2,15	2,19
Cols2	4,69	2,15	2,28
Cols3	2,40	2,15	1,82
Ws1	5,27	2,23	2,28
Ws2	4,15	2,13	2,20
Ws3	3,70	2,19	2,26
Bens1	3,28	2,20	2,27
Bens2	6,51	2,23	2,26
Bens3	5,61	2,21	2,22
Ags1	4,40	2,15	2,21
Ags2	6,31	2,25	2,31
Ags3	7,96	2,24	2,28
Vits1	2,48	2,10	2,15
Vits2	6,62	2,23	2,26
Vits3	3,68	2,15	2,30
Bous1	4,14	2,17	2,29
Bous2	4,51	2,18	2,25
Bous3	3,07	2,15	2,14

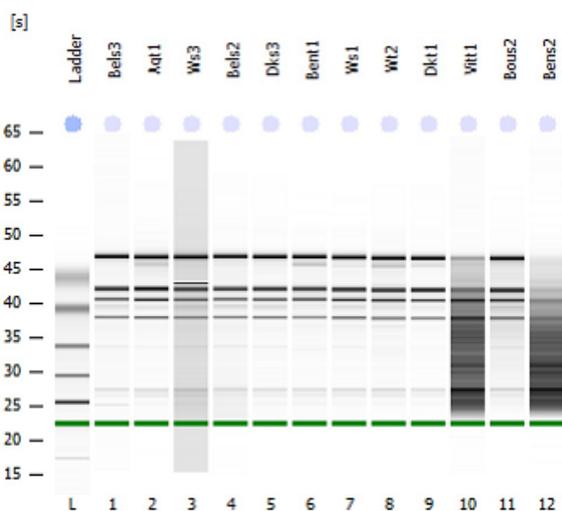
Annexe 3

Résultats du dosage des ARN totaux par Agilent 2100 Bioanalyzer

Assay Class: Plant RNA Nano
 Data Path: C:\... 03122015_Plant RNA Nano_DE13805774_2015-12-03_10-46-25.xad

Created: 12/3/2015 10:46:24 AM
 Modified: 12/3/2015 11:10:12 AM

Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: DE13805774 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13805774 Type: G2939A

Assay Information:

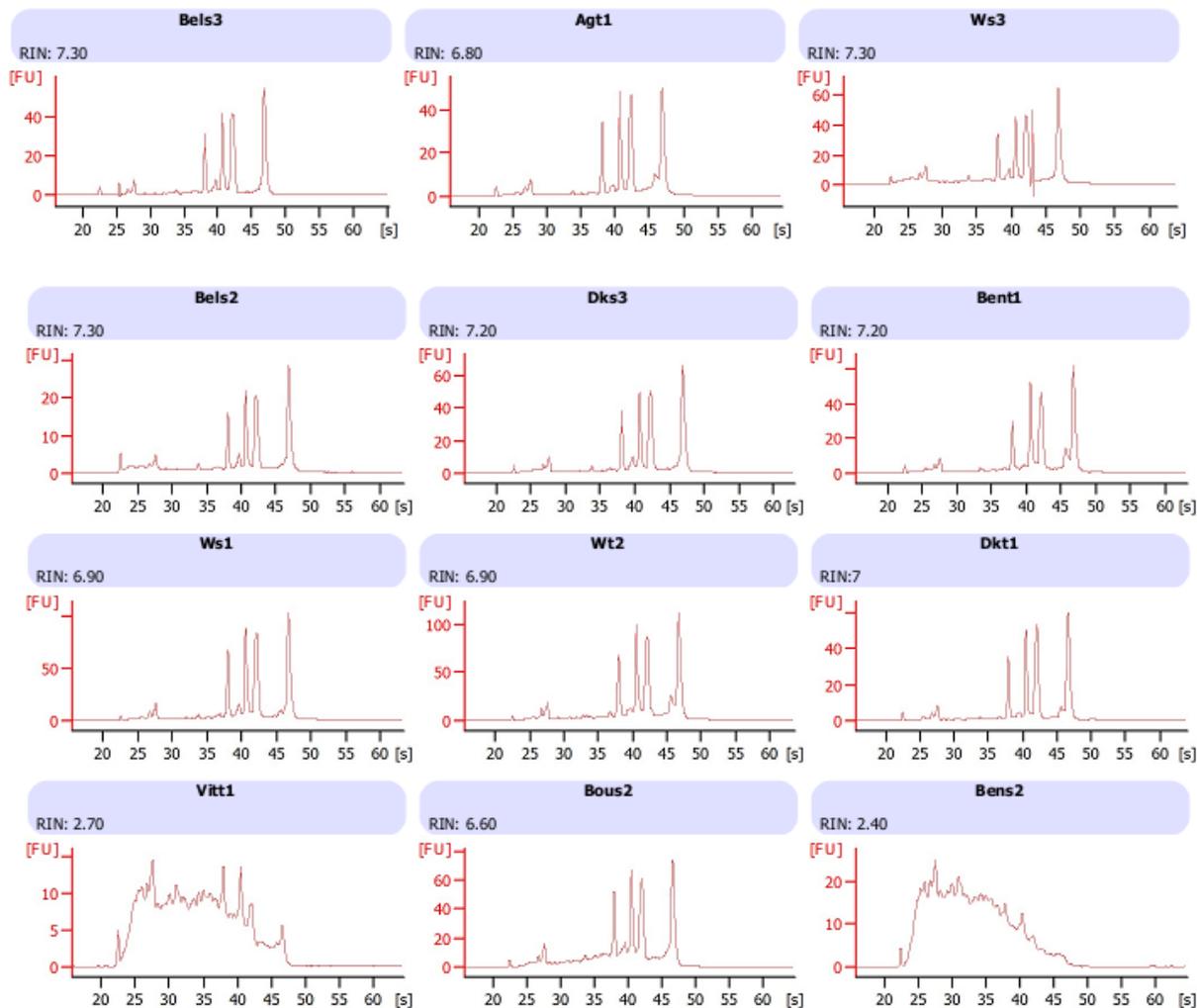
Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Plant RNA Nano.xsy

Assay Class: Plant RNA Nano
 Version: 1.3
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Plant)

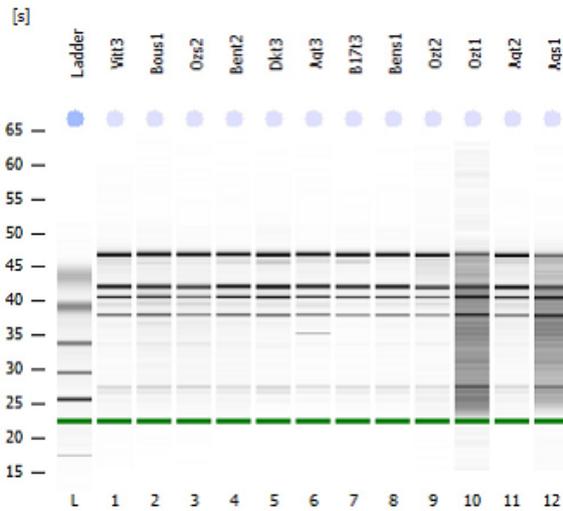
© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

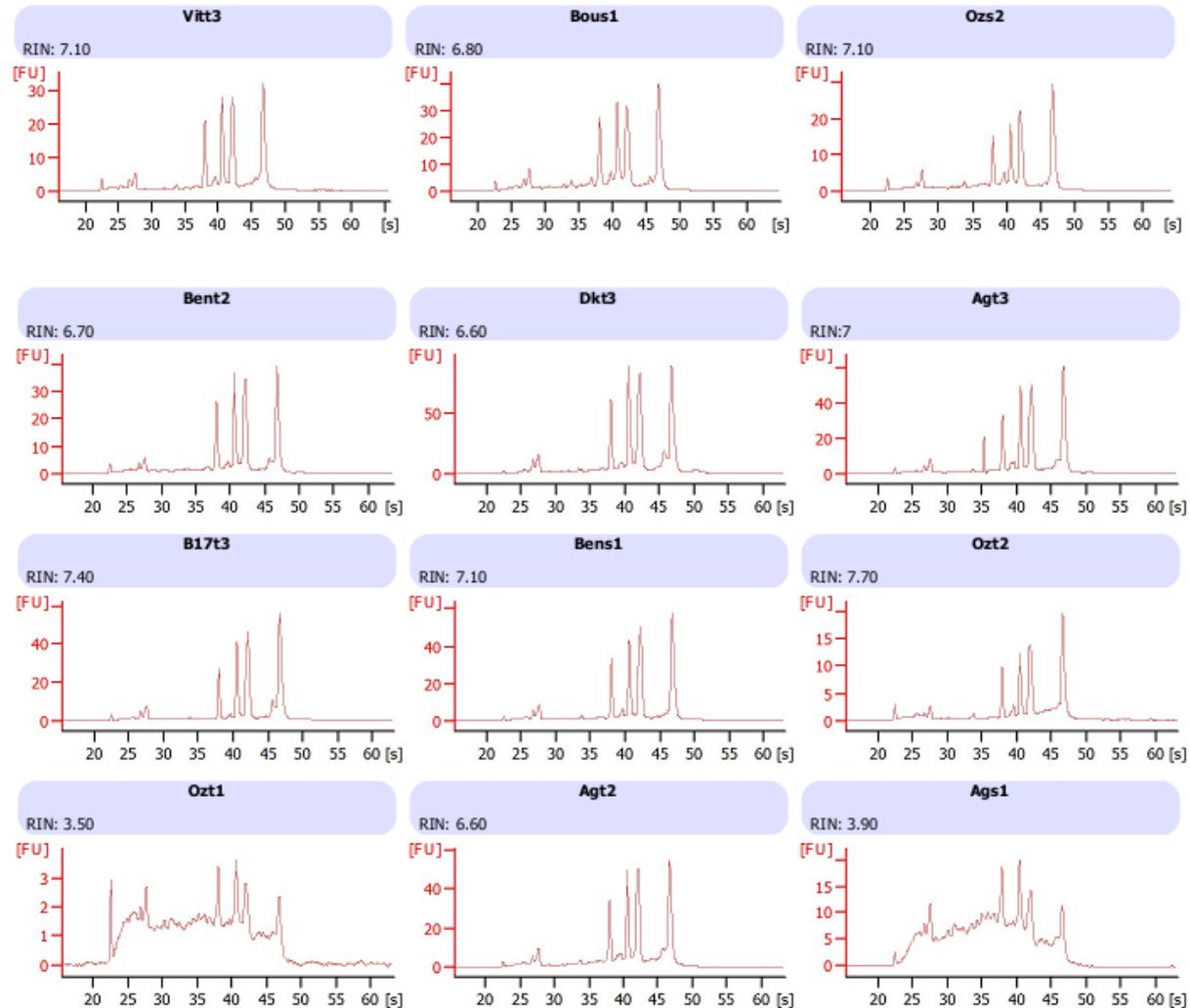
Instrument Name: DE13805774 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13805774 Type: G2939A

Assay Information:

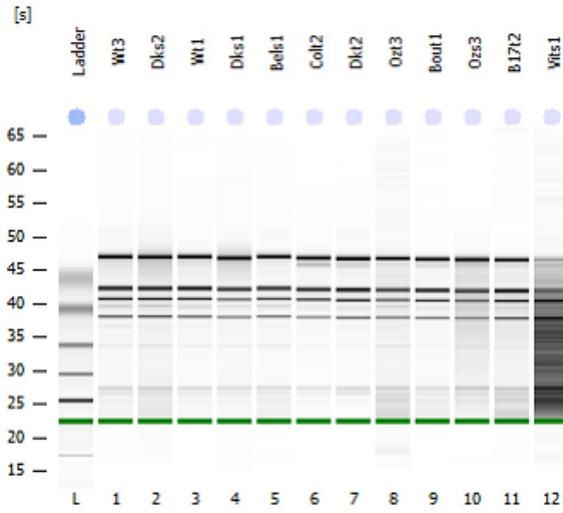
Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Plant RNA Nano.xsy
 Assay Class: Plant RNA Nano
 Version: 1.3
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Plant)
 © Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: DE13805774 Firmware: C.01.069
Serial#: DE13805774 Type: G2939A

Assay Information:

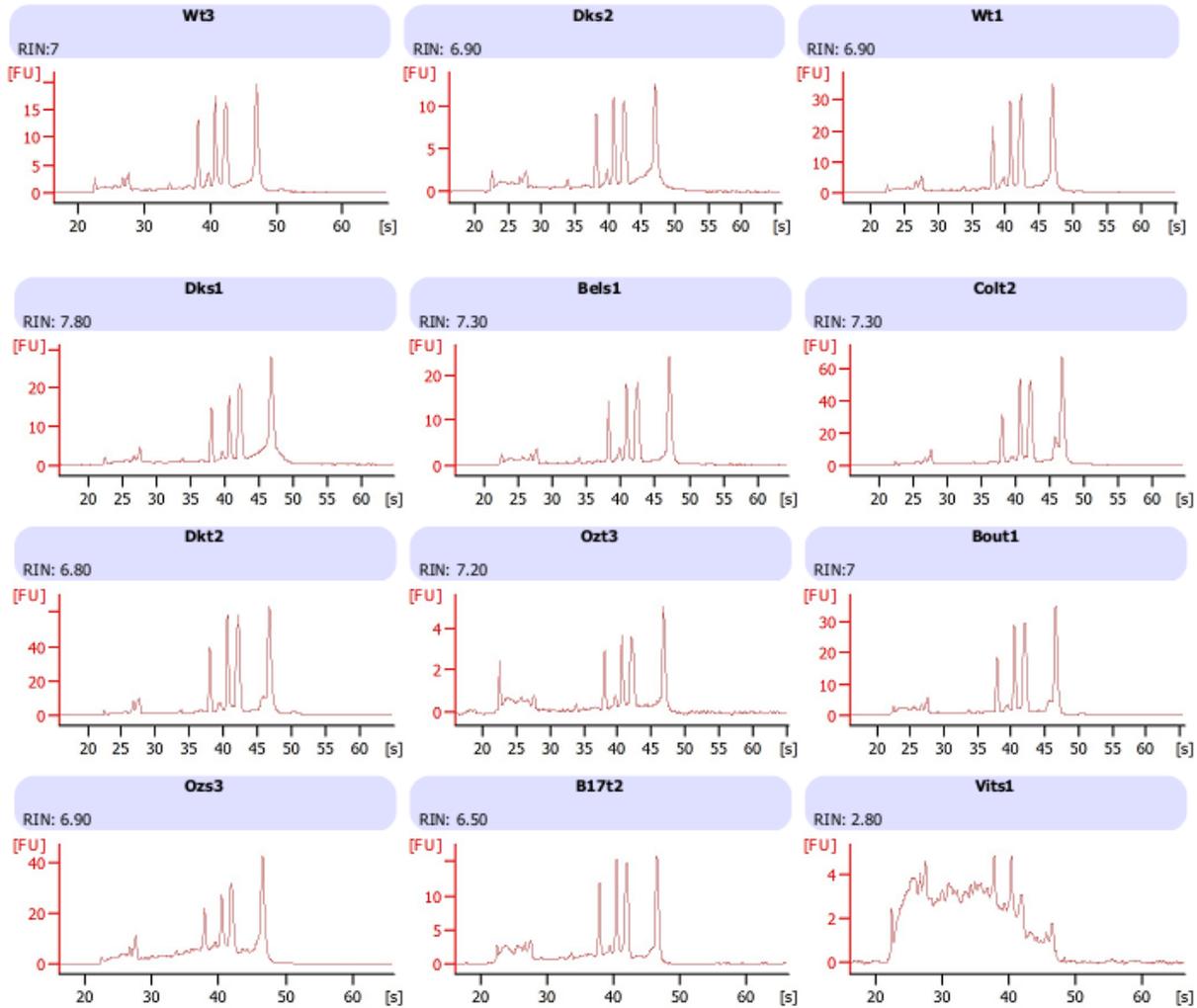
Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Plant RNA Nano.xsy

Assay Class: Plant RNA Nano
Version: 1.3
Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Plant)

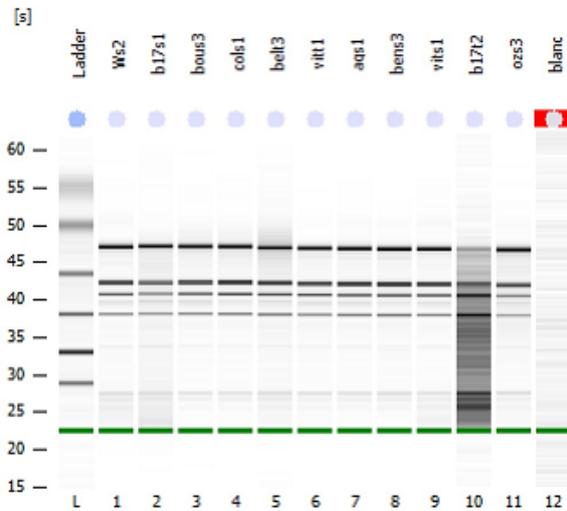
© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
Reagent Kit Lot #:
Chip Comments:



Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: DE13805774 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13805774 Type: G2939A

Assay Information:

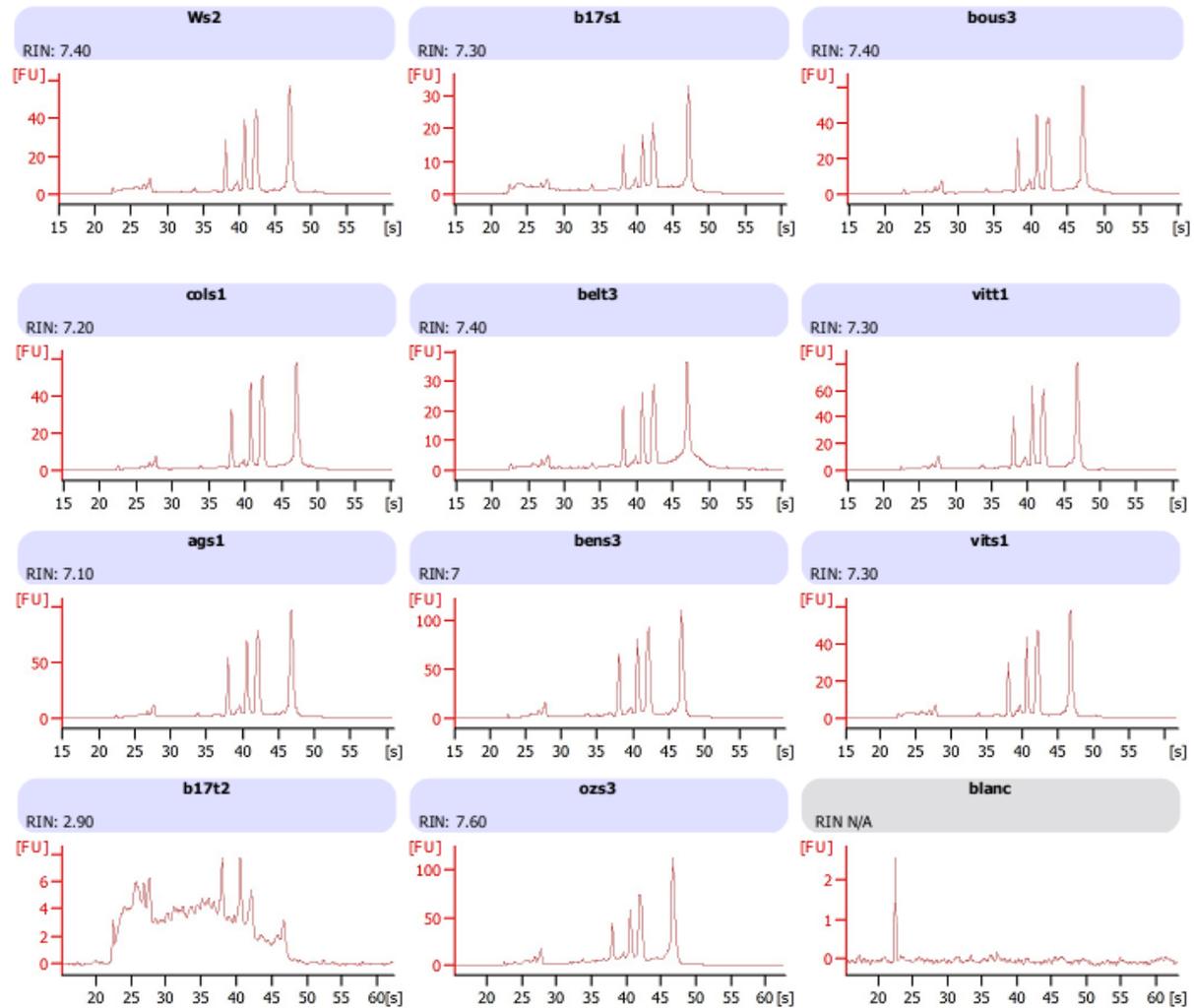
Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Plant RNA Nano.xsy

Assay Class: Plant RNA Nano
 Version: 1.3
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Plant)

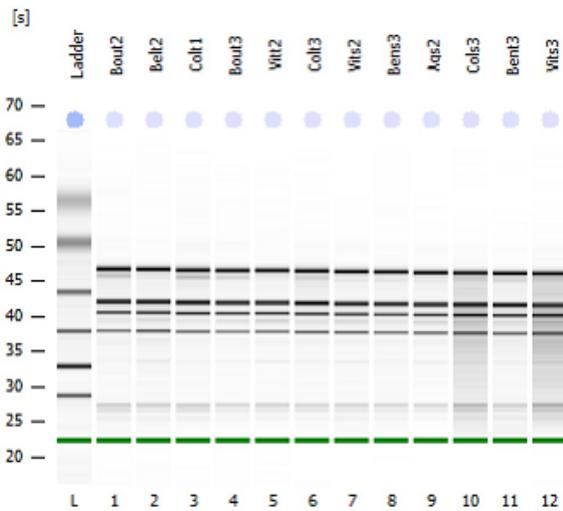
© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



Electrophoresis File Run Summary



Instrument Information:

Instrument Name: DE13805774 Firmware: C.01.069
 Serial#: DE13805774 Type: G2939A

Assay Information:

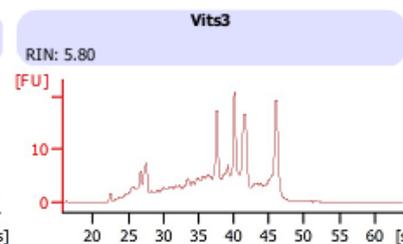
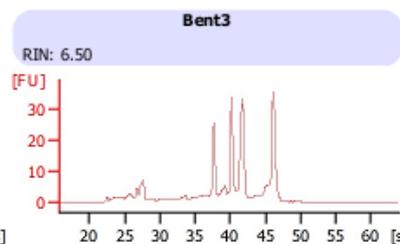
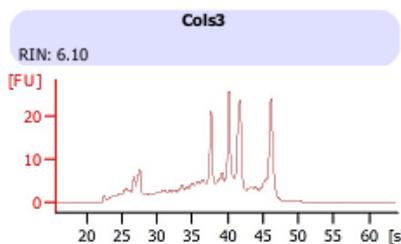
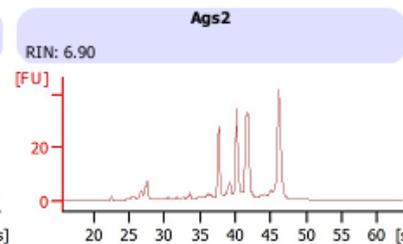
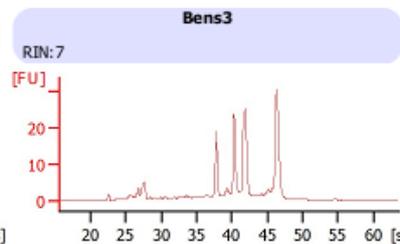
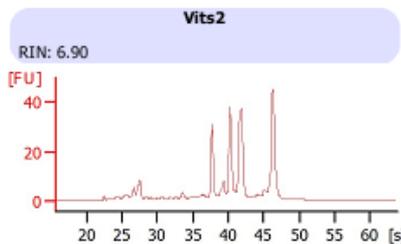
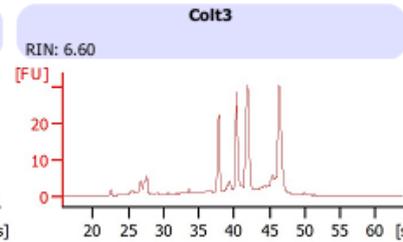
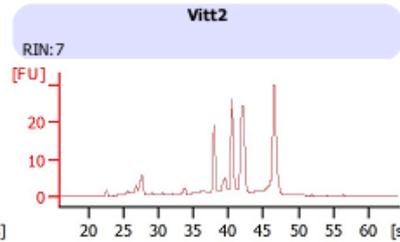
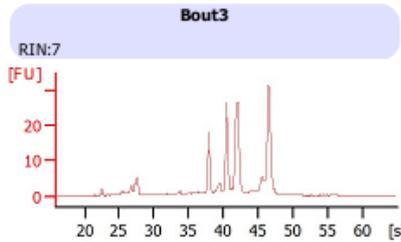
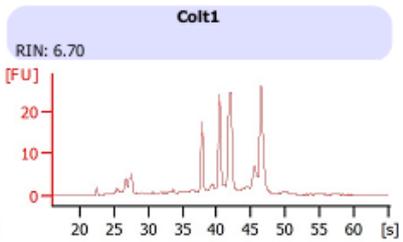
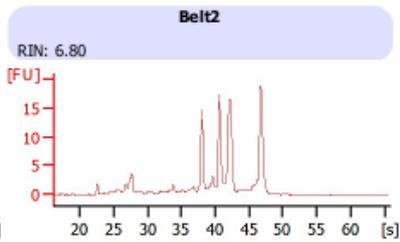
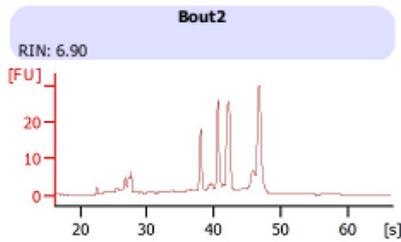
Assay Origin Path: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\assays\RNA\Plant RNA Nano.xsy

Assay Class: Plant RNA Nano
 Version: 1.3
 Assay Comments: Total RNA Analysis ng sensitivity (Plant)

© Copyright 2003 - 2009 Agilent Technologies, Inc.

Chip Information:

Chip Lot #:
 Reagent Kit Lot #:
 Chip Comments:



Annexe 4

Transcription inverse des ARNm en ADNc utilisant le Kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche)

- Décongeler tous les réactifs avant utilisation
- Centrifuger brièvement avant utilisation
- Garder tous les réactifs dans la glace
- Préparer le milieu réactionnel dans des tubes PCR stériles en ajoutant les composants

dans l'ordre indiqué ci-dessous

Réactif	1 réaction (vol)	[finale]
Oligo dT	1 µl	2,5 µM
H2O	Variable	qsp 11,4 µl
ARN	-	2 µg

Réactif	1 réaction (vol)	[finale]
Tampon RT, 5X conc	4 µl	1 x (8 mM Mg Cl ₂)
RNase inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	20 U
Mix dNTP (10 mM chacun)	2 µl	1 mM chacun
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl)	1,1 µl	10 U

Volume finale	20 µl	
----------------------	-------	--

- Mélanger les réactifs dans le tube soigneusement
- Centrifuger brièvement le tube
- Placer les tubes dans un thermocycleur
- Incuber les tubes 30 min à 50°C
- Inactiver l'enzyme en chauffant les tubes à 85°C pendant 5 min
- Stopper la réaction en plaçant les tubes dans la glace
- Stocker les tubes à -20°C

Valorisation et produits scientifiques

Publications scientifiques

Karima Bouchemal, Ryma Bouldjadj, Mohamed Nadir Belbekri, Nadia Ykhlef & Abdelhamid Djekoun. (2017). Differences in antioxidant enzyme activities and oxidative markers in ten wheat (*Triticum durum* Desf.) genotypes in response to drought, heat and paraquat stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 63 : 710-722. (publié). “Article dans une revue internationale avec IF 2,254 (1^{er} auteur)”

Karima Bouchemal, Ryma Bouldjadj, Mohamed Nadir Belbekri, Nadia Ykhlef & Abdelhamid Djekoun. (2018). Pigments photosynthétiques, enzymes antioxydantes et potentiel osmotique foliaire de dix génotypes de blé dur (*Triticum durum*) : Effet du stress hydrique. (Accepté pour publication dans *Phytoprotection*). ”Article dans une revue internationale avec IF 0,13 (1^{er} auteur)”

Communications scientifiques

Karima Bouchemal; Adnane Benzaher; Nadia Ykhlef; Abdelhamid Djekoun. (2011). Etude des effets du stress hydrique sur l’activité des enzymes antioxydantes « peroxydases et catalases » chez les céréales. Congrès International sur l’Aide à l’Agriculture Algérienne. 22-24 Novembre 2011- UBMAnnaba. « Communication affichée ».

Karima Bouchemal; Nadia Ykhlef; Abdelhamid Djekoun. (2013). Stress oxydatif chez le blé dur : analyse du polymorphisme enzymatique des peroxydases et catalases. Les doctoriales 2013. Université des frères Mentouri, Constantine, 2-3 Mars 2013. Filière : Biologie Végétale et Ecologie. (Communication orale et affichée).

Karima Bouchemal; Nadia Ykhlef; Abdelhamid Djekoun. (2015). Stress oxydatif chez le blé dur : analyse du polymorphisme enzymatique des peroxydases et catalases. Les doctoriales 2015. Université des frères Mentouri, Constantine, 21 avril 2015. Filière : Biologie Végétale et Ecologie. (Communication orale et affichée).

Karima Bouchemal; Mohamed Nadir Belbekri; Ryma Bouldjadj; Nadia Ykhlef; Abdelhamid Djekoun. (2016). Etude des marqueurs du stress oxydatif chez le blé dur (*Triticum durum*. Desf.), sous des conditions de stress hydrique, thermique et avec paraquat. Séminaire international sur la valorisation des ressources naturelles dans les zones semi-arides « potentialités et perspectives d’amélioration ». 22-23 Novembre 2016-M’sila. « Communication affichée ».

Karima Bouchemal; Mohamed Nadir Belbekri; Ryma Bouldjadj; Nadia Ykhlef; Abdelhamid Djekoun. (2016). Electrophoretic analysis of antioxidant enzymes activities in response to drought stress in wheat (*Triticum durum* Desf.) seedling. Les Journées Internationales de Biotechnologie 2016. 18-22 Décembre 2016-Hôtel Green Park Palace Concorde, Sousse, Tunisie. « Communication affichée ».

Karima Bouchemal; Mohamed Nadir Belbekri; Ryma Bouldjadj; Nadia Ykhlef; Abdelhamid Djekoun. (2017). Adaptation au stress hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : aspects physiologiques. 28^{ème} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB. 21-24 Mars 2017- Hôtel Laico, Hammamat Yasmine, Tunisie. « Communication affichée ».

Karima Bouchemal; Mohamed Nadir Belbekri; Ryma Bouldjadj; Nadia Ykhlef; Abdelhamid Djekoun. (2017). Effet du stress hydrique sur les pigments photosynthétiques, le potentiel osmotique et les enzymes antioxydantes dans les feuilles du blé dur (*Triticum durum* Desf.). 8^{es} journées scientifiques internationales sur la valorisation des bioressources. 5-7 Mai 2017- Hôtel Sentido Rosa Beach, Monastir, Tunisie. « Communication affichée ».

