

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

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

المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية
Ecole National Supérieur Agronomique

الحراش- الجزائر
El Harrach – Alger



Ecole Doctorale de Biotechnologies Végétales

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

Biotechnologies Végétales

Option: Biotechnologies Végétales

Sujet :

**Effet de la proline exogène sur le comportement physiologique
et biochimique des plantules de blé vis à vis d'une contrainte
saline**

Par: Mlle AMI Katia

Soutenu devant le jury composé de :

Président	Mr. Ounane S.M.	Pr.	ENSA
Directeur de thèse	Mme. Abrous O.	Pr.	USTHB
Examineurs	Mme. Khelifi M.	Pr.	ENSA
	Mr. Djebbar R.	MA/A	USTHB

ENSA, le : 25 / 06 / 2012

Remerciements

En premier lieu, je remercie Dieu le Tout Puissant de m'avoir donnée la force et la volonté de réaliser ce modeste travail.

Tous mes remerciements vont ensuite à mes parents, sans qui, ce travail n'aurait pu aboutir : vos sacrifices, vos encouragements et vos prières m'ont permis de vivre ce jour. Rien ne saurait exprimer la fierté, la reconnaissance et l'amour que je vous porte. Qu'Allah vous procure, santé et longue vie.

Je voudrais remercier vivement ma promotrice Mme ABROUS, professeur et vice doyenne chargée de la recherche et de la post graduation à l'USTHB, de m'avoir confiée ce sujet de thèse et d'avoir accepté de diriger ce travail malgré toutes ses lourdes charges pédagogiques et administratives. Madame, votre disponibilité, votre soutien, votre qualité d'écoute, votre compétence, votre suivi, vos encouragements, vos relectures et vos corrections percutantes m'ont été particulièrement précieuses et enrichissantes. Merci pour l'initiative que vous m'avez laissée parfois, sans laquelle je n'aurais pu acquérir la confiance en moi indispensable à l'élaboration de ce travail. C'est vraiment un honneur pour moi de travailler avec vous. Je m'incline devant vos éminentes qualités humaines.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi à Mr. OUNANE, professeur à l'ENSA et chef de département de phytotechnie, d'avoir accepté de présider le jury. Je vous exprime, monsieur, toute ma reconnaissance pour m'avoir fournie de « la proline » essentielle pour la mise en marche de ce travail. Vos apports scientifiques et vos rapports humains avec nous les étudiants sont de qualité supérieure. Merci encore.

Je présente également mes sincères remerciements à Mme KHELIFI, professeur à l'ENSA, de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury en qualité d'examinateur. Merci pour le temps, l'intérêt et la ponctualité que vous avez dédiés à la lecture et à l'évaluation de ce manuscrit malgré vos nombreuses occupations. Je vous apporte ici, madame, ma profonde reconnaissance.

Je témoigne aussi ma gratitude à monsieur DJEBBAR, maître assistant à l'USTHB, d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je vous remercie monsieur pour votre soutien scientifique et technique, pour vos conseils avisés et pour votre enthousiasme si communicatif. Que vous trouviez ici tous les respects sincères d'élève à son professeur.

Je voudrais aussi adresser un grand merci à monsieur KHELIFI, professeur à l'ENSA, qui m'a accordé la confiance et l'opportunité d'effectuer une partie de ce travail au sein du laboratoire des ressources génétiques et biotechnologies, cela m'était très réconfortable. Une mention particulière pour la qualité de la formation doctorale dont on a bénéficié sous sa coordination. Je remercierais à l'occasion l'ensemble des membres de ce laboratoire y compris son ingénieur pour tous les moments partagés de sciences et de convivialité. C'est toujours agréable de travailler avec des gens qui nous sont déjà amis.

Je n'oublie certainement pas de remercier Mme AID, professeur à l'USTHB, d'avoir eu l'amabilité de m'accepter au sein de son équipe de physiologie végétale et de m'avoir permis de réaliser mon essai dans de bonnes conditions. Soyez assurée madame de ma vive reconnaissance. Je

remercie également tous les membres de cette équipe, dans laquelle j'ai eu le plaisir de travailler, pour leur accueil, leur spontanéité et leur amitié. Un clin d'œil pour mademoiselle Draï de m'avoir guidée pendant mes premiers pas en physiologie et d'avoir répondu favorablement à mes appels et à mes interrogations.

Il est aussi de mon devoir de remercier monsieur KHEDDAM, le directeur du CNCC, de m'avoir autorisée à bénéficier du support matériel nécessaire pour ce travail (matériel végétal et papier Wathman). Monsieur BOULMLAKHAR, le responsable du laboratoire de cette institution et madame MELLAH sont aussi remerciés pour leurs discussions scientifiques et leurs conseils constructifs. Je vous prie messieurs de croire en ma grande estime.

Je tiens à remercier également monsieur KAMELI, professeur à l'école de Kouba ENS, grâce à qui j'ai cru à la possibilité de la conception du système hydroponique à partir de quelques moyens. Votre exemple concret de sa faisabilité m'a vraiment orienté. Merci monsieur.

J'aimerais remercier aussi monsieur MADANI, professeur à l'université de Bejaia, pour avoir mis gracieusement à ma disposition quelques grammes de proline. J'apprécie et j'admire beaucoup, monsieur, votre esprit scientifique.

Merci à Nour El Houda, doctorante à l'ENSA, de m'avoir passée volontairement une quantité de triméthylglycine. Qu'elle soit remerciée pour son aide et sa générosité.

J'associe aussi mes remerciements à tout le personnel de notre département de phytotechnie pour leurs encouragements, leur sympathie, leur cordialité et leur humour au quotidien qui m'ont aidée à surmonter fatigue et découragement. Un merci particulier à Safir pour son entraide et sa gentillesse. Je lui reste infiniment reconnaissante.

Il m'est agréable d'exprimer mes remerciements à monsieur Ferhat, Abd Nour et Said, personnel administratif de l'USTHB, pour leurs aides et leurs compréhensions si importantes dans les moments les plus difficiles. Vos bureaux nous ont été toujours ouverts. Merci.

Ma respectueuse considération au corps professoral de l'ENSA et à l'ensemble du personnel de la bibliothèque particulièrement Mme Anissa et Habiba.

Je ne saurais terminer sans remercier tous mes proches, famille et amis qui m'ont soutenue tout au long de mon cheminement. Je tiens à remercier Ouarda, ma meilleure amie, pour son amitié, pour ses inlassables encouragements et pour les moments de détente partagés, merci de m'avoir écoutée parler de ma thèse pendant de longues heures et surtout merci d'être aussi adorable !. Et bien sûr, un immense merci à Kamélia, ma sœur jumelle qui a été et reste mon plus grand soutien, d'avoir supporté ma mauvaise humeur et mon investissement parfois exagéré dans ce travail au détriment de notre vie commune. Tu as été la partenaire idéale et mon complément parfait.

Enfin, je profite de l'occasion pour m'excuser auprès de certains d'avoir été parfois un peu dissipée durant ce temps... ✍

Dédicaces

Je dédie ce travail à:

Mes très chers parents ;

Ma très chère tante Yemma Fatima et à ma grand-mère Yaya ;

Ma très chère sœur jumelle Kamy ;

Mes sœurs Yasmine, Inas, Kenza et mon cher frère Anis ;

Mes oncles et leurs femmes ;

Mes cousins et cousines ;

Mes amis (es) : Ouarda, Lynda, Ouiza, Nora, Samou, Samia, Assia, Wassila, Farida, Zhor, mohamed champignon, wahid et islam;

Mes amis (es) thésards de l'école doctorale Biotechnologies Végétales particulièrement wada, guigua, wewel, mya, sissou, mina et lamou.

Mes amis ingénieurs de la section Phytotechnie (2008/2010).

Katty ☺

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des planches

Liste des abréviations

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

I. Blé dur

I.1. Classification botanique du blé dur.....3

I.2. Répartition géographique et origine génétique du blé dur.....3

I.2.1. Origine géographique.....3

I.2.2. Origine génétique.....3

I.3. Description générale de la plante.....4

I.4. Cycle de développement.....5

I.5. Exigences agro-écologiques du blé dur.....7

I.6. Principales contraintes environnementales de la production du blé en Algérie.....7

II. Salinité et Stress salin

II.1. Définitions.....8

II.1.1. Salinité.....8

II.1.2. Stress salin.....8

➤ Notion de stress.....8

➤ Stress salin.....9

II.2. Importance de la salinité dans le monde et en Algérie.....9

II.3. Origines de la salinité.....10

a. Roche mère.....10

b. Nappe phréatique.....10

c. Eau d'irrigation chargée.....10

d. Intrants agricoles.....11

II.4. Classification des sols affectés par le sel.....	11
II.5. Effets de la salinité sur la plante.....	12
II.5.1. Sur la germination.....	12
II.5.2. Sur la croissance et le développement.....	12
II.5.3. Sur le régime hydrique.....	12
II.5.4. Sur la nutrition minérale.....	13
II.5.5. Sur le métabolisme cellulaire.....	13
II.6. Mécanismes de toxicité du chlorure de sodium.....	13
II.6.1. Stress osmotique.....	13
II.6.2. Stress ionique.....	14
II.6.3. Stress nutritionnel.....	15
II.6.4. Stress secondaire « oxydatif ».....	15
II.7. Perception du stress par la plante et transduction du signal.....	16
II.7.1. Perception du signal.....	16
➔ Canaux calciques.....	16
➔ Histidines Kinases.....	17
II.7.2. Transduction du signal.....	17
➔ Le second messager calcique (calcium).....	17
➔ Voie Salt Overly Sensitive (SOS).....	17
➔ Protéines Kinases dépendantes du calcium (CDPKs).....	18
➔ Voies des MAPKinase.....	18
➔ Phospholipases.....	19
II.8. Tolérance des plantes au stress salin.....	19
II.8.1. Terminologie.....	19
➔ Résistance.....	19
➔ Tolérance.....	20
➔ Adaptation.....	20
II.8.2. Diversité génétique de la tolérance des plantes au sel.....	20

➔ Les halophytes et les glycophytes.....	20
II.8.3. Principaux mécanismes d'adaptation au stress salin.....	21
II.8.3.1. Adaptations phénologiques.....	21
II.8.3. 2. Adaptations morphologiques.....	21
1. Hauteur de la plante.....	21
2. Longueur et surface foliaire.....	21
3. Morphologie du système racinaire.....	22
II.8.3. 3. Adaptations physiologiques.....	22
1. Teneur en chlorophylles et capacité photosynthétique.....	22
2. Potentiel hydrique.....	23
II.8.3.4. Adaptations biochimiques.....	23
1. Ajustement osmotique.....	23
1.1. Accumulation de la proline.....	23
1.2. Accumulation des sucres solubles.....	24
2. Protéines de stress.....	24
3. Gestion du stress oxydatif.....	25
III. Proline	
III. 1. Historique.....	27
III.2. Propriétés de la proline.....	27
III.3. Implications métaboliques de proline dans le développement de la plante.....	28
III.4. Métabolisme de la proline.....	28
III.4.1. Biosynthèse de la proline.....	28
III.4.1.1. Voie de biosynthèse de proline à partir du glutamate.....	28
III.4.1.2. Voie de biosynthèse de la proline à partir de l'ornithine.....	29
III.4.2. Catabolisme de la proline.....	30
III.5. Impact de la salinité sur l'accumulation de la proline.....	32
III.6. Rôles de la proline endogène durant le stress.....	32
III.6.1. Ajustement osmotique.....	32
III.6.2. Protection de la structure cellulaire pendant la déshydratation.....	32
III.6.3. Source d'énergie et régulateur du potentiel redox.....	33

III.6.4. Détoxification des espèces réactives d'oxygène.....	33
III.6.5. Transmission du signal.....	33
III.7. Transport de la proline pendant le stress.....	34
III.8. Génie génétique et tolérance au sel.....	34
III.9. Application exogène de la proline et son rôle vis-à-vis du stress salin.....	35

Matériels et méthodes

1. Objectif du travail.....	38
2. Matériels.....	38
2.1. Choix du matériel végétal.....	38
2.2. Choix du type de sel.....	39
2.3. Choix de la proline.....	39
2.4. Choix des concentrations du NaCl et de la proline.....	40
2.5. Choix du milieu.....	40
➤ Au stade de germination.....	40
➤ Au stade plantules : culture hydroponique.....	40
3. Méthodes d'étude.....	41
3.1. Stade germination (culture <i>in vitro</i>).....	41
a. Désinfection des semences.....	41
b. Mise en germination.....	41
c. Dispositif expérimental.....	42
3.2. Stade plantule (culture hydroponique).....	42
a. Préparation des graines et prégermination.....	42
b. Mise en culture.....	43
c. Induction de la contrainte saline et application exogène de la proline sur les plantules de blé dur.....	45
d. Disposition des traitements.....	45
e. Contrôle du système.....	45
f. Echantillonnage.....	46
3.3. Paramètres mesurés et techniques de dosage.....	46
3.3.1. Stade germination.....	46
a. Pourcentage de germination.....	46

3.3.2. Stade plantule	46
3.3.2.1. Paramètres morphologiques.....	47
a. Mesure de la croissance en longueur.....	47
b. Mesure de la croissance pondérale.....	47
c. Surface foliaire (SF « cm^2 »).....	47
3.3.2.2. Paramètres physiologiques.....	47
a. Teneur Relative en eau de la feuille (TRE « % »).....	47
b. Estimation de l'intégrité membranaire.....	48
3.3.2.3. Paramètres biochimiques.....	48
a. Détermination de la teneur en pigments chlorophylliens.....	48
b. Dosage des sucres solubles et d'amidon.....	49
c. Dosage des protéines hydrosolubles.....	50
d. Dosage de la proline endogène.....	51
e. Dosage de la glycine bêtaïne.....	53
f. Détermination de la teneur de malondialdéhyde.....	54
g. Activité enzymatique de la catalase.....	55
4. Traitements statistiques.....	57

Résultats et discussions

I. Stade germination.....	58
I.1. Effet de la proline exogène sur la germination.....	58
II. Stade croissance.....	65
II.1. Paramètres morphologiques.....	65
II.1.1. Effet de la proline exogène sur la croissance en longueur.....	65
II.1.2. Effet de la proline exogène sur la croissance pondérale.....	67
■ Poids de matière fraîche (<i>partie aérienne</i> et <i>partie racinaire</i>).....	67
■ Poids de matière sèche (<i>partie aérienne</i> et <i>partie racinaire</i>).....	68
II.1.3. Effet de la proline exogène sur la surface foliaire (SF « cm^2 »).....	69
➤ Discussion	70
II.2. Paramètres physiologiques.....	75
II.2.1. Effet de la proline exogène sur la teneur relative en eau (TRE « % »).....	75
➤ Discussion	76
II.3. Paramètres biochimiques.....	79
II.3.1. Effet de la proline exogène sur la teneur en pigments chlorophylliens.....	79

■ Chlorophylle a et chlorophylle b.....	79
■ Chlorophylles totales.....	81
■ Rapport chlorophylle a / chlorophylle b.....	82
■ Caroténoïdes.....	82
➤ Discussion	83
II.3.2. Effet de la proline exogène sur la teneur en sucres éthanolosolubles et en amidon	87
➤ Discussion	88
II.3.3. Effet de la proline exogène sur la teneur en protéines hydrosolubles.....	92
➤ Discussion	93
II.3.4. Effet de la proline exogène sur la teneur en proline endogène.....	95
➤ Discussion	96
II.3.5. Effet de la proline exogène sur la teneur en glycine bêtaïne.....	100
➤ Discussion	101
II.3.6. Effet de la proline exogène sur l'intégrité membranaire : fuite relative des électrolytes et teneur en malondialdéhyde.....	104
➤ Discussion	105
II.3.7. Effet de la proline exogène sur l'activité enzymatique de la catalase.....	108
➤ Discussion	109
Conclusion et perspectives.....	113
Références bibliographiques.....	116
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des sols salés.....	11
Tableau 2. Caractéristiques principales de la variété étudiée.....	39
Tableau 3. Solutions finales utilisées pour chaque traitement.....	45
Tableau 4. Impact de la proline exogène sur le rapport chlorophylle a /chlorophylle b de blé dur soumis à une contrainte saline.....	82

Liste des figures

Figure 1. Plante de blé dur.....	4
Figure 2. Différents stades de développement du blé.....	6
Figure 3. Schéma de la réponse biphasée de la croissance à la salinité.....	14
Figure 4. Schéma simplifié des mécanismes de toxicité du sel sur les plantes.....	16
Figure 5. La voie SOS pour la régulation de l'homéostasie ionique pendant le stress salin.....	18
Figure 6. Représentation schématique des sites d'action des différentes phospholipases au niveau d'un phospholipide.....	19
Figure 7. Schéma global de la signalisation du stress salin et des réponses induites au niveau cellulaire.....	26
Figure 8. Illustration de la formule générale de l'acide aminé proline.....	27
Figure 9. Illustration de la voie de biosynthèse de la proline dérivée du glutamate.....	29
Figure 10. Illustration de la voie de biosynthèse de la proline dérivée du glutamate.....	29
Figure 11. Réactions du catabolisme de la proline au niveau des mitochondries.....	31
Figure 12. Le modèle proposé pour le métabolisme de la proline.....	31
Figure 13. Semences mûres de blé dur variété « <i>Waha</i> »	38
Figure 14. Plan du dispositif expérimental.....	42
Figure 15. (a) Prégermination de la semence désinfectée, (b) graines germées après une semaine	43
Figure 16. Système d'oxygénation de la solution nutritive et de culture hydroponique.....	44
Figure 17. Stade de prélèvement des échantillons.....	46
Figure 18. Courbe étalon du glucose servant au dosage des sucres solubles.....	50
Figure 19. Courbe étalon de la BSA servant au dosage des protéines hydrosolubles.....	51
Figure 20. Gamme étalon de la proline.....	53
Figure 21. Gamme étalon de glycine bêtaïne.....	52
Figure 22. Réaction chimique du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique.....	55
Figure 23. Impact de la proline exogène sur le pourcentage de germination des semences de blé dur soumises à une contrainte saline.....	58
Figure 24. Etat des semences germées après 12 jours sur le milieu MS traité différemment.....	60
Figure 25. Impact de la proline exogène sur la croissance en longueur (partie aérienne et racinaire) des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.....	66
Figure 26. Impact de la proline exogène sur le poids de la matière fraîche (partie aérienne et partie racinaire) des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.....	67

Figure 27. Impact de la proline exogène sur le poids de la matière sèche (partie aérienne et partie racinaire) des plantules soumises à une contrainte saline.....	68
Figure 28. Impact de la proline exogène sur la surface foliaire des plantules du blé dur soumises à une contrainte saline.....	69
Figure 29. Impact de la proline exogène sur la teneur relative en eau des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.....	76
Figure 30. Impact de la proline exogène sur la teneur en chlorophylle (a) et (b) de blé dur soumis à une contrainte saline.....	80
Figure 31. Impact de la proline exogène sur la teneur en chlorophylles totales des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.....	81
Figure 32. Impact de la proline exogène sur la teneur en caroténoïdes des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.....	83
Figure 33. Impact de la proline exogène sur la teneur en sucres solubles des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.....	87
Figure 34. Impact de la proline exogène sur la teneur de l'amidon de blé dur soumis à une contrainte saline.....	88
Figure 35. Impact de la proline exogène sur la teneur en protéines hydrosolubles des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline	92
Figure 36. Impact de la proline exogène sur la teneur en proline endogène de blé dur soumis à une contrainte saline.....	96
Figure 37. Impact de la proline exogène sur la teneur foliaire en glycine bêtaïne de blé soumis à une contrainte saline.....	100
Figure 38. Impact de la proline exogène sur la fuite relative d'électrolytes dans les feuilles du blé soumis à une contrainte saline.....	104
Figure 39. Impact de la proline exogène sur la teneur en malondialdéhyde de blé dur soumis à une contrainte saline.....	105
Figure 40. Impact de la proline exogène sur l'activité enzymatique de la catalase dans les plantules de blé dur soumis à une contrainte saline.....	109

Liste des planches

Planche 1. Impact de la proline exogène sur la germination des semences de blé dur « Waha » en conditions salines et non salines.....59

Planche 2. Effet de la proline exogène sur la croissance en longueur des plantules en conditions salines et non salines.....65

Liste des abréviations

ABA : acide abscissique ;
ADN : acide désoxyribonucléique ;
ANOVA1 : Analyse de la variance à un facteur ;
AO : ajustement osmotique ;
APX : Ascorbate peroxydase ;
ATP : Adénosine tri-phosphate ;
BSA : Sérum albumine de bœuf ;
C.N.C.C.: Centre National de contrôle et de certification des semences et plants ;
CAT : catalase ;
CDPK : calcium-dependent protein kinases ;
CE : Conductivité électrique ;
CL : Coic et Lesaint ;
cm : centimètre ;
ddl : Degré de liberté ;
DO: Densité optique ;
dS/m: Décisiemens par mètre ;
EDTA : ethylene diamine tetra-acetic acid;
FAO : food and agriculture organization;
g ; g/l : gramme ; gramme par litre;
Gr : Grossissement ;
GSA : glutamate-semialdehyde ;
H₂O₂: peroxide d'hydrogène ;
HK : histidines kinases;
HSPs: Heat Shock protein;
ICARDA: International Center for Agricultural Research in Dry Areas;
INSID : Institut National des Sols, de l'irrigation et du Drainage ;
ITGC: Institut technique des grandes cultures;
LEA: Late embryogenesis abundant proteins;
MAPKs: Mitogen Activated Protein Kinases;
MDA: Malondialdéhyde ;
mg ; mg/ml : milligramme ; milligramme par millilitre;
mM: millimolaire ;

mmhos/cm : millimohs par cm ; **μmhos/cm** : micromohs par cm
MS : Milieu de culture de Murashige et Skoog (1962) ;
mS/cm : millisiemens par centimètre ;
MVS: matière végétale sèche ;
NaCl : Chlorure de sodium ;
NADH: nicotinamide-adénine-dinucléotide ;
NADPH: nicotinamide adenine dinucléotide phosphate réduit ;
nm: nanomètre ;
O₂⁻ : anion superoxyde ;
¹O₂: oxygène singulet ;
OAT : ornithine α-aminotransférase ;
OH[·] : Radical hydroxyle ;
P: seuil de probabilité ;
P5C : pyrroline-5-carboxylate ;
P5CR : 1-pyrroline-5-carboxylate réductase ;
P5CS : pyrroline-5-carboxylate synthétase ;
PEG : polyethylene glycol ;
PM : poids moléculaire ;
POX : gaïacol peroxydase ;
Pro T : transporteur de proline ;
ROS: reactive oxygen species (espèces réactives d'oxygène) ;
SOD : superoxyde dismutase;
SOS: salt overly sensitive;
tab : tableau
TBA: acide thiobarbiturique ;
TBARS: ThioBarbituric Acid-Reactive Substances;
TCA: Acide trichloroacétique ;
TRE: Teneur relative en eau ;
U.S.T.H.B : Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene ;
UV : Ultra violet;
λ : Longueur d'onde ;
% : Pourcentage ;
± : Plus au moins.

Introduction

La salinité est l'un des facteurs abiotiques les plus courants qui inhibe la croissance des plantes et réduit la productivité des cultures. Naturelle soit-elle ou bien causée par les pratiques d'irrigation inadéquates et la fertilisation intense, la salinité du sol est un souci agricole majeur dans le monde entier. Plus de 800 millions d'hectares de terre sont affectés par le sel (FAO, 2009) et caractérisés par la présence d'un problème potentiel de salinité. Les régions arides et semi arides - constituant environ 2/3 de la surface du globe terrestre - sont exposées davantage à ce phénomène puisque l'évapotranspiration élevée, l'irrigation et les faibles précipitations dans ces zones climatiques concourent vers l'accumulation des sels dans les couches du sol les plus élevées, où se développent généralement les racines (Munns, 2005).

Les régions du bassin méditerranéen sont fortement touchées par ce fléau. L'Algérie fait partie du groupe des pays méditerranéens où la sécheresse, observée depuis longtemps, a conduit manifestement au processus de salinisation des sols (Belkhodja et Bidai, 2004). Près de 95 % du territoire national est représenté par des zones arides et la majorité des sols agricoles sont donc potentiellement affectés par le sel (Beldjoudi, 1993 ; Bendjeffal, 2001). La salinité touche, selon les données disponibles, 3.2 millions d'hectares dans le pays (INSID, 2008).

La physiologie des plantes poussant dans ces sols est par conséquent altérée, ce qui réduit leur croissance et leur rendement (Besri, 1995). En effet, la salinité impose chez les plantes un stress osmotique, un stress ionique et des stress secondaires comme le déséquilibre nutritionnel et le stress oxydatif (Zhu, 2002).

A l'inverse des halophytes naturellement tolérantes aux sels (NaCl étant en général majoritaire), la plupart des espèces d'intérêt agronomique sont rangées dans le groupe des glycophytes, dont la croissance est diminuée en présence du sel. La quantité de sels dans le sol que les plantes peuvent supporter varie avec les familles, les genres et les espèces, mais aussi les variétés considérées. Les céréales font partie de cette catégorie de plantes qui ne peuvent pas se développer dans les habitats salins. Le blé dur, aliment de base de la majeure partie de la population algérienne, occupe une surface importante d'environ 65 % de l'étendue céréalière. Toutefois du fait qu'elle est généralement associée aux zones arides et semi-arides, la culture du blé dur en Algérie est encore difficile à maîtriser en matière de rendement. La contrainte saline liée à la sécheresse est l'une des raisons majeures de cette culture.

Face aux conditions salines, les plantes s'adaptent métaboliquement au stress en accumulant des solutés organiques azotés comme la proline. Ce composé s'accumule principalement dans le cytosol des cellules où il participe activement dans l'ajustement osmotique interne de la plante (Carillo et *al.*, 2011). Parallèlement à son rôle d'osmorégulateur, la

proline joue une fonction de protecteur dans le cytoplasme (Nemmar, 1983 ; Burritt, 2012). Elle accomplit aussi un rôle important dans la détoxification des radicaux libres (Kavi kishor et *al.*, 1995 ; Ivanov et *al.*, 2012) et dans la correction du potentiel redox des cellules (Hare et *al.*, 1999 ; 2011). De plus, la proline peut agir en tant que composé de stockage de l'énergie, d'azote et de carbone à utiliser dans la phase post-stress (Tal et *al.*, 1979 ; Gerdakaneh et *al.*, 2010). L'accumulation de ce composé est donc souvent corrélée avec la tolérance au sel (Ashraf et Foolad, 2007). Bien que beaucoup d'espèces végétales accumulent de la proline, certaines d'entre elles (céréales comprises) ne l'accumulent pas à des quantités raisonnables pour protéger la plante contre les dommages du stress (Nawaz, 2007). Beaucoup d'efforts ont été consacrés à l'augmentation de la synthèse de cet osmoprotectant par le génie génétique, mais sans beaucoup de succès dans l'obtention de plantes (ou de variétés) tolérantes au sel. Alternativement, l'application de la proline exogène s'avère efficace dans l'amélioration de la résistance des plantes au stress salin (Nawaz, 2007). Cette approche, qui joue un rôle significatif dans l'augmentation de la production végétale dans les environnements stressants, a maintenant gagné l'attention de nombreux chercheurs. Cependant, les mécanismes par lesquels la proline exogène parvient à améliorer la tolérance des plantes vis-à-vis du stress restent encore non expliqués ou, tout au moins mal connus.

Il est actuellement admis que l'élucidation des mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires de la tolérance au stress salin contribuerait à la création de variétés tolérantes au sel. Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'un des projets de recherche développés par l'équipe de physiologie végétale « *Mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires de la tolérance des plantes aux conditions environnementales, aux pesticides et aux polluants: identification de marqueurs de tolérance* » ; il a pour objectif principal l'étude de l'impact d'un apport exogène de la proline sur le comportement des semences et des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline. Pour une meilleure compréhension, l'intérêt est porté essentiellement sur leurs réponses morpho-physiologiques et biochimiques vis-à-vis de la proline exogène après avoir estimé son influence sur la germination des semences.

Notre travail dans une première partie aborde une revue bibliographique exploitant les informations disponibles relatives à ce sujet, et ensuite dans une seconde partie il décrit la méthodologie adoptée dans notre expérimentation. Enfin sur la base des résultats obtenus concernant l'influence de la proline exogène sur le blé sous stress salin, nous essayons d'expliquer et de discuter scientifiquement cette influence.

I. Blé dur

I.1. Classification botanique du blé dur

Le blé dur (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) est une plante annuelle de la classe des Liliopsida, de la famille des Poacées, de la tribu des Triticées et du genre *Triticum* (annexe I).

I. 2. Répartition géographique et origine génétique du blé dur

I.2.1. Origine géographique

Les graminées à paille, espèces dont font partie les blés, sont apparues au Crétacé (une période avant l'ère chrétienne) (Bonjean et Picard, 1990). Le Moyen-Orient où coexistent les deux espèces parentales (*Triticum monococcum* et *Aegilops Speltoides*) et où se rencontrent de nombreuses formes de Blé dur serait le centre géographique d'origine. A partir de cette zone d'origine, l'espèce s'est différenciée dans trois centres différents : le bassin occidental de la Méditerranée, le Sud de l'U.R.S.S. et le Proche-Orient. Chaque centre de différenciation donne des groupes de variétés à caractères morphologiques et physiologiques particuliers (Graniac, 1977). L'Algérie se trouvant à proximité de ce centre primaire d'origine, la diversification et le polymorphisme considérable de l'espèce de blé dur dans nos régions a fait considérer l'Afrique du Nord comme centre secondaire d'origine du *Triticum durum* (Erroux, 1974).

I.2.2. Origine génétique

Génétiquement, le blé dur est un allotétraploïde (deux génomes: AABB) comptant au total 28 chromosomes ($2n = 4x = 28$), contenant le complément diploïde complet des chromosomes de chacune des espèces souches (Wall et *al.*, 1971). Il résulte d'un croisement rare mais naturel suivi d'un doublement des chromosomes entre *Triticum monococcum* apportant le génome A et *Aegilops Speltoides* apportant le génome B. Une telle hybridation aurait donné naissance au *Triticum dicoccoides* qui se serait diversifié en *Triticum dicoccum* ($n = 14$) et *Triticum durum* ($n = 14$) (Moule, 1980).

I.3. Description générale de la plante

Le blé dur est une graminée annuelle de hauteur moyenne, constitué d'un appareil végétatif herbacé (figure 1) qui comprend un système racinaire formé de racines séminales produites par la plantule durant la levée et des racines adventives qui se forment plus tard à partir des nœuds à la base de la plante constituant ainsi le système racinaire permanent. Il possède une tige cylindrique, dressée, habituellement creuse et subdivisée en entrenœuds. Certaines variétés possèdent toutefois des tiges pleines. Le chaume (talle) se forme à partir de bourgeons axillaires aux nœuds à la base de la tige principale (Bozzini, 1988).

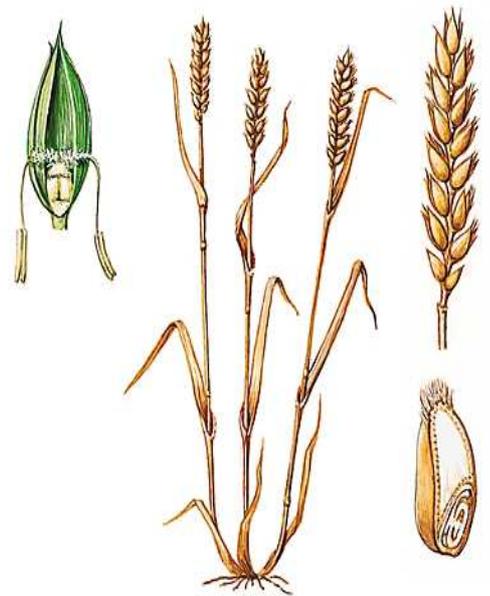


Figure 1. Plante de blé dur
(www.larousse.fr)

Comme pour d'autres graminées, les feuilles de blé dur sont à nervures parallèles et formées de deux parties : la partie inférieure entourant la jeune pousse ou la tige (la gaine), la partie supérieure en forme de lame (le limbe). La gaine de chaque feuille s'insère à partir du nœud d'où prend naissance la feuille (figure 1). Les stipules ou oreillettes se trouvent à l'intersection entre le limbe et la gaine.

L'inflorescence du blé dur est un épi muni d'un rachis portant des épillets séparés par de courts entrenœuds (figure 1). Chaque épillet est une petite grappe d'une à cinq fleurs dont trois à quatre sont fertiles enveloppées chacune par deux glumelles (supérieure et inférieure) et comportant typiquement trois étamines et un ovaire à un seul carpelle.

Chaque fleur peut produire un fruit à une seule graine, soit le caryopse (figure 1) qui contient un large endosperme et un embryon aplati situé à l'apex de la graine.

I.4. Cycle de développement

Le cycle du blé comprend cinq phases (Ahmadi et *al.*, 2002) :

- **Germination-levée** : la germination commence lorsque le caryopse a absorbé le quart de son poids d'eau.
- **Tallage** : les tiges secondaires apparaissent durant cette phase qui dure quarante à cinquante jours.
- **Montaison** : les tiges s'allongent mais les épis ne sont pas encore apparents.
- **Epiaison-floraison** : les épis apparaissent puis la plante fleurit ; les étamines apparaissent une fois la fécondation terminée. Cette phase dure environ trente jours.
- **Développement et maturation des graines** : les graines acquièrent leur forme et leur taille définitive, puis leur consistance évolue ; ils passent du stade pâteux puis au stade grain dur (figure 2).

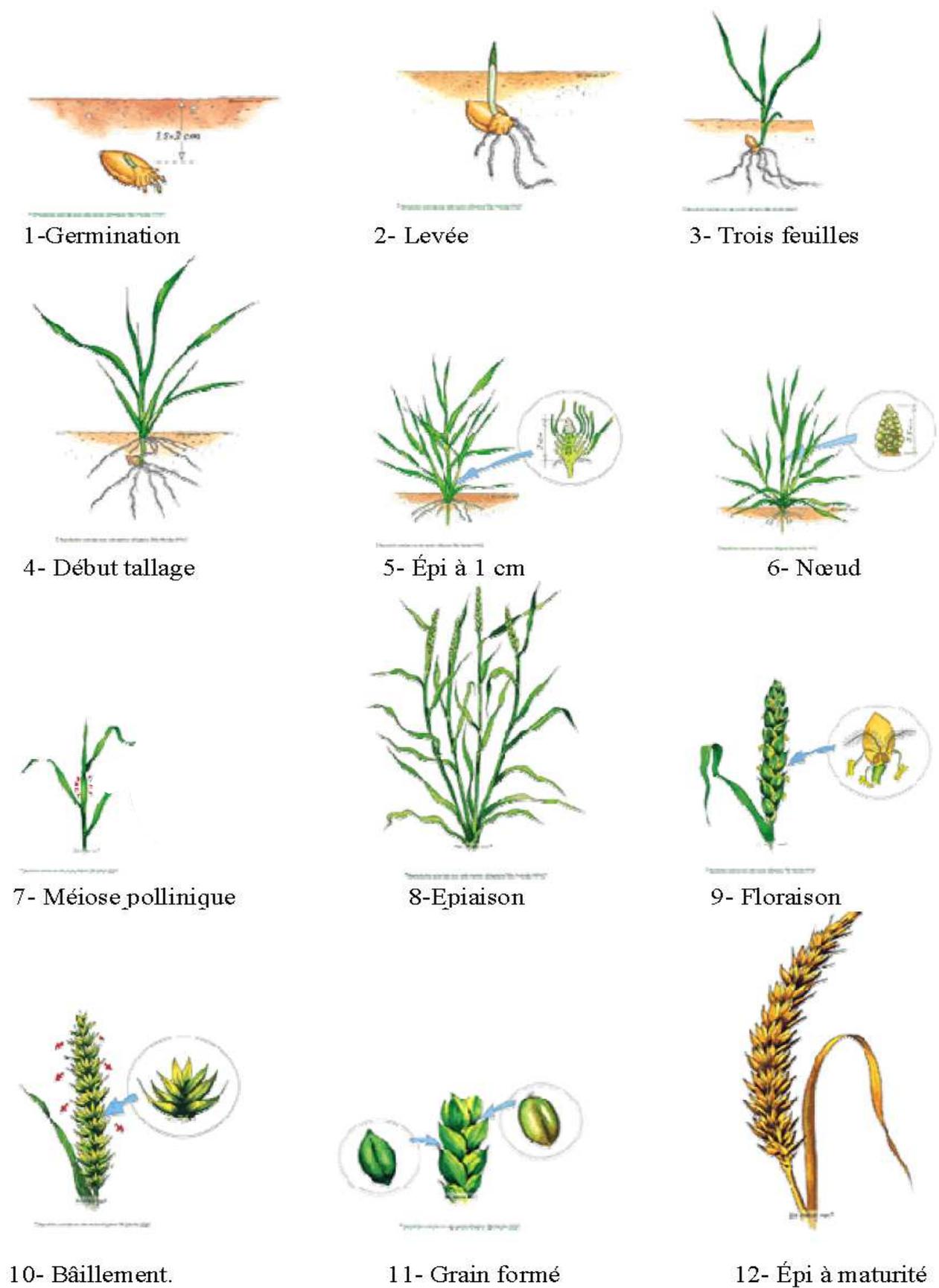


Figure 2. Différents stades de développement du blé
(www.unctad.org/infoomm/Francais/ble/culture.htm)

I.5. Exigences agro-écologiques du blé dur

Le blé dur est bien adapté aux régions à climat relativement sec (Bozzini, 1988) où il fait chaud le jour et frais la nuit durant la période végétative, ce qui est typique des climats méditerranéens et tempérés.

Sensible aux basses températures et aux fortes gelées (Brink et Belay, 2006), le blé a besoin d'un minimum de cent jours sans gel pour se développer (Ahmadi et *al.*, 2002). Sa germination a lieu à des températures de 4 à 37° C (Brink et Belay, 2006). La floraison ne peut débuter que si la température dépasse 14° C et est optimale à 16,5° C, et la maturité est optimale autour de 20° C.

Plante des climats tempérés, le blé se développe entre 50° de latitude Nord et Sud (Ahmadi et *al.*, 2002).

Cette céréale a surtout besoin d'eau en début de cycle (germination-tallage), puis durant la quinzaine qui précède l'épiaison. Elle nécessite en culture pluviale de 400 à 500 mm de précipitations pendant son cycle (Ahmadi et *al.*, 2002).

Les sols qui conviennent le mieux à sa production sont ceux qui sont bien aérés, bien profonds et bien structurés à pH voisin de la neutralité (5.6 - 7.5) (Brink et Belay, 2006). Elle ne supporte pas l'engorgement (Ahmadi et *al.*, 2002) et elle exige un sol sain, drainant bien mais pas trop sujet au stress hydrique surtout pendant la période de l'accumulation des réserves dans le grain. Le blé dur est sensible à la salinité du sol (Brink et Belay, 2006). Son installation dans les terres se ressuyant mal, le rend plus sensible aux maladies cryptogamiques (Alaoui, 2005).

I.6. Principales contraintes environnementales de la production du blé en Algérie

Le blé dur, une espèce typique à la méditerranée, est largement cultivé dans le bassin méditerranéen (Tambussi et *al.*, 2005 ; Bouthiba et Debaeke, 2009) : 60 % de sa production est concentrée dans le sud de l'Europe, le nord de l'Afrique et dans le moyen Orient (Royo et Abio, 2003).

En Algérie, le blé dur est largement cultivé, environ un million d'hectares lui sont consacrés (Benlaribi, 1990). Toutefois, sa production se caractérise par une grande variation et les rendements à l'hectare demeurent faibles. Il est généralement associé aux zones semi

arides. Dans ces régions, les surfaces actuellement utilisables pour la production de cette céréale (très utilisée dans l'alimentation humaine) diminuent progressivement. En effet dans ces écosystèmes marqués par des sécheresses rigoureuses et fréquentes, la salinisation des sols se manifeste comme l'une des principales contraintes limitant le développement et la productivité des plantes notamment les céréales (Chérifi *et al.*, 2011 ; Maggio *et al.*, 2011).

Ce problème est plus aigu quand les procédures d'irrigation emploient l'eau de qualité inférieure et quand le drainage du sol est pauvre (Masmoudi *et al.*, 2009). Il a été montré que la concentration de la solution du sol en sel peut atteindre 4 à 10 fois celle de l'eau de l'irrigation en 4 à 7 jours et ceci suite à la remontée des sels accumulés vers la surface sous l'effet conjugué de l'évaporation et de l'absorption d'eau par les plantes (El Mekkaoui, 1987) ce qui mène souvent à une perte sérieuse du rendement (Masmoudi *et al.*, 2009).

II. Salinité et Stress salin

II.1. Définitions

II.1.1. Salinité

La salinité est la quantité du sel dans le sol ou dans l'eau. Le sel dominant dans la plupart des sols salins est le chlorure de sodium (NaCl). Une variation des quantités de chlorures de calcium, de magnésium, de potassium et des sulfates de sodium peut également survenir (McMullen, 2000). Selon Forges (1972) *In*. El Mekkaoui (1987), il y a salinité chaque fois que la présence de ces sels modifie la vie du végétal ou les caractéristiques des sols ; celle-ci est souvent exprimée en concentrations (mM) ou en conductivité électrique (CE : mS/cm équivalent de $\mu\text{mhos/cm}$; dS/m équivalent de mmhos/cm) (Tanji, 2002 ; Al-Arbe, 2007).

II.1.2. Stress salin

➤ Notion de stress

Levitt (1980) décrit la physiologie du stress en l'abordant dans son aspect physique. Le stress est une contrainte qui peut se résumer à une (ou plusieurs) force (s) de déformation appliquée (s) à un corps. La définition la plus pratique pour le stress biologique est une force adverse ou une condition, qui inhibe le fonctionnement normal et le bien-être du système biologique (Mahajan et Tuteja, 2005). Par analogie à la physiologie des plantes, une contrainte environnementale va provoquer une tension interne « *strain* ou *contrainte* » dans l'organisme exposé qui est le végétal.

Le stress perçu par une plante dépend de la résistance de l'organisme à un type de stress appliqué avec une certaine intensité (Allaoui, 2006).

➔ Stress salin

Le stress salin peut être défini comme un excès des ions de sels solubles tels que le sodium (Na^+), le chlorure (Cl^-), le calcium (Ca^{+2}), le magnésium (Mg^{+2}), les sulfates (SO_4^{-2}), et les bicarbonates (HCO_3^-) dans le sol ou dans le milieu de culture qui peut avoir des effets délétères sur la croissance des plantes (Al-Arbe, 2007).

II.2. Importance de la salinité dans le monde et en Algérie

Les sols salés se rencontrent dans toutes les parties du monde. Ils se trouvent non seulement dans les milieux arides et semi-arides mais aussi dans les milieux sub-humides et même humides (Touaf et *al.*, 2004). La salinité affecte 5 % des terres cultivées, qui subviennent au tiers des besoins alimentaires du globe (Askri et *al.*, 2007). Ghassemi et *al.*, (1995) ont réalisé une recherche approfondie sur la salinisation des terres et les ressources hydriques : ils ont montré que plus de 76 millions d'hectares de terre sont affectées par la salinisation secondaire dans le monde, dont 14.8 millions d'hectares (19 %) en Afrique.

Les régions du bassin méditerranéen, telle la Tunisie qui possède de vastes zones salées (chott et sebkha) et d'importantes quantités d'eaux de qualité très médiocres (Mezni et *al.*, 2002), sont fortement touchées par ce problème.

En Algérie, les sols salés occupent de grandes étendues et ils sont particulièrement localisés dans les zones sèches (Touaf et *al.*, 2004). Cependant, il n'est recensé aucune étude cartographique fiable et précise permettant de délimiter les zones touchées par la salinité des terres et la quantification de la teneur des sels dans le sol. Il existe toutefois quelques données fragmentaires qui donnent une idée générale sur le phénomène de la salinité et de la dégradation des terres. D'après Szablocs (1989) 3,2 million d'hectares subissent à des degrés de sévérité variable, le phénomène de salinisation dont une bonne partie se trouve localisée dans les régions steppiques où le processus de salinisation est plus marqué du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient. Une idée sur les superficies affectées par la salinité pour le Bas Chélif a été donnée par l'INSID en 1997 (sur 40 000 hectares étudiés près de 11 000 ha soit 27 % sont affectés par un degré de salinité de plus de 8 ds/m).

D'une manière générale, ce phénomène est observé dans :

- ➔ Les plaines et vallées de l'Ouest du pays (*Mina, Cheliff, Habra Sig, Maghnia*) ;
- ➔ Les hautes plaines de l'Est (*Constantine, Sétif, Bordj Bou Arreridj, Oum El Bouagui*) ;
- ➔ Aux abords des Chotts et de Sebkhas (*Chott Ech Chergui, Chott Gharbi, Chott Hodna, Chott Melghir, Sebkhia d'Oran, de Benziane, Zemmoul, Zahrez Gharbi et Chergui, etc...*) ;
- ➔ Et dans le grand Sud (*les Oasis, le long des oueds, etc...*) (INSID, 2008).

II.3. Origines de la salinité

a. Roche mère

Les sels d'origine lithologique dissous à partir des roches mères c'est le cas, par exemple, des sols salés de l'intérieur de l'Afrique du nord et en particulier ceux des hauts plateaux du sud Algérois sont entraînés par les eaux de ruissellement ou d'infiltration vers les chotts où ils se concentrent par suite d'une évaporation trop intense (Ozenda, 1954).

b. Nappe phréatique

La nappe phréatique salée et peu profonde provoque une salinisation de l'horizon de surface du sol par la remontée capillaire (Slama, 2004).

c. Eau d'irrigation chargée

Traditionnellement, l'irrigation améliore la productivité (Tahi, 2008). Or, les problèmes de la salinité peuvent également se produire sur une terre irriguée, en particulier lors de l'utilisation de l'eau saumâtre ou saline pour l'irrigation (El-Zanaty et al., 2006). La qualité de l'eau est donc d'une importance capitale pour le sol et la plante. Elle est déterminée par ses composantes solubles, à savoir : la teneur totale en sels, la composition ionique et la présence d'oligo-éléments (El Mekkaoui, 1987). L'évaluation de Durand 1958 de la qualité des eaux d'irrigation de l'Algérie montre qu'une eau est considérée moyennement salée lorsque sa conductivité électrique est comprise entre 0,25 et 0,75 dS/m correspondant à une concentration de 0,2 à 0,5 g de sel par litre (Snoussi et Halitim, 1998).

d. Intrants agricoles

L'équilibre salin des sols peut être considérablement modifié par une contamination chimique qui se traduit par un apport d'engrais minéraux important sur de longues périodes (Thomas et Morini, 2005). Ceux-ci influencent la salinité du sol par l'action spécifique de chacun de leurs ions, ainsi que par les quantités solubilisées c'est-à-dire ionisées (Slama, 2004).

Comme tout amendement organique, le fumier, lors de son application, peut également augmenter la salinité du sol (Slama, 2004).

Les produits de traitement de la terre et des plantes (herbicides, fongicides et insecticides) agissent aussi sur la salinité du sol (Slama, 2004) et sur la qualité des ressources en eau superficielle et souterraine (FAO, 2002).

II.4. Classification des sols affectés par le sel

Selon la quantité et le type de sel disponible, les sols affectés sont divisés en trois groupes (El-Zanaty et al., 2006). La classification dépend des sels solubles totaux mesurés par la conductivité électrique (CE), le pH du sol et le pourcentage du sodium échangeable. Le tableau suivant récapitule les catégories.

Tableau 1 : classification des sols salés (El-Zanaty et al., 2006).

Classification	Conductivité électrique (mmhos/cm ou dS/m)	pH du sol	Sodium échangeable (%)
Salin	> 4.0	< 8.5	< 15
Sodique	< 4.0	> 8.5	> 15
Salin-sodique	> 4.0	< 8.5	> 15

Un sol est donc considéré salin quand sa conductivité électrique excède les 4 deciSiemens m^{-1} (équivalent à ~ 45 mM NaCl) (Abdul Wahid, 2004 ; Carillo et al., 2011). C'est le seuil proposé par le «*US Salinity Laboratory Staff*» en 1954 pour définir un sol salin (Tanji, 2002 ; Bois, 2005). Ce dernier est généralement marqué par l'apparition des efflorescences blanches en surface suite à la remontée du sel par le mouvement d'ascension capillaire (Soualmi, 2009).

II.5. Effets de la salinité sur la plante

La salinité affecte presque tous les aspects du développement de la plante : germination, croissance végétative et stade de reproduction (Chinnusamy *et al.*, 2006).

II.5.1. Sur la germination

La germination des graines qu'elles soient halophiles ou glycophiles, est affectée par la salinité (Debez, 2001). Le sel peut inhiber la germination de deux façons :

- En empêchant l'absorption d'eau par l'embryon, à cause du haut potentiel osmotique du milieu (Khan et Ungar, 1984 ; El Mekkaoui, 1987).
- Par l'empoisonnement de l'embryon, dû aux effets toxiques de certains ions (Khan et Ungar, 1984 ; Kozlowski, 1997).

II.5.2. Sur la croissance et le développement

Les niveaux élevés de sodium dans le sol empêchent la croissance des plantes et en conditions plus sévères elles ne peuvent pas survivre (Zhou *et al.*, 2007). La réponse immédiate du stress salin est la réduction de la vitesse de l'expansion de la surface foliaire (Wang et Nil, 2000). Souvent la salinité réduit davantage la croissance des tiges que celle des racines (Läuchli et Grattan, 2007) en supprimant l'initiation et l'expansion foliaires ainsi que la croissance des entre-nœuds et en accélérant l'abscission des feuilles.

De même, la salinité influence défavorablement d'autres aspects du développement notamment la floraison, la pollinisation, le développement du fruit, la qualité, et la production des graines (Kozlowski, 1997) ce qui se traduit souvent par une baisse du rendement (ONUAA, 1972 ; El Mekkaoui, 1987). Néanmoins, les différentes espèces diffèrent dans leur sensibilité au sel et dans leur tolérance au sel selon les divers stades du développement, les organes, les tissus et les cellules en question (Luna *et al.*, 2008).

II.5.3. Sur le statut hydrique

Le déficit hydrique de la plante dans les conditions salines est provoqué par le faible potentiel osmotique de la solution du sol (Manchanda et Garg, 2008) qui est tout d'abord perçu par la plante comme une forte diminution de la disponibilité en eau (Levigneron *et al.*, 1995). Par conséquent, les cellules se déshydratent et perdent leur turgescence (Al-Arbe, 2007 ;

Manchanda et Garg, 2008). Cette perte est la cause principale de l'inhibition de l'expansion cellulaire des plantes soumises au stress salin (Manchanda et Garg, 2008).

La diminution du flux d'eau à travers la plante montre que l'action du sel présente une similitude avec celle de la sécheresse physiologique (El Mekkaoui, 1987 ; Beritognolo et al., 2008).

II.5.4. Sur la nutrition minérale

Les concentrations salines trop fortes dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale des végétaux (Levigneron et al., 1995). Le sel agit, d'une façon indirecte, par la pression osmotique qu'il crée dans la rhizosphère et qui limite l'absorption de l'eau et des ions dissous, suivant le degré de sensibilité des plantes. Et, d'une façon directe, parce que le sodium entre en compétition surtout avec le potassium et le calcium, deux éléments de la nutrition des cultures et le chlore avec les anions minéraux alimentaires (Slama, 2004).

II.5.5. Sur le métabolisme cellulaire

En conditions salines du milieu de culture, il est possible de mettre en évidence l'influence du sel sur les activités métaboliques de la plante comme l'absorption de l'eau et des nutriments, la synthèse de protéines et d'acides nucléiques, l'accumulation de solutés organiques, ainsi que sur l'équilibre hormonale, le taux de respiration et de la photosynthèse (Levigneron et al., 1995).

II.6. Mécanismes de toxicité du chlorure de sodium

Les concentrations élevées du sodium dans les sols affectent la croissance des plantes par quatre mécanismes distincts. Premièrement, les niveaux élevés causent le stress osmotique. En second lieu, ils empêchent l'absorption du K^+ , nutriment major pour les plantes (stress nutritionnel). Troisièmement, Na^+ lui-même aux concentrations élevées est toxique aux enzymes cytosoliques (stress ionique). Enfin, l'excès du sel déclenche le stress oxydatif (Zhou et al., 2007).

II.6.1. Stress osmotique

L'effet initial et primaire de la salinité est dû à ses effets osmotiques (Munns, 2005). L'eau se déplace toujours du haut potentiel hydrique de la solution du sol vers le faible potentiel hydrique de la plante (Al-Arbe, 2007). En présence du sel dans le sol, le potentiel osmotique

de la solution diminue (Bois, 2005) et la plante réduit sa capacité à absorber l'eau, ceci mène aux réductions de la croissance. C'est l'effet osmotique ou l'effet du déficit hydrique de la salinité (Omami, 2005 ; Diédhiou, 2006 ; Zhu, 2007 ; Munns, 2009 ; Ondrasek et *al.*, 2011). Le stress osmotique ainsi imposé par la salinité provoque la perte de la turgescence des cellules (Manchanda et Garg, 2008 ; Munns, 2009) et la perturbation des activités normales des cellules (Xiong et Zhu, 2002). Cependant, le degré d'inhibition de la croissance dû à ce type de stress dépend de la réponse, du tissu et de l'espèce en question (Nawaz, 2007).

II.6.2. Stress ionique (cytotoxicité ionique)

En plus du stress hydrique, les concentrations élevées de Na^+ et de Cl^- dans le sol provoquent également le stress hyperionique ou toxicité ionique (Munns, 2005 ; Diédhiou, 2006). Celle-ci résulte de l'accumulation des ions spécifiques tels que le sodium et le Chlore dans le cytoplasme ou l'apoplaste (Subbarao et Johansen, 1999). En raison des propriétés ioniques semblables du Na^+ et du K^+ , les plantes ne peuvent pas bloquer efficacement l'entrée de sodium dans les cellules (Zhou et *al.*, 2007). Par conséquent, l'accumulation de Na^+ dans le cytoplasme perturbe les processus métaboliques de la plante et réduit sa croissance (Nawaz, 2010).

La réponse des plantes à l'effet toxique du sel diffère, cependant, entre les plantes sensibles et celles qui sont tolérantes à la salinité (Munns, 2005 ; Carillo et *al.*, 2011) (figure 3).

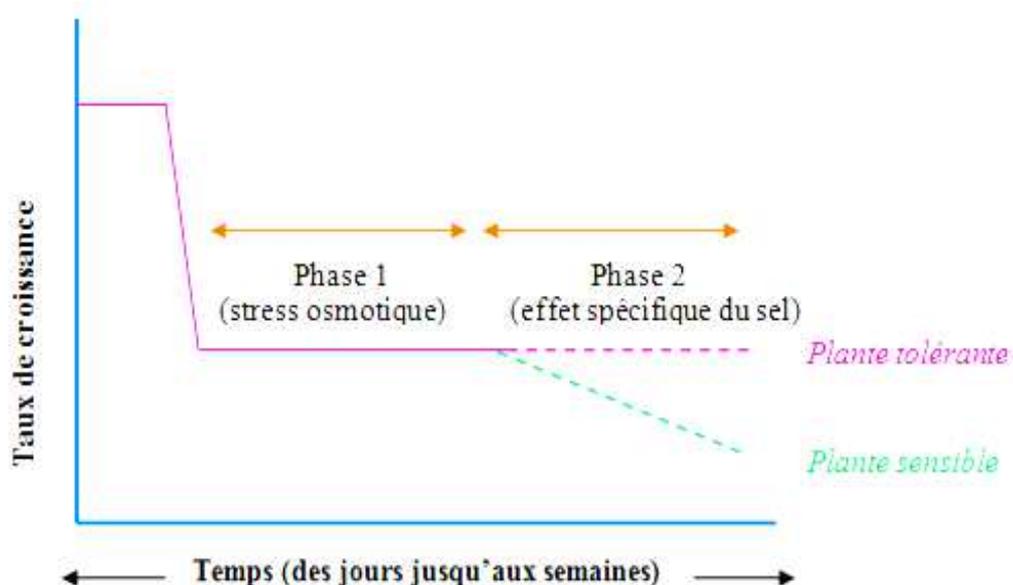


Figure 3. Schéma de la réponse biphasée de la croissance à la salinité (adapté de Munns (2005)).

II.6.3. Stress nutritionnel

En plus des effets toxiques spécifiques, la salinité peut induire des déséquilibres nutritionnels chez les plantes (François et Maas, 1999). En effet, l'absorption élevée du sel (NaCl) engendre une compétition avec l'absorption d'autres ions nutritifs (K^+ , Ca^+ , N, P,...), aboutissant ainsi à des perturbations nutritionnelles et par la suite à la réduction du rendement et de la qualité (Grattan et Grieve, 1999 ; Hasegawa et *al.*, 2000 ; Bonilla et González-Fontes, 2011).

Les ions K^+ et Ca^{2+} en particulier sont nécessaires pour le maintien de l'intégrité et le fonctionnement des membranes cellulaires (Nawaz, 2010). Concernant le K^+ , l'empêchement de son absorption par l'excès de Na^+ et de Cl^- mène à l'apparence des symptômes de carence en potassium qui entraîne un début de la chlorose et puis la nécrose (Nawaz, 2007). Toute déficience en cet élément conduit inévitablement à l'inhibition de la croissance (Zhu, 2002). De même, une carence en Ca^+ mène à la perturbation de l'intégrité membranaire (Nawaz, 2007, Manchanda et Garg, 2008) et limite la croissance et la fonction des racines (Grattan et Grieve, 1999).

II.6.4. Stress secondaire « oxydatif »

En sus du stress hydrique et du stress ionique, le stress salin à l'instar des autres stress environnementaux produit un stress secondaire appelé stress oxydatif (Diédhiou, 2006 ; Wrzaczek et *al.*, 2011), qui est causé par l'excès des espèces réactives d'oxygène « ROS » (Xiong et Zhu, 2002). Ces molécules sont le produit en partie de l'altération du métabolisme chloroplastique et mitochondriale pendant le stress. Elles incluent les ions superoxydes (O_2^-), les ions hydroxyles (OH.), et les radicaux peroxydes (RO.), ainsi que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Zahid, 2010). Ces molécules hautement actives provoquent des dommages oxydatifs au niveau des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques (Diédhiou, 2006 ; Pang et Wang, 2008). L'élimination du ROS est principalement réalisée par le système antioxydant de la plante (Xiong et Zhu, 2002).

En raison de leur nature fortement cytotoxique et réactive, l'accumulation des ROS doit être contrôlée (Shao et *al.*, 2008), elle dépend de l'équilibre entre la production et la dégradation cellulaires de ces molécules (Miller et *al.*, 2010).

La figure suivante résume les différents stress associés au stress salin :

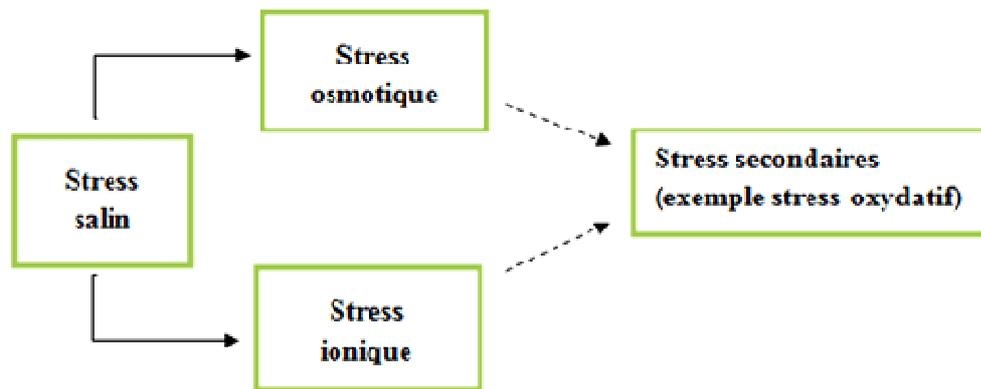


Figure 4. Schéma simplifié des mécanismes de toxicité du sel sur les plantes (adapté de Zhu *et al.*, 2001).

II.7. Perception du stress par la plante et transduction du signal

II.7.1. Perception du signal

Les conditions de stress abiotiques notamment la salinité constituent une source de signaux complexes pour les cellules. En effet, le stress serait perçu par des récepteurs membranaires qui initient un signal (Navarro, 2009). Les cellules végétales ne possèdent pas un récepteur spécifique d'un stress donné, mais plutôt un ensemble de récepteurs qui vont être sollicités par les différentes composantes du stress (Lemzeri, 2007). Pour le stress salin, il est perçu par les plantes en tant que stress osmotique et stress ionique (Chinnusamy *et al.*, 2006). Parmi les récepteurs identifiés :

➤ Canaux calciques

L'imposition du stress osmotique ou de la salinité fait apparaître une élévation transitoire du calcium cytoplasmique qui semble dériver des réserves intra et extracellulaire (Maathius *et al.*, 2007 ; Bonilla et González-Fontes, 2011). Le calcium ainsi induit possède une intensité de signal qui est corrélée avec le degré des conditions stressantes ; la membrane plasmique activerait des canaux ioniques (calciques) qui pourraient fonctionner comme des osmosenseurs permettant l'entrée initiale du calcium qui peut subséquent affecter les réserves internes (Maathuis *et al.*, 2007).

➤ **Histidines Kinases**

Les histidines kinases (HK) représentent un autre récepteur du stress identifié chez les bactéries et les plantes. Ces enzymes transmettent un signal externe vers l'intérieur de la cellule par un système de phosphorelais à 2 composants (deux régions trans-membranaires encadrant un domaine extra-cellulaire, un domaine donneur de phosphate et un domaine receveur de phosphate) (Chefdor, 2006 ; Wrzaczek et *al.*, 2011).

II.7.2. Transduction du signal

Suite à la perception du stress, le signal créé par les récepteurs doit être transmis à l'intérieur de la cellule. Cette transduction du signal est assurée par des messagers secondaires qui vont activer des voies enzymatiques assurant le fonctionnement de la cascade des réactions et permettant à la cellule de répondre au stress perçu (Vincent, 2006):

➤ **Le messager secondaire calcique (*calcium*)**

En plus de son rôle nutritionnel, le Ca^{2+} est utilisé en tant que messager secondaire dans l'ensemble des voies de transduction du signal dans la cellule (Cramer, 2002 ; Shi, 2007). Son élévation dans le cytosol constitue une réponse précoce à de nombreux stress environnementaux et le signal calcium est en fait ubiquitaire dans les voies de transmission du signal liées aux stress abiotiques (Knight et Knight, 2001). L'une des conséquences du signal induit par la libération primaire de (Ca^{+2}) sera la production d'autres seconds messagers qui eux-mêmes provoquent la libération interne de (Ca^{+2}) (Chae et *al.*, 2010). L'augmentation du calcium cytosolique est analysée par des senseurs calciques qui provoquent une cascade de phosphorylation donnant lieu à l'activation des gènes impliqués dans la réponse au stress (Navarro, 2009).

➤ **Voie Salt Overly Sensitive (*SOS*)**

Parmi les voies métaboliques activées par le calcium et qui participent à la transduction du signal, une des plus étudiées à l'heure actuelle, est la voie SOS (*Salt Overly Sensitive*) (Ishitani et *al.*, 2000). Les analyses moléculaires, génétiques et biochimiques ont mené à l'identification de trois composants principaux, à savoir, SOS3, SOS2 et SOS1, qui constituent une voie de signalisation pour la transmission du signal de Ca^{+2} , et du maintien de l'homéostasie ionique (Agarwal et Zhu, 2005) (figure 5).

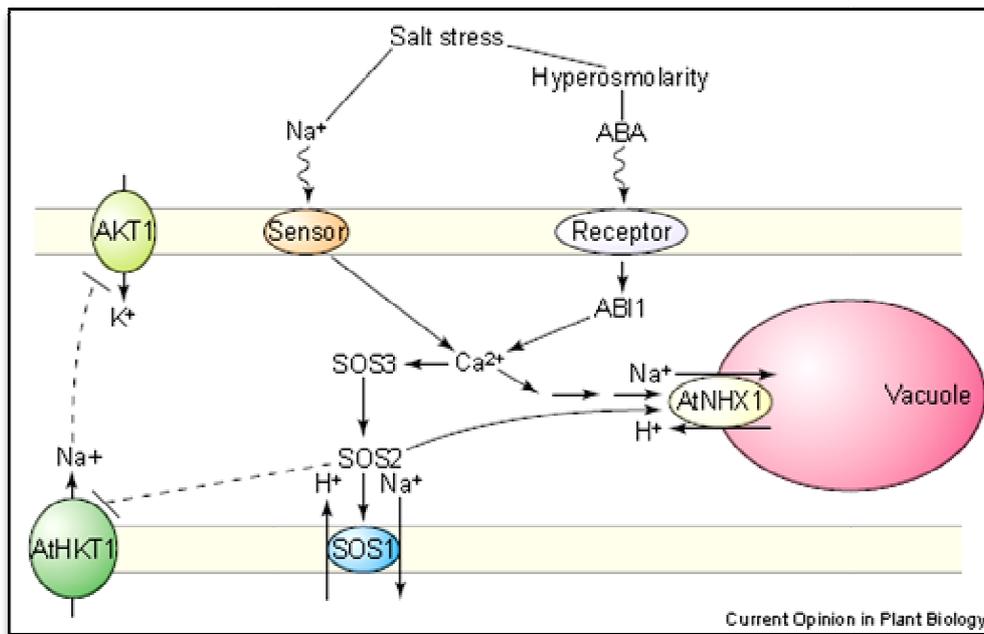


Figure 5. La voie SOS pour la régulation de l'homéostasie ionique pendant le stress salin (Zhu, 2003). Le signal du calcium induit par le stress salin est perçu par le senseur de Ca^{2+} « SOS3 », qui recrute une protéine kinase Serine/Thréonine « SOS2 » (Agarwal et Zhu, 2005) formant ainsi un complexe SOS3/SOS2. Lors de la réception du signal calcique, le complexe kinase phosphoryle les protéines cibles tel que « SOS1 ». Ce dernier assure l'antiport membranaire sodium/proton permettant le déplacement du sodium des cellules en pompant l'excès de Na^+ en dehors du cytosol (Zhu, 2002 ; Zhu, 2007).

➤ Protéines Kinases dépendantes du calcium (CDPKs)

Les CDPKs, une des plus grandes sous-familles des protéines kinases végétales, sont impliquées dans la signalisation des stress abiotiques notamment le stress salin (Agarwal et Zhu, 2005). Plusieurs chercheurs suggèrent que les CDPKs servent de médiateur pour les voies de signalisation des stress. Chez Arabidopsis, dont le génome code au moins 34 CDPKs (Xiong et al., 2002), une augmentation des niveaux de transcription de CDPK a été enregistrée lors d'un stress salin (Ludwig et al., 2003).

➤ Voies des MAPKinase

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) est l'une des molécules principales de la transduction du signal répondant aux divers stimuli externes chez les animaux, les plantes et les levures (Shi, 2007). Comme les CDPKs, les MAPKs sont en grand nombre chez les plantes (Agarwal et Zhu, 2005).

La cascade type de la voie des MAPKinases permet la propagation du signal en modulant l'activité de diverses protéines comme des facteurs de transcription ou d'autres protéines kinases (Kicka, 2005).

➤ Phospholipases

Pendant la réponse au stress, les phospholipides de la membrane plasmique produisent sous l'action de phospholipases une multitude de molécules signal (Ohnishi et al., 2008). Chez les plantes, ainsi que dans d'autres organismes, quatre classes principales des phospholipases sont distinguées selon leur site d'action au niveau du lipide : phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD), et phospholipase A1 et A2 (PLA1 et PLA2) (Bartels et Sunkar, 2005) (figure 6).

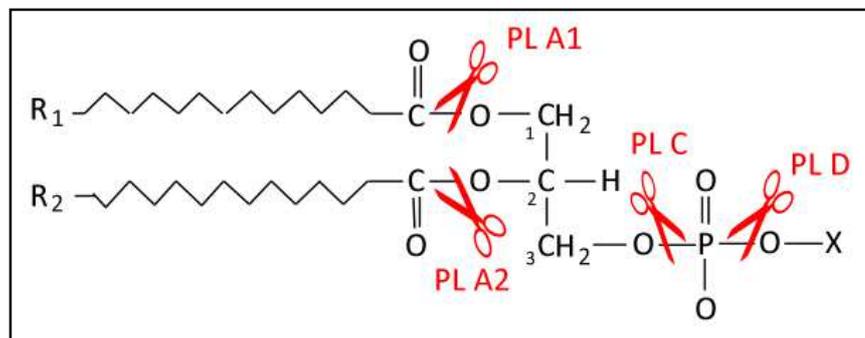


Figure 6. Représentation schématique des sites d'action des différentes phospholipases au niveau d'un phospholipide (www.wikipedia.org)

II.8. Tolérance des plantes au stress salin

Les notions d'adaptation, de tolérance et de résistance ne sont pas toujours claires, ces termes sont parfois employés de façon équivoque l'un à la place de l'autre.

II.8.1. Terminologie

➤ Résistance

La résistance d'une plante est un facteur inverse du milieu, par sa faculté de pouvoir se développer ou de demeurer vivante dans des conditions défavorables engendrées par ce facteur en maintenant son hydratation et son métabolisme cellulaire (Nemmar, 1983). Ainsi,

la résistance à la salinité s'exprime par la capacité d'une plante à survivre et à produire dans des conditions de stress (Piri et *al.*, 1994 ; Allaoui, 2006).

➤ Tolérance

La tolérance à la salinité est la capacité des plantes, d'accroître et d'accomplir leur cycle de vie avec un bon potentiel de rendement dans des conditions salines (Tardieu et Tuberosa, 2010) relativement à la croissance sous des conditions non-salines (Møller et Tester, 2007).

➤ Adaptation

À la différence d'un corps inanimé sous la contrainte d'une force, un organisme vivant est capable de s'adapter. L'adaptation n'est en réalité que la résultante de la tolérance aux contraintes. Une plante adaptée est donc celle qui tolère ou résiste à un stress donné (Fellah et *al.*, 2002), et grâce à ce processus les blessures peuvent se résorber et la résistance au stress se modifier (Arnholdt-Schmitt, 2004).

D'après Poljakoff-Mayber et Lerner (1999) une plante est considérée adaptée à la salinité quand au moins un des cas suivants se produit après le traitement : **a)** une augmentation du taux moyen de la croissance de la plante traitée au sel, de sorte que la croissance soit proche de celle de la plante témoin; ou **b)** quand la plante a acquis la capacité d'accomplir son cycle de vie dans un environnement salin. L'accommodation, l'adaptation et l'acclimatation sont utilisées comme synonymes dans la littérature.

II.8.2. Diversité génétique de la tolérance des plantes au sel

■ Les halophytes et les glycophytes

En termes de tolérance à la salinité, les plantes sont classées comme *Halophytes*, lorsqu'elles peuvent se développer et se reproduire sous une salinité élevée (> 400 mM NaCl), et *Glycophytes*, celles qui ne peuvent pas survivre dans des sols salés (Chinnusamy et *al.*, 2006).

La plupart des cultures sont des glycophytes plantes sensibles ou hypersensibles au sel (Sairam, 2004, Bonilla et González-Fontes, 2011). Celles-ci, évoluées dans des habitats pauvres en sodium, n'ont jamais possédé les mécanismes ou les dispositifs leur permettant de faire face aux déficits hydriques et aux niveaux élevés des ions qui dominent les sols salés (Carillo et *al.*, 2011). C'est ainsi que les glycophytes sont sévèrement inhibés ou même éliminés par les fortes concentrations de NaCl (100-200 mM) (Cosentino, 2008). Par contre

les halophytes, une flore native des environnements salins, ont la capacité de s'accommoder à la salinité extrême en raison des adaptations très spéciales (Hussain *et al.*, 2010 ; Carillo *et al.*, 2011). Leur tolérance est en fait associée à une grande variété d'adaptations morphologiques, anatomiques et biochimiques (Seaman, 2004 ; Lugan, 2008 ; Touchette *et al.*, 2009).

D'autres classifications catégorisent les plantes comme suit : tolérante, modérément tolérante, modérément sensible, et sensible tout en respectant leurs réponses à la salinité (Al-Arbe, 2007).

II.8.3. Principaux mécanismes d'adaptation au stress salin

II.8.3.1. Indicateurs phénologiques

L'adaptation de la plante au stress de la salinité implique des réponses phénologiques qui sont importantes pour l'adaptation à l'environnement salin (Botella *et al.*, 2005). Dans ces conditions de stress, les plantes ajustent les durées des phases phénologiques et le taux des processus développementaux, qui modifient la biomasse et la récolte (Chinnusamy *et al.*, 2007). De cette manière, elles accomplissent leur cycle de croissance et de développement durant la période la plus favorable de la saison de végétation (Dajic, 2006).

II.8.3. 2. Indicateurs morphologiques

De nombreux caractères morphologiques sont impliqués dans l'adaptation au stress (Maggio *et al.*, 2011).

1. Hauteur de la plante

La hauteur de la plante peut être considérée comme un critère de sélection important particulièrement dans les zones arides. Plusieurs auteurs dont Meziani *et al.* (1992) considèrent chez les céréales, que la tolérance est liée à l'augmentation de la hauteur de la paille et les sélectionneurs admettent que les céréales à paille haute sont présumées tolérantes.

2. Longueur et surface foliaire

L'élongation du limbe et l'importance de la surface foliaire, constituent les principales composantes de la production primaire chez les plantes. L'augmentation des surfaces foliaires dépend des processus physiologiques soumis aux contraintes environnementales (Noitsakis, 1988).

En conditions stressantes, la surface foliaire est généralement réduite. Cette réduction tend à augmenter la survie de la plante en minimisant les pertes d'eau par transpiration. Mais elle peut aussi diminuer le rendement à cause de la réduction de la capacité photosynthétique (Bouakel et Houassine, 1998).

Un autre type d'adaptation foliaire face au manque d'eau est l'enroulement de la feuille induisant une réduction de la transpiration (Monneveux et Belhassen, 1996).

3. Morphologie du système racinaire

A la différence des plantes soumises à la sécheresse qui augmentent généralement leurs systèmes racinaire, les plantes soumises à un stress salin semblent ne pas répondre au même stimulus. Chez les plantes de Chou exposées à des niveaux comparables de stress salin et de stress hydrique en terme de potentiel hydrique du sol, le rapport tige/racine diminue beaucoup moins dans le cas du stress salin (Maggio *et al.*, 2005). Il a été argué que les rapports faibles de tige/racine dans les environnement salins peuvent être mauvais puisque cette situation augmenterait l'accumulation des ions toxiques dans la tige (Dalton *et al.*, 1997). En conformité avec cette vue, il a été démontré chez le Citrus qu'un rapport réduit de racine/tige peut améliorer la tolérance (Moya *et al.*, 1999).

II.8.3. 3. Indicateurs physiologiques

1. Teneur en chlorophylles et capacité photosynthétique

L'augmentation de la salinité dans le milieu réduit le contenu total des plantes en chlorophylles et leur efficacité photosynthétique (Slatyer, 1973 ; Dajic, 2006 ; Xinwen *et al.*, 2008 ; Datta *et al.*, 2009 ; Ghassemi-Golezani et Taifeh-Noori, 2011). Le rapport chlorophylle (a/b) est un bon indicateur du seuil de tolérance au stress (Guettouche, 1990). La diminution des pigments chlorophylliens est corrélée à l'intensité du stress et dépend de l'espèce (Lemzeri, 2007).

Un certain nombre d'études ont montré que la capacité photosynthétique chez différentes espèces est réduite sous l'effet de la salinité suite à l'accumulation élevée des ions Na^+ et Cl^- au niveau des feuilles. Cette réduction de la photosynthèse peut être liée à des limitations stomatiques (fermeture partielle des stomates) à une limitation dans le transport photosynthétique d'électron ou bien à la combinaison des deux (Nawaz *et al.*, 2010 ; Zhang *et al.*, 2010). La cinétique de la fluorescence chlorophyllienne est utilisée généralement pour étudier les effets des stress abiotiques sur le rendement de la photosynthèse (Krause et Weis,

1991 ; Clavel *et al.*, 2005). Elle est principalement l'outil de diagnostic de l'état fonctionnel du photosystème II en conditions de stress salin (Bouaouina *et al.*, 2000).

2. Potentiel hydrique

Dans les sols salins, bien que l'eau soit présente elle est indisponible pour les plantes puisqu'elle est retenue par les ions du sol (comme le Na⁺ et le Cl⁻). Dans ces conditions, la plante présente une réponse osmotique, réduisant le potentiel hydrique (ψ_w) de ses cellules en diminuant le potentiel osmotique et en réduisant la pression de la turgescence. Ainsi, le potentiel hydrique devient relativement négatif par rapport au sol, assurant de ce fait l'absorption de l'eau (Pérez-López *et al.*, 2009). La teneur relative en eau ou «*Relative Water Content* (RWC) » est considérée comme un bon indicateur du statut hydrique de la plante (Li *et al.*, 2007).

II.8.3.4. Indicateurs biochimiques

1. Ajustement osmotique (synthèse des solutés compatibles)

L'un des phénomènes les plus décrits concernant les réponses au stress osmotique est l'accumulation de solutés organiques dits compatibles, contribuant ainsi à l'ajustement osmotique (AO) entre les compartiments cellulaires et avec le milieu extérieur (Lugan, 2008 ; Ghassemi-Golezani et Taifeh-Noori, 2011). Au niveau cellulaire, lorsque le potentiel hydrique foliaire décroît, ce mécanisme permet de maintenir le potentiel de turgescence et la conductance stomatique grâce à une accumulation intracellulaire de ces solutés compatibles (Clavel *et al.*, 2005 ; Attia, 2007 ; Poormohammad Kiani, 2007).

Les solutés compatibles sont des métabolites hydrophiles susceptibles de s'accumuler et donc *à priori* non perturbateurs des processus cellulaires (Lugan, 2008). Beaucoup de composés peuvent être impliqués dans l'ajustement osmotique : les ions inorganiques, tels que le sodium, le potassium et le chlore (Pugnaire *et al.*, 1999), et les osmolytes organiques à faible poids moléculaire : des sucres et leurs dérivés tels que le sucrose, les polyols et les hétérosides, des composés tertiaires N méthylés tel que la glycine bêtaïne et le homarine, et des acides aminés tels que la proline et le glutamate (Jakobsen *et al.*, 2007).

1.1. Accumulation de la proline

La recherche étendue a révélé que l'accumulation de la proline est une réponse universelle des plantes stressées (Heuer, 1999 ; Burritt, 2012). En effet depuis le premier rapport sur

l'accumulation de la proline chez le rye grass vivace (*Lolium perenne*), de nombreuses études ont prouvé que le contenu en proline chez les plantes supérieures augmente sous les différents stress environnementaux (Szabados et Saviouré, 2009). Elle s'accumule généralement dans le cytosol (Miller et *al.*, 2010) durant les conditions de sécheresse, de salinité élevée, de lumière intense, des radiations UV, des métaux lourds, du stress oxydatif et aussi en réponse à un stress biotique (Shinozaki, 2001 ; Szabados et Saviouré, 2009 ; Burritt, 2011).

Cette accumulation est due principalement à sa synthèse *de novo*, mais aussi à la réduction de son catabolisme (Ábrahám et *al.*, 2003 ; Kavi Kishor et *al.*, 2005), et aux systèmes de transport spécifiques (Bouzid, 2009).

Quelques rapports ont indiqué une corrélation positive entre l'accumulation de proline et la tolérance au stress (Shinozaki, 2001 ; Jithesh, 2006). Cependant, dans d'autres rapports, on a suggéré que l'augmentation du niveau de proline à l'état libre est simplement un résultat du stress (Shinozaki, 2001), que ce n'est pas une réaction d'adaptation au stress, mais plutôt le signe d'une perturbation métabolique (Hanson et *al.*, 1990). Donc cette corrélation n'est pas toujours évidente (Szabados et Saviouré, 2009).

1.2. Accumulation des sucres solubles

Les hydrates de carbones comme les sucres (le glucose, le fructose, le saccharose et le fructane) s'accumulent souvent sous l'effet du stress salin (Parida et *al.*, 2002). Les variétés tolérantes au sel accumulent généralement plus de sucres solubles que les variétés sensibles. Les sucres accumulés, peuvent servir de composés solubles compatibles pour l'ajustement osmotique (Ashraf et Harris, 2004) en intervenant dans la stabilisation des protéines et des membranes (Ramel, 2009). Ils peuvent aussi agir en tant que signal métabolique en réponse au stress (Gupta et Kaur., 2005 ; Chaves et *al.*, 2009).

2. Protéines de stress

Différentes classes de protéines sont synthétisées dans des conditions du stress salin comme les Osmotines, les Dehydrines, les protéines LEA (*late embryogenesis abundant*) et les polyamines principalement Putrescine et Spermine (Tester et Davenport, 2003 ; Dajic, 2006).

Les protéines LEA sont fortement accumulées pendant la maturation des graines et dans les tissus végétatifs exposés aux stress hydrique, salin et au froid (Clemente et Mitra, 2004 ; Aberlenc-Bertossi et *al.*, 2006 ; Tunnacliffe et Wise, 2007). Les LEA sont considérés comme des molécules chaperonnes (Le et *al.*, 2011). Elles seraient impliquées dans le

maintien des composants cellulaires, dans la prévention du dépliement et de la dénaturation des protéines et dans la protection des activités enzymatiques (Aberlenc-Bertossi et *al.*, 2006 ; Le et *al.*, 2011). Elles interviendraient dans la séquestration d'ions et la renaturation de protéines (Lefebvre, 2005).

Lors des stress abiotiques notamment le stress salin, qui sont à l'origine de dysfonctionnements protéiques, la plante va également activer de nombreux gènes permettant d'accumuler les protéines HSPs (*Heat-shock proteins*) (Chaumeil, 2006). Celles-ci permettent de maintenir les protéines dans leurs conformations fonctionnelles, le repliement des protéines dénaturées et d'empêcher l'agrégation des protéines d'origine étrangère (Timperio et *al.*, 2008 ; Toivonen et Hodges, 2011). Les HSPs semblent avoir une fonction centrale dans la protection des tissus végétaux contre le stress par le maintien de l'homéostasie cellulaire (Toivonen et Hodges, 2011).

3. Gestion du stress oxydatif (Induction des enzymes antioxydantes)

Pour se protéger contre l'effet toxique des molécules actives d'oxygène, les plantes sont dotées d'un système antioxydant qu'on peut subdiviser en deux classes (Djebali, 2008) :

- Le système antioxydant *non enzymatique*, qui est formé par des composants de faible poids moléculaire tel que l'ascorbate, le glutathion, le tocophérol (Xu et Shen, 1999 ; Xu et *al.*, 2009). D'autres antioxydants existent aussi comme les caroténoïdes, les flavonoïdes, le mannitol, la glycine bêtaïne et la proline (Hamilton et Heckathon, 2001 ; Muschitz, 2009).

- La deuxième classe du système antioxydant comporte un ensemble d'*enzymes antioxydantes* principalement les superoxyde dismutase [SOD], les catalase [CAT], la gaïacol peroxydase [POX] et l'ascorbate peroxydase [APX] (Hanaa, 2004 ; Chinnusamy et *al.*, 2006 ; Djebali, 2008 ; Muschitz, 2009 ; Xu et *al.*, 2009 ; Zahid, 2010). Chez les plantes, la SOD existe sous différentes isoformes les SOD à manganèse ou Mn-SOD (mitochondrie), les SOD à cuivre-zinc ou Cu/Zn-SOD (cytoplasme) et enfin les SOD à fer ferreux ou Fe-SOD (chloroplaste) (Reilly et *al.*, 2003 ; Remon, 2006).

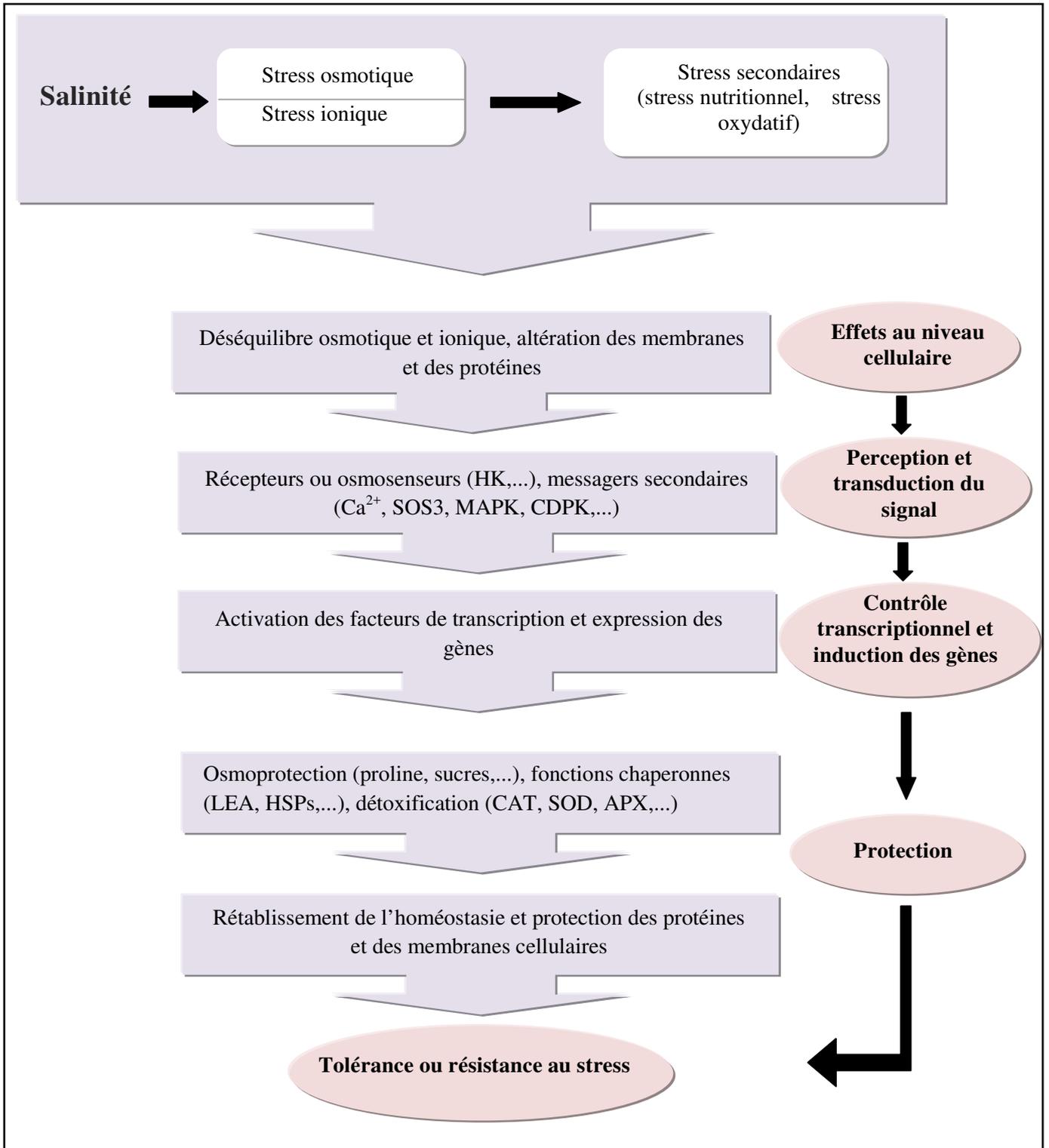


Figure 7. Schéma global de la signalisation du stress salin et des réponses induites au niveau cellulaire (adapté de Wang et *al.*, 2003).

III. Proline

III. 1. Historique

La proline a été découverte en 1900 par Willstetter au cours d'un dosage de l'ornithine. Elle a été extraite pour la première fois des hydrolysats acides de caséine par Emil Fischer en 1901. Depuis, on s'intéresse à son rôle aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (Nemmar, 1980). Sa fonction osmoprotectrice a été découverte en premier chez les bactéries (Székely et al., 2008 ; Szabados et Savoré, 2009 ; Petrolino, 2010) particulièrement chez *Salmonella oranienburg* par Christian en 1955 (Sleator et Hill, 2001). Chez les végétaux, la proline a été observée sous l'action de la sécheresse en 1969 par Hubac et ses collaborateurs, sous l'action du froid par Paquin en 1977, sous l'action du sel en 1979 par Tal et son équipe, ainsi que chez les plantes halophytes en 1965 par Goas (Nemmar, 1983). En général, elle s'accumule dans la plante lorsque l'équilibre métabolique de celle-ci est perturbé par une condition défavorable (Nemmar, 1983).

La proline est probablement l'osmolyte le plus largement distribué non seulement chez les végétaux mais aussi dans beaucoup d'autres organismes (Manchanda et Garg, 2008).

III.2. Propriétés de la proline

La proline ou acide pyrrolidine 2-carboxylique ($C_2H_9O_2N$) est l'un des vingt principaux acides aminés naturels qui entrent dans la constitution des protéines. Son poids moléculaire est de 115 g (Nemmar, 1980). C'est un *imino-acide* qui est un acide aminé possédant son groupement azoté sous la forme d'amine secondaire. Il comporte un radical NH au lieu du radical NH_2 des autres acides aminés (Nemmar, 1983) (figure 8).

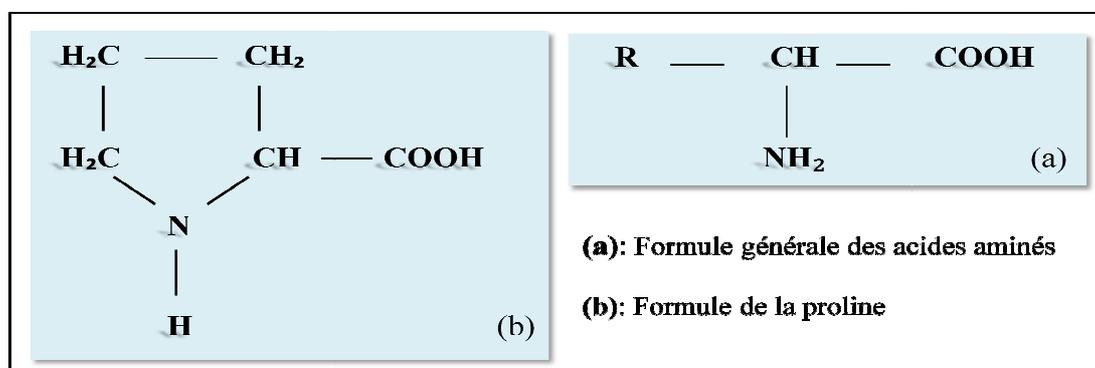


Figure 8. Illustration de la formule générale de l'acide aminé proline (Nemmar, 1983).

III.3. Implications métaboliques de la proline dans le développement de la plante

En tant qu'acide aminé libre et composant des protéines, la proline est essentielle pour le métabolisme primaire (Silva *et al.*, 2011 ; Burritt, 2012). Elle joue un rôle important dans le développement de l'embryon et de la graine, dans l'élongation de la tige, dans la morphologie cellulaire et dans les transitions développementales (de la croissance végétative à la floraison) (Hare *et al.*, 2001 ; Burritt, 2012). Des niveaux élevés de proline ont été trouvés au niveau des fleurs spécialement dans les grains de pollen (Hare *et al.*, 2001 ; Kavi Kishor *et al.*, 2005) et les niveaux les plus bas sont enregistrés dans les racines (Hare *et al.*, 2001). Il a été rapporté qu'un faible contenu en proline dans les plantes d'*Arabidopsis* entraîne des anomalies dans la morphologie des feuilles, des problèmes dans la floraison et un caractère mortel embryonnaire. De telles anomalies peuvent être corrigées par l'application exogène de cet acide aminé (Székely *et al.*, 2008 ; Petrollino, 2010). Il a été fréquemment montré que la proline augmente la différenciation *in vitro* du tissu des explants de plusieurs espèces (Hare *et al.*, 2001). Chez les légumineuses, la proline sert de source accessible d'énergie dans les nodules lors d'interaction des plantes avec les microorganismes symbiotiques (Petrollino, 2010).

III.4. Métabolisme de la proline

III.4.1. Biosynthèse de la proline

III.4.1.1. Voie de biosynthèse de proline à partir du glutamate

Les feuilles sont le site principal de la synthèse de la proline (Monreal *et al.*, 2007) qui a lieu au niveau du cytoplasme (Parida *et al.*, 2008). La proline est synthétisée principalement à partir du glutamate qui est réduit en glutamate-semialdéhyde (GSA) par l'enzyme bifonctionnelle pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS), et converti spontanément en pyrroline-5-carboxylate (P5C) (Deuschle *et al.*, 2004 ; Szabados et Saviouré, 2009). Ce produit intermédiaire P5C est ensuite réduit en proline par l'enzyme 1-pyrroline-5-carboxylate réductase (P5CR) (Ábrahám *et al.*, 2010). Cette voie semble être la prédominante particulièrement dans des conditions de stress (Manchanda et Garg, 2008) (figure 9).

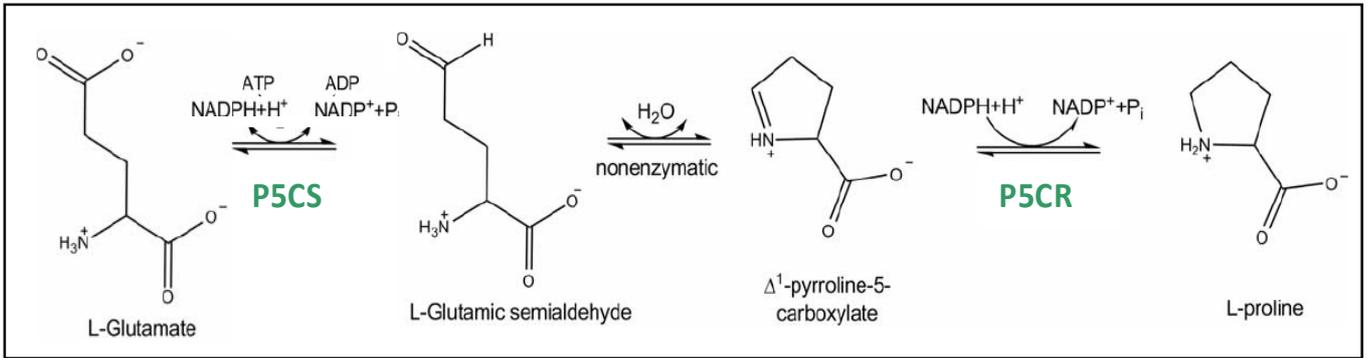


Figure 9. Illustration de la voie de biosynthèse de proline dérivée du glutamate (White, 2007).

III.4.1.2. Voie de biosynthèse de la proline à partir de l'ornithine

La proline peut être synthétisée via une deuxième voie faisant intervenir l'ornithine (Kiyosue et *al.*, 1996). L'ornithine est directement transaminé par l'ornithine α -aminotransférase (OAT) en Glutamate-semialdehyde (GSA), qui est plus tard converti en proline par l'intermédiaire de la pyrroline-5-carboxylate (P5C) (Kavi Kishor et *al.*, 2005 ; Miller et *al.*, 2009). Cette réduction de P5C vers la proline a lieu au niveau du cytosol ou du chloroplaste (Tsai et *al.*, 2010) (figure 10).

La formation du GSA/P5C à partir de l'ornithine a été postulée pour constituer une voie alternative de la synthèse et de l'accumulation de la proline (Funck et *al.*, 2008).

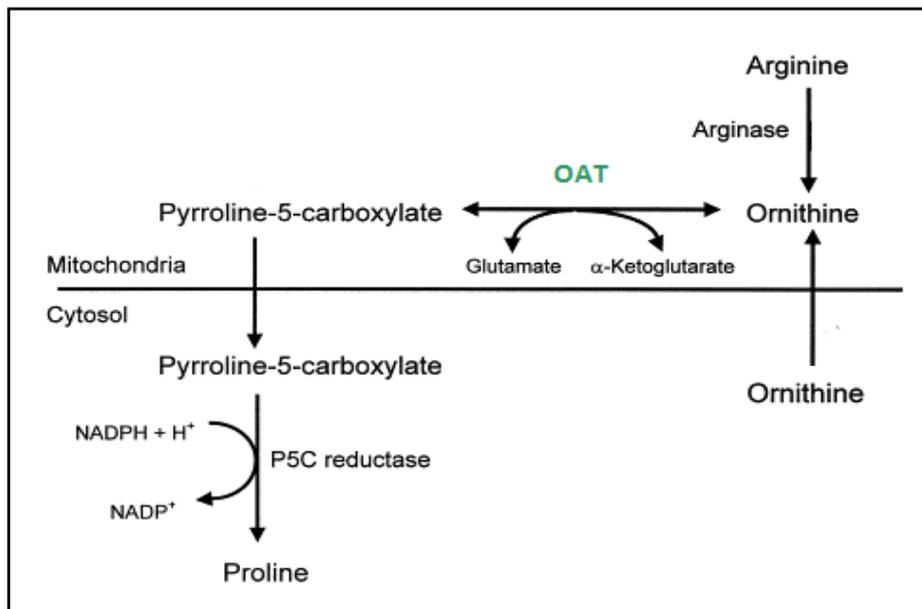


Figure 10. Illustration de la voie de biosynthèse de proline dérivée du glutamate (Davis et Wu, 1998)

Les principales enzymes qui interviennent dans la biosynthèse de la proline sont les suivantes:

■ **Pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS)** dont l'activité représente une étape principale et limitative de la biosynthèse de la proline (Kiyosue et *al.*, 1996 ; Deuschle et *al.*, 2004 ; Ábrahám et *al.*, 2010). Beaucoup d'études assument une localisation cytoplasmique de la P5CS (Verslues et Sharma, 2010). Le début d'accumulation de la proline induite par un stress est corrélée avec l'activation transcriptionnelle du gène codant P5CS (Yang et *al.*, 2009).

■ **Pyrroline-5-carboxylate réductase (P5CR ou P5R)**

L'enzyme P5CR semble être en majeure partie localisée dans le cytosol, alors qu'une certaine activité est également associée au plaste (Funck et *al.*, 2010). L'analyse génomique a prouvé qu'il existe 2 à 3 copies du gène codant cette enzyme (P5CR) dans le génome du soja.

■ **Ornithine α -aminotransférase (OAT)**

Comme pour la P5CS, l' α -OAT est une enzyme limitative de la voie de biosynthèse de la proline à la différence que cette dernière n'est pas inhibée par feedback par la proline (Liangqi et *al.*, 2003). Elle est localisée au niveau des mitochondries (Verbruggen et Hermans, 2008). L'analyse de l'activité enzymatique de l'OAT dans les extraits d'*Arabidopsis* soumis au stress salin montre que celle-ci est doublée dans les premières 24 heures sous l'effet du sel et qu'elle continue d'augmenter avec le temps (Verslues et Sharma, 2010).

III.4.2. Catabolisme de la proline

Dans la voie catabolique, la proline est oxydée en glutamate en deux étapes au niveau des mitochondries (Ábrahám et *al.*, 2010). Ce catabolisme est réprimé sous l'effet d'un stress osmotique, mais une fois le stress passé, la proline est oxydée en Pyrroline-5-Carboxylate (P5C) par la proline déshydrogénase (PDH) également connue sous le nom de proline oxydase (POX). La P5C est alors convertie en glutamate par l'enzyme P5C déshydrogénase (P5CDH). L'enzyme PDH est liée à la membrane interne des mitochondries (Kavi Kishor et *al.*, 2005), et elle peut être induite par les hautes concentrations de proline (Heuer, 1999) (figure 11).

III.5. Impact de la salinité sur l'accumulation de la proline

L'accumulation de la proline est l'une des manifestations les plus remarquables du stress salin (Parida *et al.*, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2012). Cette accumulation dans la cellule est très rapide (Forlani *et al.*, 1997 ; Silva *et al.*, 2011). Une forte corrélation entre les niveaux cellulaires accrus de la proline et la capacité de survivre à un déficit hydrique et aux effets d'une salinité environnementale élevée a été enregistrée (Sairam et Tyagi, 2004 ; Parida *et al.*, 2008). Toutefois, son rôle dans la résistance au stress salin n'est pas encore élucidé. Il peut s'agir d'un osmoticum dont l'accumulation cytoplasmique permet de neutraliser les effets ioniques et osmotiques du sel accumulé dans la vacuole (Bois, 2005) tout en facilitant son exclusion des sites métaboliques (Lemzeri, 2007). En outre, la proline est connue pour induire l'expression des gènes responsables de la réponse au stress salin (Ashraf et Foolad, 2007).

III.6. Rôles de la proline endogène durant le stress

Plusieurs rôles ont été assignés à l'accumulation de la proline (Sankhla *et al.*, 2006).

III.6.1. Ajustement osmotique

La proline est connue pour son rôle osmoprotectant (Verbruggen *et al.*, 1996 ; Forlani *et al.*, 1997 ; Garcia *et al.*, 1997 ; Szekely, 2004 ; Taji *et al.*, 2004 ; Hoque *et al.*, 2007) ; son accumulation réduit le potentiel osmotique des cellules tout en permettant le maintien de leur turgescence (Jefferies, 1981 ; Dreier, 1983 ; Handa *et al.*, 1986 ; Heuer, 2003 ; Omami, 2005 ; Verslues et Sharma, 2010). Elle peut contribuer pour plus de 39 % à l'ajustement osmotique dans les compartiments cytoplasmiques des feuilles (Carillo *et al.*, 2011).

III.6.2. Protection de la structure cellulaire pendant la déshydratation

Sous les conditions du stress, la proline joue un rôle dans la protection de la structure subcellulaire (membranes, protéines) (Shinozaki, 2001 ; Burritt, 2012). Quand la teneur cellulaire en eau diminue, cet osmolyte ainsi que quelques protéines (tels que les LEA) peuvent agir en tant que « substituts hydriques » pour stabiliser la structure des cellules par les interactions hydrophiliques (Verslues et Sharma, 2010). C'est grâce à ces propriétés que la proline peut s'accumuler à des niveaux élevés sans perturber la structure cellulaire, d'où son accumulation préférentielle dans le cytoplasme. Elle est impliquée, par exemple, dans la stabilisation de certaines enzymes telle que la RubisCO (Hoque *et al.*, 2007).

III.6.3. Source d'énergie et régulateur du potentiel redox

La proline sert de source rapide et accessible d'énergie pour la plante. Il est à signaler que l'oxydation d'une seule molécule de proline rapporte 30 molécules d'ATP (Kavi Kishor et *al.*, 2005). Cet acide aminé est proposé comme une source de pouvoir réducteur (Bartels et Sunkar, 2005), de carbone et d'azote qui sont fournis par sa dégradation lors de la récupération après le stress (Tal et *al.*, 1979 ; Jefferies, 1981 ; Hare et *al.*, 1998 ; Gerdakaneh et *al.*, 2010).

La régulation entre la synthèse et la dégradation de la proline peut alléger les déséquilibres dans les états redox cellulaires (Verslues et Sharma, 2010). Le NAD(P)H est utilisé lors de la synthèse de proline dans le cytosol ou dans le chloroplaste, tandis que son catabolisme permet de libérer le réductant NADH dans les mitochondries. La proline agit donc comme réservoir d'énergie (NADPH) pour la régulation des potentiels redox (Szekely, 2004 ; Yazici et *al.*, 2007 ; Parida et *al.*, 2008).

III.6.4. Détoxification des espèces réactives d'oxygène

En raison de ses propriétés chimiques, la proline a une capacité élevée de réprimer les radicaux libres notamment l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et les radicaux hydroxyl (OH^\cdot) (Burritt, 2012 ; Ivanov et *al.*, 2012). Cela offre des possibilités de réduire les dommages oxydatifs des macromolécules cellulaires essentielles (protéines, ADN, lipides). La proline intervient aussi dans la protection des membranes cellulaires contre le stress oxydatif par l'augmentation de l'activité de divers antioxydants (Ashraf et Foolad, 2007). Elle joue ainsi un rôle critique dans la protection de l'activité photosynthétique et des membranes thylacoïdales contre les dommages des radicaux libres en conditions de stress salin (Kavi Kishor et *al.*, 2005). Certains auteurs considèrent que ce rôle non osmotique de la proline est le plus important pour l'augmentation de la tolérance au stress (Verslues et Sharma, 2010).

III.6.5. Transmission du signal

La proline peut également jouer le rôle d'une molécule signal lors d'un stress, influençant les réponses adaptatives (Verbruggen et Hermans, 2008). En effet, le transport de la proline entre les différentes parties de la plante peut servir de signal métabolique (Verslues et Sharma, 2010).

III.7. Transport de la proline pendant le stress

La compartimentation complexe du métabolisme de la proline suppose des mouvements intracellulaires de la proline. Des essais sur le transport, employant les mitochondries isolés du blé, ont montré l'existence d'un importateur mitochondrial de proline ainsi qu'un échangeur de proline-glutamate. Cependant, les gènes codant leurs activités n'ont été identifiés chez aucune plante (Verslues et Sharma, 2010). Bien que les données récentes supportent la synthèse de la proline dans le chloroplaste des plantes stressées (Szabados et Savoré, 2009), le transport de la proline au niveau de l'enveloppe chloroplastique n'est pas encore élucidé (Verslues et Sharma, 2010).

Parallèlement, plusieurs travaux soutiennent le mouvement intercellulaire de la proline (Verslues et Sharma, 2010). Ueda et *al.* (2006) ont noté que la proline pénètre dans les cellules par des transporteurs tels que le transporteur de proline (avec une grande affinité), le transporteur d'acides aminés (avec une faible affinité) ou par les transporteurs de protéines. Chez *Arabidopsis*, huit différents clones de transporteurs d'acides aminés ont été isolés et caractérisés. Deux de ceux-ci codent pour les transporteurs spécifiques de la proline (*Pro T*). En général, les mouvements de la proline (exportation ou importation) sont augmentés dans les conditions du stress notamment le stress salin (Kavi Kishor et *al.*, 2005).

III.8. Génie génétique et tolérance au sel

Les efforts dans la manipulation génétique entraînant une accumulation accrue de la proline dans le but d'augmenter la tolérance des plantes au stress ont commencé après le clonage des premières enzymes (Petrollino, 2010). Mais les résultats obtenus sont quelque peu ambigus car l'accumulation de la proline n'est pas toujours associée à une amélioration de la tolérance. En effet dans quelques rapports, l'augmentation du niveau de proline dans les plantes transgéniques est corrélée avec l'amélioration de la tolérance au stress (Kavi Kishor et *al.*, 1995 ; Nanjo et *al.*, 1999a ; Hmida-Sayari et *al.*, 2005) ; alors que dans d'autres une telle corrélation n'apparaît pas (Liu et Zhu, 1997 ; Nanjo et *al.*, 1999b ; Mani et *al.*, 2002). Cette absence de corrélation est liée à la non obtention dans les plantes génétiquement modifiées, de quantités protectrices de proline (Ashraf et Foolad, 2007 ; Ozden et *al.*, 2009). De plus, dans certaines études la tolérance au stress inchangée par la manipulation génétique est accompagnée par un développement anormal de la graine et de la plante et d'une augmentation de l'hypersensibilité des plantes transgéniques vis-à-vis de la proline.

La complexité dans la régulation du métabolisme de proline et de ses fonctions multiples peut expliquer les difficultés de l'amélioration de la tolérance des plantes par la modification de l'expression des gènes impliqués dans ce métabolisme (Szabado et Savoré, 2009). D'après Winicov (1998), la tolérance au sel est un trait complexe chez les plantes. La création de plantes transgéniques qui surexpriment un gène codant une seule fonction peut ne pas être suffisante pour induire une adaptation optimale à l'environnement salin.

Par conséquent, la technique du génie génétique est rendue marginale suite aux résultats contradictoires obtenus (Petrollino, 2010). C'est ainsi que les chercheurs se sont intéressés à une approche alternative qui est l'utilisation de la proline exogène. Par exemple, Kavi Kishor et *al.* (1995) ont produit le tabac transgénique exprimant le P5CS de *Vitis aconitifolia*. Les plantes ont accumulé plus de proline que le type sauvage, mais le phénotype obtenu ne correspondait pas aux résultats de mesure du statut hydrique. Verslues et Sharma (2010) rapportent également que l'augmentation ou la diminution du niveau de la ProDH dans les plantes transgéniques sense et anti-sense d'*Arabidopsis* et du riz a mené respectivement à 50 % la réduction et 25 % l'accroissement de la teneur en proline. Cependant, le changement du contenu de proline n'a montré aucune corrélation avec l'osmotolérance.

III.9. Application exogène de la proline et son rôle vis-à-vis du stress salin

L'approche de l'application exogène de la proline ou le « *Shot-Gun* » a gagné une certaine attention suite aux nombreux exemples qui rapportent la réussite de l'application des solutés compatibles en général pour améliorer la croissance, la survie et la tolérance des plantes au stress (Ashraf et Foolad, 2007 ; Hamdia et Shaddad, 2010).

Il a été rapporté que l'apport exogène de la proline protège les plantes soumises à un stress abiotique (Manchanda et Garg, 2008), et elle peut jouer un rôle important dans l'augmentation de leur tolérance (Athar et *al.*, 2009 ; Hamdia et Shaddad, 2010) et dans l'amélioration de leur productivité (Posmyk et Janas, 2007).

En présence du sel, cette application allège les effets néfastes du sel par la stimulation de la croissance des cellules et celle de la plante, par l'amélioration du métabolisme et par la réduction de l'oxydation des lipides membranaires (Nawaz, 2007). De plus, elle confère une osmoprotection aux plantes stressées (Hamdia et Shaddad, 2010). Elle assure en réalité le maintien des activités enzymatiques et la haute régulation de plusieurs protéines telles les

déhydrines responsables de la réponse au stress salin (Ashraf et Foolad, 2007 ; Hoque et *al.*, 2008).

Cet apport externe de proline est une approche alternative de l'augmentation du niveau de la proline endogène qui sert vraisemblablement comme un tampon compatible et osmotique dans le cytoplasme contre les fortes concentrations vacuolaires des ions (Mohamed et *al.*, 2007). L'élévation du niveau de la proline endogène ainsi induite chez les plantes traitées avec de proline exogène peut augmenter alors leur capacité osmorégulatrice (Aggarwal et *al.*, 2010). En outre, l'apport de la proline exogène s'est avérée très efficace dans l'augmentation de la détoxification des espèces réactives d'oxygène (telle que H₂O₂) par l'augmentation de l'activité de la catalase et de la peroxydase dans les conditions de stress salin (Hoque et *al.*, 2007 ; Posmyk et Janas, 2007 ; Hoque et *al.*, 2008).

Beaucoup de travaux réalisés sur diverses espèces ont démontré l'effet améliorateur de cette méthode dans les conditions salines. Par exemple, l'addition exogène de la proline pour les cultures d'embryons d'orge soumises aux conditions salines a diminué l'accumulation des ions Na⁺ et de Cl⁻ et a augmenté l'élongation des tiges et la croissance en général (Lone et *al.*, 1987). De même, la pulvérisation foliaire de ce soluté organique a contrecarré l'inhibition de la croissance induite par NaCl chez le blé, la tomate, le colza et le maïs (Athar et *al.*, 2009). Cet effet a été attribué à la capacité de la proline de diminuer la charge du sel au niveau de la feuille (Heuer, 1999 ; Heuer, 2003) et la stabilisation des systèmes membranaires (Posmyk et Janas, 2007 ; Aggarwal et *al.*, 2010). Elle a permis l'augmentation de la discrimination entre K⁺ et Na⁺ lors du transport vers les tiges et une meilleure exclusion du sel des tiges avec une rétention au niveau des racines (Heuer, 1999).

Cependant, le souci lié à l'utilisation de la proline exogène réside dans la concentration efficace à apporter. Différentes études suggèrent que les concentrations optimales de la proline sont dépendantes des espèces et du génotype ; celles ci doivent être déterminées a priori pour améliorer la tolérance de la plante au stress. Les concentrations optimales - variables selon les espèces - sont celles qui font augmenter les niveaux cellulaires de potassium et réduisent ceux de sodium et du Chlore (Heuer, 1999).

Chez le niébé (*Vigna unguiculata*), par exemple, il a été observé que l'addition de 20 - 33 mM de proline aux cultures de cellules atténuait les effets nuisibles du NaCl, et que les concentrations de 50 mM ou plus étaient inhibitrices de la croissance des cultures stressées et

non stressées. Dans cette étude, alors que les teneurs cellulaires de Na^+ et Cl^- diminuent lorsque la proline atteint la concentration optimale, elles augmentent en revanche avec l'élévation de la concentration de proline exogène (Ashraf et Foolad, 2007). Dans les cultures de cals de luzerne (*Medicago sativa*), alors que la proline exogène de 10 mM était très efficace en allégeant les effets du sel, les concentrations supérieures n'étaient pas salutaires. Chez les céréales, quand 30 mM de proline était la concentration la plus efficiente en améliorant la germination et la croissance des plantules du riz soumises au stress salin, les concentrations les plus hautes entre 40 ou 50 mM provoquent la réduction de la germination des graines et abaissent le rapport K^+/Na^+ au niveau des feuilles (Roy et al., 1993).

Il est devenu évident qu'un excès de proline libre a des effets négatifs ou secondaires sur la croissance cellulaire ou les fonctions protéiques. Son accumulation intracellulaire réprime de manière significative plusieurs gènes impliqués dans la synthèse d'autres acides aminés ou responsables de la morphogénèse normale des plantes d'*Arabidopsis* (Nanjo et al., 2003). Ces résultats suggèrent que la proline intracellulaire doit être présente à un niveau approprié afin de conférer la tolérance au stress (Takagi, 2008). Il est donc essentiel de déterminer les concentrations optimales de la proline exogène qui garantissent des effets bénéfiques dans les différentes espèces végétales.

1. Objectif du travail

Le présent travail est entrepris en vue de déterminer l'effet d'un apport exogène de la proline sur le comportement d'une variété de blé dur au stade germination et au stade plantule (2 à 3 feuilles) et cela en présence d'une contrainte saline.

L'étude comparative concerne principalement:

- Le taux de germination des semences
- Les paramètres d'ordre morphologiques, physiologiques et biochimiques des plantules obtenues en culture hydroponique.

2. Matériels

2.1. Choix du matériel végétal

Le choix a été porté sur l'espèce blé dur qui représente un aliment essentiel dans la ration alimentaire locale et qui est considérée comme une céréale sensible à la salinité après le riz. Quant au choix variétal, notre étude a été effectuée sur la variété « *Waha* », qui a donné un bon rendement et de bonnes caractéristiques technologiques depuis son introduction en 1989 à l'I.T.G.C. de Sétif et qui est très utilisée dans les régions sahariennes souvent salées ou irriguées avec des eaux fréquemment chargées en sels (Beldjoudi, 1993)

A cet effet, un lot de semences de blé dur (variété *waha*) nous a été gracieusement fourni par le centre national de contrôle et de certification des semences et plants (C.N.C.C.) situé à El-Harrach à Alger. La semence obtenue est issue de la campagne agricole 2009/2010 (figure 13).



Figure 13. Semences matures de blé dur variété « *Waha* »

($Gr = 0,625$)

Tableau 2. Caractéristiques principales de la variété étudiée (CNCC, 2009).

Variété	Origine	Principales caractéristiques morphologiques	Caractéristiques Culturelles	Productivité	Zone d'adaptation
Waha « WH »	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Origine : syrie ➤ Obtenteur: ICARDA ➤ Demandeur: ITGC 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Epi : demi-lâche, compact, roussâtre ➤ Paille : courte, demi pleine ➤ Grain : moyen, clair et ambré à roux 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cycle végétatif : précoce ➤ Tallage : moyen à fort 	Rendement élevé	Hauts plateaux et plaines intérieures

2.2. Choix du type de sel

La contrainte saline imposée dans notre culture est induite par le chlorure de sodium ou NaCl qui constitue le sel dominant dans les sols et les eaux saumâtres d'irrigation des zones céréalières sahariennes. Il est caractérisé par une faible masse moléculaire ($PM=58,5 \text{ g/l}$; *Sigma-Aldrich*) et une grande mobilité.

2.3. Choix de la proline

La Proline a été choisie en considération de sa fonction d'osmoticum chez les végétaux affrontés aux conditions de stress abiotiques notamment le stress salin mais aussi pour ses différentes fonctions protectrice et antioxydante.

Sur le plan optique, la proline existe sous deux formes actives (L-proline et D-proline) et sous la forme racémique (DL-proline) (Prokhorov et *al.*, 1973). Concernant l'apport exogène, le choix est porté généralement sur la *L-proline* (ou *Proline* par abus de langage), qui est présente dans toutes les protéines particulièrement les protéines végétales.

2.4. Choix des concentrations du NaCl et de la proline

Des essais préliminaires ont été initialement conduits, en culture sur substrat, et ayant testé deux concentrations du sel nettement supérieures au seuil de tolérance de la variété étudiée (10 g et 20 g de NaCl.l⁻¹). A l'issue de ces essais, le choix a été porté sur 10 g/L correspondant à 171,11 mM de NaCl pour laquelle la plante a manifesté un début de jaunissement au niveau des extrémités foliaires.

De même, une gamme de concentrations de proline [10 ; 20 ; 30 et 40 mM] ont été aussi expérimentées en culture sur substrat (sol/terreau) qui est menée au niveau du laboratoire de physiologie végétale (U.S.T.H.B.). La concentration choisie et apportée au stade germination et au stade plantules en hydroculture est de l'ordre de 20 mM. Cette concentration, offre plus de vigueur pour les plants.

Le choix de ces concentrations a été basé essentiellement sur l'aspect morphologique des plantules au stade trois feuilles-début tallage.

2.5. Choix du milieu

➤ Au stade germination

Les semences de blé ont été auparavant mises en germination dans l'eau distillée puis sur la solution nutritive préconisée par Coïc et Lesaint (1975) (tableau 1 ; annexe II); les résultats n'ayant pas été satisfaisants, le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) qui est de loin le plus utilisé pour l'étude de la germination dans des conditions salines a été retenu. D'après Hare et *al.* (2003), les taux de germination sont très lents dans les milieux liquides que sur les milieux solides, c'est ainsi que nous adopté le milieu MS solide de façon à faire avancer ce processus dans le temps et à faciliter les observations quotidiennes (tableau 2 ; annexe II).

➤ Au stade plantule : culture hydroponique

Pour la culture hydroponique, les éléments nutritifs sont apportés sous forme d'une solution nutritive préparée dans l'eau distillée selon les normes définies par Coïc et Lesaint (1975) (tableau 1 ; annexe II). La composition de la solution est déterminée en fonction des besoins spécifiques en eau, en ions minéraux du blé.

Comme le mélange des éléments nutritifs n'est pas toujours possible à cause de leur solubilité, deux solutions « **A** » et « **B** » ont été préparées séparément au départ comme indiqué dans le tableau 1 (annexe II).

400 ml de chaque solution « **A** » et « **B** », sont mélangés et la solution obtenue est ajustée à un pH compris entre 5 et 6.

3. Méthodes d'étude

Dans un premier temps, un test de pouvoir germinatif a été réalisé au niveau du laboratoire central du centre national de contrôle et de certification des semences et plants (C.N.C.C.). L'objectif est de vérifier les conditions internes liées à l'état physiologique et aux caractéristiques germinatives de la semence. Ce pouvoir de germination estimé est de l'ordre de 97 %.

3.1. Stade germination (culture *in vitro*)

a. Désinfection des semences

Avant la mise en germination, les caryopses du blé ont été désinfectés selon le protocole appliqué par Kacem (2005). Pour cela, ils sont d'abord trempés dans l'éthanol 70 % pendant une minute tout en agitant fortement pour dissoudre les substances cireuses pouvant imprégner leur tégument. Les traces de cet alcool sont ensuite éliminées par un rinçage avec de l'eau distillée stérile. Puis les semences sont immergées pendant 20 minutes dans la solution d'hypochlorite de sodium à 12 % diluée deux fois, suivi de 5 rinçages à l'eau distillée stérile. Les semences sont alors déposées sur un papier absorbant.

b. Mise en germination

320 semences de la variété Waha sont aussitôt mises à germer dans des boîtes de pétri plastiques de 9 cm de diamètre. Celles-ci contiennent environ 4 ml du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) préparé à base de macroéléments, micro-éléments, fer, vitamines et de 20 g de saccharose. Ce milieu sans régulateurs de croissance est solidifié par l'agar 10 g/l, et son pH est ajusté à 5,6.

Les semences désinfectées sont partiellement immergées dans le milieu et déposées de façon à ce que l'embryon soit bien en contact avec le milieu de culture.

Les boîtes de pétri ensemencées sont fermées sont réparties en 4 lots correspondant à 4 traitements différents :

T = milieu MS ;

S = milieu MS + 10 g/l de NaCl ;

P = milieu MS + 20 mM de proline ;

S + P = milieu MS + 10 g/l de NaCl + 20 mM de proline.

c. Dispositif expérimental

Les différents lots placés dans la chambre de culture ont été distribués au hasard selon un dispositif en randomisation totale dont l'utilisation n'est envisageable que lorsque les conditions de culture sont homogènes et aisément contrôlables.

Quatre vingt (80) semences sont utilisées pour chaque lot avec 4 répétitions à raison de 20 semences par boîte de Pétri ; les lots sont placés dans une chambre de culture et maintenus sous obscurité pendant 48 heures, puis exposés à une photopériode (16 heures le jour /8 heures la nuit) avec une température de 25 ± 1 °C environ (figure 14).

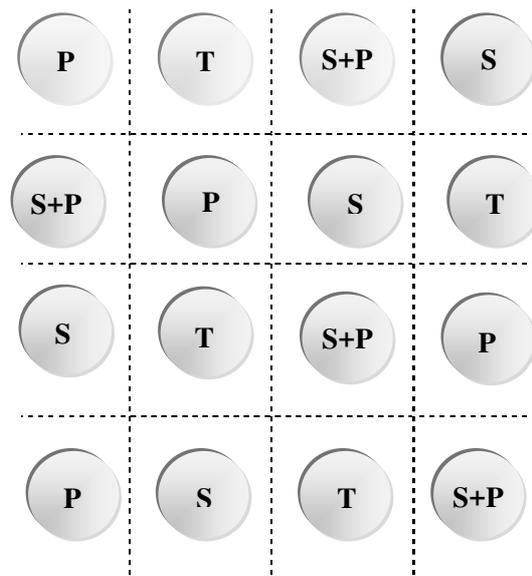


Figure 14. Plan du dispositif expérimental
(avec **T** = Témoin, **S** = NaCl, **P** = Proline, **S+P** = NaCl + Proline)

3.2. Stade plantule (culture hydroponique)

a. Préparation des semences et germination

Une désinfection des semences de *Waha*, conservées à l'obscurité en chambre froide (4° C), avec de l'hypochlorite de sodium à 12° dilué deux fois suivie d'un rinçage abondant avec de l'eau distillée a été réalisé a priori afin d'éviter tout risque de contamination. Puis, les

semences sont mises à imbiber pendant quelques heures dans de l'eau et à température ambiante.

Pour une germination plus homogène, les semences ont été mises à germer au préalable dans un papier Whatman normalisé, plissé et stérile (3236, Réf. N°. 10 345 572). Il est humecté à l'eau distillée et placé par la suite dans une étuve à 30 °C pendant 3 à 4 jours. Afin d'obtenir un nombre suffisant de semences germées sans anomalies, la quantité des semences a été multipliée à volonté par rapport aux besoins de la culture (figure 15-a).

Une couverture du papier absorbant ensemencé avec un film plastique (opaque) est capitale pour garantir une bonne humidité aux graines.

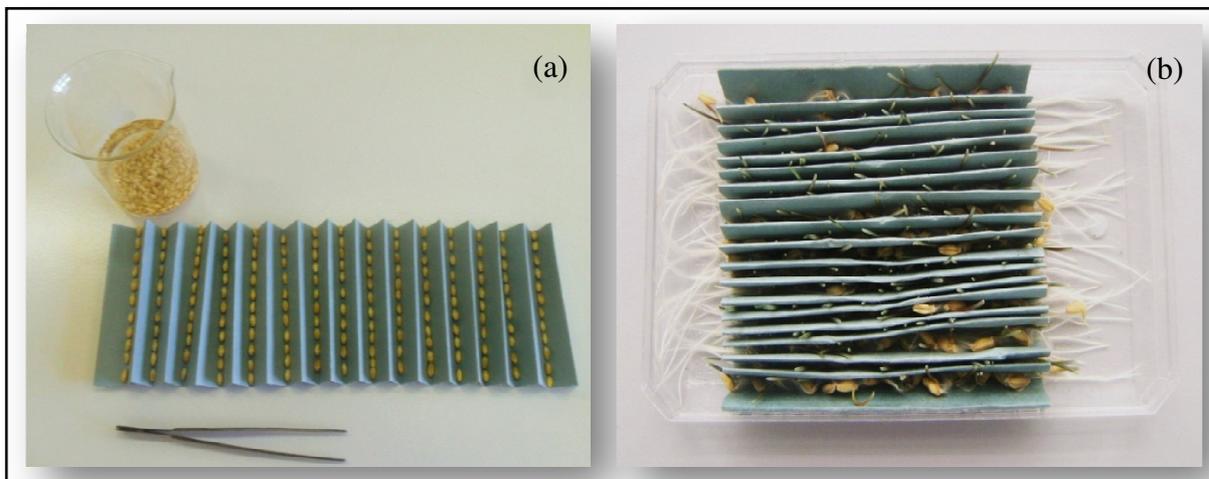


Figure 15. Lancement de la germination avant repiquage des jeunes pousses en hydroponie :
(a) Prégermination des semences désinfectées, (b) semences germées après une semaine.

b. Mise en culture

Après l'apparition des racicules et du coléoptile, on procède au repiquage des plantules en hydroponie. Ce mode de culture choisi offre l'avantage de faciliter l'accès au système racinaire, d'homogénéiser l'apport en éléments nutritifs et d'assurer l'absorption directe de la proline et du sel appliqués par les racines éliminant ainsi les interactions proline/sol et sel/sol.

Partant de son simple principe, le système hydroponique adopté se compose principalement de bacs opaques en aluminium d'une capacité totale d'environ 700 ml et de dimension de 11 cm x 22 cm. Les plantules sont transplantées dans le dispositif de culture et repiquées sur des carrés en mousse perforés (matière plastique alvéolée), opacifiés à l'aide d'un film plastique noir et adaptés aux dimensions des bacs de culture. 20 plantules ont été cultivées par bac. Pour éviter le dessèchement des racines, ces bacs ont été remplis d'eau

distillée le temps de transférer la totalité des plants et de mettre en route le dispositif en présence de la solution nutritive (figure 16).

L'oxygénation du milieu est continuellement assurée par un système de bullage constitué essentiellement de deux pompes d'air (*Regent calm RC-004* et *K-Discus K-6800*) reliées à des diffuseurs d'aquarium par des tubes fins. Le débit est fixé de façon uniforme pour l'ensemble des bacs afin d'obtenir une aération racinaire relativement similaire et un bon mélange de la solution nutritive (figure 16).



Figure 16. Système d'oxygénation de la solution nutritive et de culture hydroponique.

La croissance des jeunes plantes a été conduite dans une chambre de culture, au niveau de l'école nationale supérieure agronomique (ENSA) d'Alger, sous un éclairage aux néons et en régime photopériodique classique. Les conditions de la chambre de culture se caractérisent par une photopériode de 16h/8h (jour/nuit) et une température journalière de $25 \pm 1^\circ \text{C}$.

Après 24 heures d'acclimatation des plantules dans la solution nutritive décrite par Coïc et Lesaint (1975), les bacs sont distancés l'un de l'autre et ont fait l'objet de différents traitements.

c. Induction de la contrainte saline et application exogène de la proline sur les plantules de blé dur

200 ml du mélange A et B sont utilisés pour chaque lot. Excepté le bac correspondant au témoin, les milieux nutritifs liquides des autres unités expérimentales sont additionnés de chlorure de sodium (*NaCl*) et/ou de proline en prenant la précaution de maintenir les racines immergées dans la solution nutritive (Tab. 3).

Tableau 3. Solutions finales utilisées pour chaque traitement

Traitement	Solution « A » + solution « B » (ml)	Teneur en NaCl		Teneur en proline	
		g /200 ml	mM/200ml	g /200 ml	mM/200ml
T = témoin	200	0	0	0	0
S = stressé	200	2	171,11	0	0
P = proline	200	0	0	0,46	20
S + P = stressé + proline	200	2	171,11	0,46	20

d. Disposition des traitements

Les traitements placés dans la chambre de culture ont été distribués d'une manière aléatoire.

T : « Témoin » contenant le milieu CL standard

S : « stress » contenant le milieu CL enrichi en *NaCl*

P : « Proline » contenant le milieu CL additionné de *proline*

S + P : « stress + Proline » contenant le milieu CL, le *NaCl* et la *proline*

e. Contrôle du système

Les milieux nutritifs ont été régulièrement renouvelés chaque deux jours afin que les plantules puissent se développer dans des conditions optimales. Le remplacement de ces milieux a été automatiquement accompagné des apports en chlorure de sodium et de la proline selon les traitements. Leur pH est maintenu à 5,6. A chaque renouvellement du milieu, les bacs sont lavés et javellisés et les racines sont rincées avec de l'eau distillée.

f. Echantillonnage

Après vingt-un jour de culture correspondant au stade 2 à 3 feuilles (figure 17), un échantillonnage aléatoire simple est effectué, et les plantules encore au stade juvénile sont prélevées au hasard et utilisées pour les différentes mesures définies ci-après.

A chaque fois, la mise en culture en hydroponie a été relancée pour l'évaluation de chaque paramètre.



Figure 17. Stade de prélèvement des échantillons.

3.3. Paramètres mesurés et techniques de dosage

3.3.1. Stade germination

a. Pourcentage de germination

Durant 8 jours d'incubation dans les conditions contrôlées, nous avons suivi l'évolution de la germination par comptage quotidien des semences qui ont germé au niveau des différents traitements. Le critère de germination retenu correspond au moment où la radicule a percé les enveloppes (téguments) selon la définition de Côme (1970).

Le pourcentage de germination des semences a été déterminé comme étant le rapport entre le nombre des semences germées et la totalité de semencesensemencées initialement (Benderradji et *al.*, 2010). Une moyenne est déterminée à partir de 4 boîtes de pétri utilisées pour chaque traitement.

3.3.2. Stade plantule

Le suivi du comportement des plantules vis-à-vis du stress salin a été basé sur plusieurs paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques.

3.3.2.1. Paramètres morphologiques

a. Mesure de la croissance en longueur

Les longueurs des parties aériennes et souterraines exprimées en centimètre ont été mesurées à l'aide d'une règle graduée, du collet jusqu'au bourgeon terminal et du collet jusqu'à l'extrémité de la racine respectivement.

Les valeurs données sont les moyennes de 20 répétitions correspondant à 20 plantules par traitement.

b. Mesure de la croissance pondérale

Les parties racinaires des plantules ont été lavées soigneusement à l'eau distillée et séchées rapidement avec du papier absorbant puis séparées des parties aériennes. Le sectionnement des plantules s'est effectué au niveau du collet. Les deux parties séparées ont fait l'objet d'une pesée et la biomasse obtenue correspond à la matière fraîche qui est exprimée en milligramme. Quant à la matière sèche, elle a été obtenue après étuvage à 65 °C pendant 72 heures (stabilisation du poids de matière sèche).

Pour chaque traitement une moyenne de 20 individus est établie.

c. Surface foliaire (SF « cm^2 »)

La mesure de la surface foliaire est un indice nécessaire pour la détermination de la croissance. Elle a été réalisée à l'aide du logiciel « *ImageJ 1.43u* ». Une fois photographiées, les feuilles sont directement traitées avec ce logiciel (annexe III). Une moyenne de 10 surfaces foliaires exprimées en centimètre carré (cm^2) est établie pour chaque traitement.

3.3.2.2. Paramètres physiologiques

a. Teneur Relative en eau de la feuille (TRE « % »)

Le statut hydrique des plantules a été évalué par la teneur relative en eau. Pour cela, le limbe de la feuille a été sectionné à sa base, et coupé en cinq petit fragments relativement identiques d'environ 0,8 cm de longueur. Ceux-ci sont immédiatement pesés ce qui représente le poids frais initial (PF). Les fragments sont mis par la suite dans des boîtes de pétri contenant 20 ml d'eau distillée et l'ensemble est maintenu à l'obscurité et sous froid.

Après 24 heures, les fragments foliaires sont récupérés et essuyés délicatement en surface avec du papier absorbant et pesés à nouveau, ce qui donne le poids en pleine turgescence

(PT). Les échantillons sont enfin mis à sécher à l'étuve réglée à 80 °C pendant 48 heures et pesés pour avoir leur poids sec (PS).

Pour chaque traitement, une moyenne de quatre répétitions est établie. La teneur relative en eau est calculée selon la formule de Clark et Mac-Caig (1982) :

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

b. Estimation de l'intégrité membranaire

L'intégrité membranaire est estimée par l'évaluation de la fuite relative d'électrolytes. Celle-ci est acquise par la mesure de la conductivité électrique des fragments foliaires d'environ 1 cm de longueur selon la méthode de Dionisio-Sese et Tobita (1998).

Prélevés d'une même feuille pour chaque traitement, ces fragments ont été mis à flotter dans 20 ml d'eau distillée et leur conductivité (E) est mesurée après 60 minutes. Ils sont ensuite mis à bouillir dans un bain marie pendant 5 minutes. Après refroidissement, une deuxième lecture de la conductivité (ET) a été effectuée.

L'intégrité membranaire est déterminée par le rapport suivant :

$$\text{Fuite relative d'ions (\%)} = (\text{E} / \text{ET}) \times 100$$

Une moyenne de trois mesures a été établie pour chaque traitement.

3.3.2.3. Paramètres biochimiques

a. Détermination de la teneur en pigments chlorophylliens

100 mg de matière végétale fraîche (feuilles) sont broyés à sec dans un mortier puis en présence de 15 ml d'acétone à 80 %. Une centrifugation est effectuée par la suite sur le broyat pendant 15 mn à 3000 tours/minute. Les teneurs en pigments foliaires des surnageants récupérés sont déterminées par dosage spectrophotométrique à des longueurs d'ondes suivantes :

- 663 nm et 647 nm pour la chlorophylle (a) et la chlorophylle (b) ;
- 470 nm pour les caroténoïdes.

Les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes sont données par les équations de Lichtenthaler (1987) et sont exprimées en mg/g de la matière végétale sèche :

Chl (a)	=	12,25 DO (663)	-	2,79 DO (647)	($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
Chl (b)	=	21,5 DO (647)	-	5,10 DO (663)	($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
Chl (a + b)	=	7,15 DO (663)	+	18,71 DO (647)	($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)
Caroténoïdes	=	$\frac{1000 \text{ Do (470)} - 1,82 \text{ Chl (a)} - 85,02 \text{ Chl (b)}}{198}$			($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)

b. Dosage des sucres solubles et d'amidon

▀ Principe

Le dosage des sucres solubles et d'amidon est basé sur la méthode de Mc READY (1950) dont le principe consiste en la transformation à chaud des glucides en furfural et ses dérivés furfuriques par l'acide sulfurique. Le furfural et les dérivés obtenus se condensent directement, en ce milieu sulfurique et chaud, avec l'antrone pour donner des complexes colorés en vert bleuâtre en présence des hexoses.

▀ Extraction

500 mg de matière végétale fraîche (feuilles) sont broyées à sec puis en présence de 10 ml d'éthanol bouillant à 80 %. Le broyat obtenu est centrifugé à 3000 tours/minute pendant 20 minutes. On récupère le surnageant qui est rapidement transféré dans des tubes à essai. 5 ml d'éthanol bouillant à 80 % sont ajoutés au culot et les échantillons sont centrifugés de nouveau. Cette opération est répétée deux fois et les trois surnageants obtenus sont mélangés dans les tubes à essai et ajustés à 50 ml avec de l'eau distillée.

Le culot résultant de l'extraction des sucres sert pour l'extraction de l'amidon. Il est incubé sous froid et à l'obscurité pendant 24 heures en présence de 5 ml d'eau distillée froide et 6,5 ml d'acide perchlorique à 65 %. Le mélange est centrifugé par la suite à 5000 tours/minute pendant 20 minutes. Le surnageant récupéré est placé dans un tube à essai est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée.

■ Dosage

0,5 ml d'extrait glucidique est prélevé et placés dans des tubes à essai aux quels sont ajoutés 0,5 ml d'eau distillée et 2 ml de réactif à l'antrone (annexe IV). Après agitation, les tubes sont placés au bain marie à 100° C pendant 7 minutes et retirés par la suite pour être refroidis dans la glace. Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm.

■ Gamme étalon

La gamme étalon sert à la détermination de la quantité des sucres solubles dans nos échantillons. Elle est préparée à partir d'une solution mère de glucose à 100 µg/ml. Les différentes concentrations utilisées sont rapportées sur une courbe étalon (Figure 18).

Pour l'amidon, la quantité finale est obtenue par l'utilisation d'un facteur de correction 0,9. Les teneurs en sucres et en amidon sont exprimées en mg/g de matière végétale sèche.

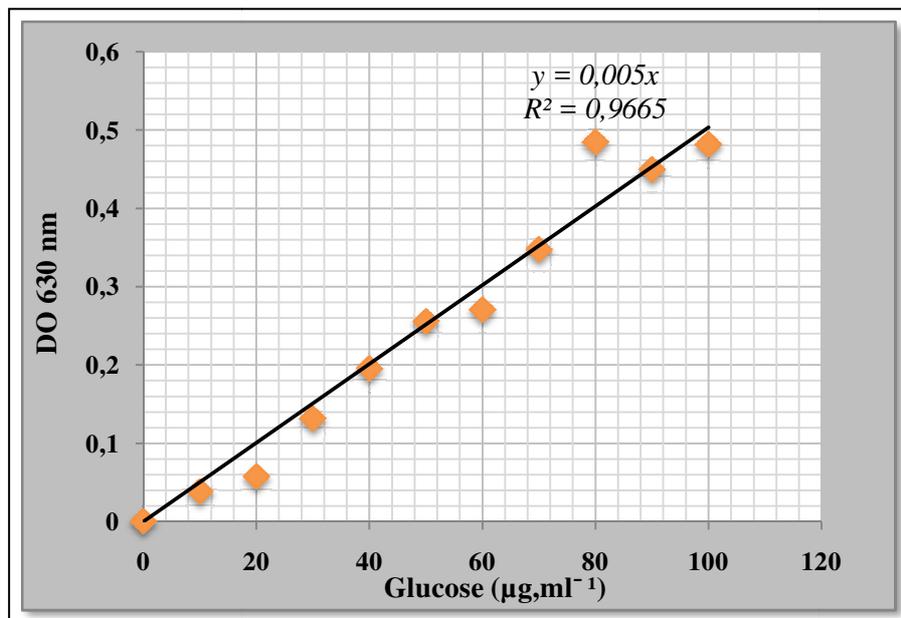


Figure 18. Courbe étalon du glucose servant au dosage des sucres solubles.

c. Dosage de protéines hydrosolubles

■ Principe

Le dosage des protéines hydrosolubles se fait selon la méthode de Bradford (1976) qui consiste à utiliser le bleu de coomassie (G250) ayant la propriété de se lier aux protéines. La liaison est visualisée par l'apparition d'une coloration bleue. Cette coloration est proportionnelle à la quantité des protéines présentes, elle se développe rapidement et reste stable pendant une heure.

Extraction

500 mg de matière végétale fraîche sont prélevés et placés dans un mortier. Le broyage est effectué à sec puis en présence de 5 ml d'eau distillée. Le broyat est ensuite centrifugé à 5000 tours/minute pendant 15 minutes.

Dosage

Le dosage est réalisé sur 100 μ l de surnageant additionné de 3 ml de réactif de Bradford (annexe IV). Le tout est complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

Après agitation, le mélange est laissé incuber quelques minutes. Les densités optiques sont lues à une longueur d'onde $\lambda = 595$ nm par spectrophotométrie. L'appareil est étalonné avec un blanc préparé à partir de 100 μ l d'eau distillée et de 3 ml du réactif Biorad.

Gamme étalon

Le calcul des concentrations en protéines s'est fait par l'équation déduite d'une courbe étalon établie à l'aide d'une série de solutions allant de 0,01 à 0,2 mg/ml préparées à partir d'une solution mère de Sérum albumine de bœuf (BSA) à 1 mg/ml (figure 19).

La quantité des protéines est exprimée en mg/g de matière végétale sèche.

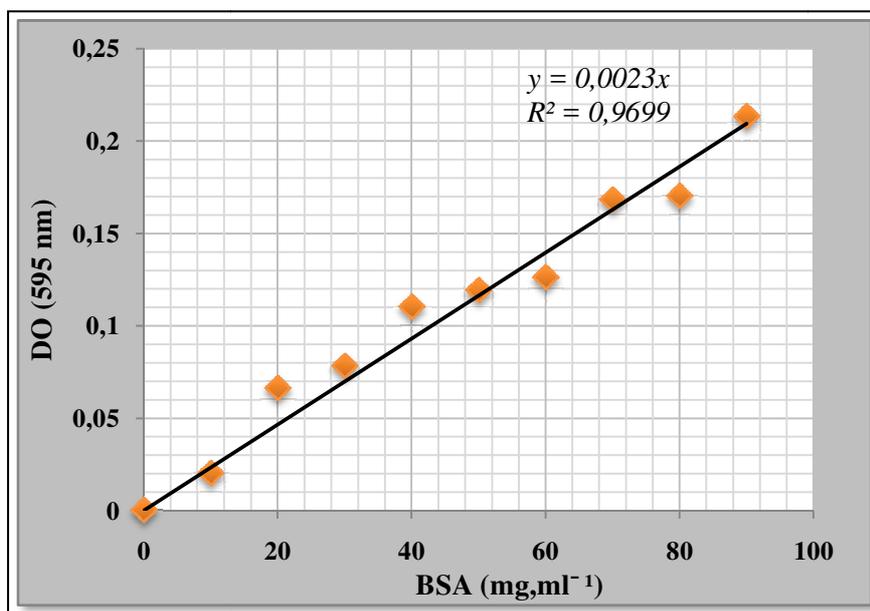


Figure 19. Courbe étalon de la BSA servant au dosage des protéines hydrosolubles.

d. Dosage de la proline endogène

Principe

La proline est facilement oxydée par la ninhydrine ou tricetohydrindène dans un milieu acide et à chaud donnant un composé rouge et soluble dans les solvants organiques. C'est sur cette

réaction que se base le protocole de mise en évidence de la proline dans les échantillons foliaires. La méthode suivie est celle de Trolls et Lindsley (1955) modifiée par Magne et Larher (1992).

■ **Extraction**

50 mg de matière fraîche foliaire sont prélevés de chaque traitement et broyés dans 500 μ l d'eau distillée. Le broyat est porté par la suite à ébullition au bain marie pendant 30 minutes. Après refroidissement, l'extrait est mis dans des tubes eppendorfs de 1,5 ml pour subir une centrifugation à 13 000 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu est récupéré dans un tube à essai. L'extraction est reprise à partir du culot auquel sont ajoutés 500 μ l d'eau distillée, suivie d'une deuxième centrifugation. Les deux surnageants sont mélangés dans des tubes à essai préalablement étiquetés.

■ **Dosage**

1 ml de l'extrait a été prélevé de chaque tube et mis dans de nouveaux tubes auxquels, nous avons ajouté 1 ml de réactif à la ninhydrique (annexe IV).

L'ensemble est homogénéisé et porté à ébullition au bain-marie à 90° C pendant 20 minutes, les solutions virent vers la couleur rouge. Après refroidissement et ajout de 3 ml de toluène l'ensemble est soumis à une centrifugation à 3000 tours/minute pendant 5 minutes. Deux phases se séparent : une phase supérieure organique (rouge) contenant la proline libre et une phase inférieure aqueuse (transparente) sans proline. La première a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur.

L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proline. La quantification de la teneur en cet acide aminé a été réalisée par mesure spectrophotométrique à une longueur d'onde $\lambda = 520$ nm.

■ **Gamme étalon**

La gamme étalon a été préparée à l'aide d'une solution mère à 100 μ g de proline par ml d'eau distillée. À partir de cette gamme on a établi une courbe d'étalonnage qui permet de traduire la relation entre la densité optique (D.O.) et la concentration de proline (figure 20).

Les teneurs en proline sont exprimées en mg/g de matière végétale sèche.

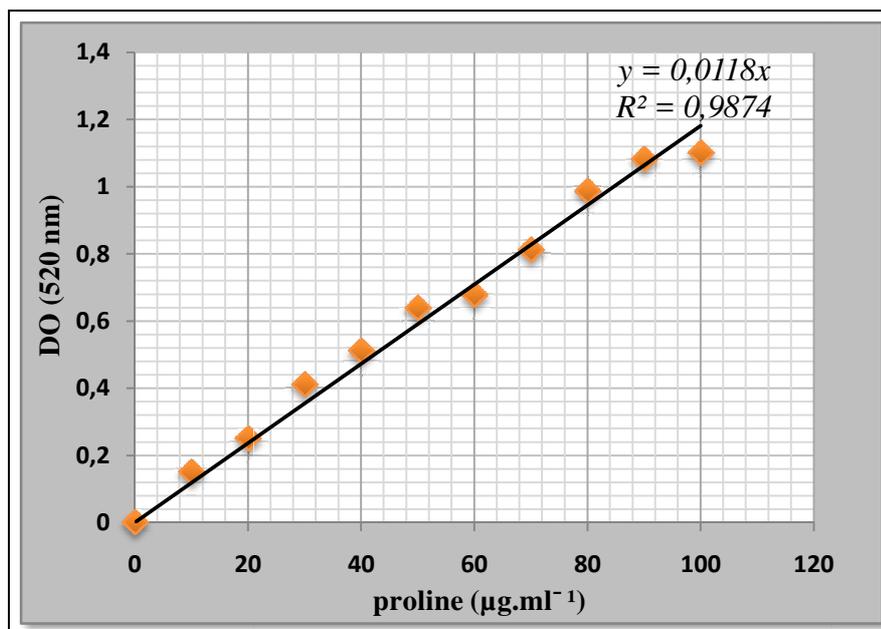


Figure 20. Courbe étalon de la proline.

e. Dosage de la glycine bêtaïne

▀ Principe

La glycine bêtaïne est l'un des composés quaternaires d'ammonium (QAC) accumulés lors d'un stress salin (Grieve et Grattan, 1983). Son dosage est réalisé dans la majorité des essais selon la méthode de Grieve et Grattan (1983). Le principe de celle-ci est basé sur le fait que la bêtaïne forme un complexe bêtaïne-periodite avec l'iodure, dans un milieu acide et à des basses températures, qui absorbe à 360 nm dans la gamme UV.

▀ Extraction

Préalablement séchée dans une étuve à 65 °C pendant 72 heures, la matière végétale sèche est finement broyée dans l'eau distillée (1 : 10) et filtrée dans des flacons à l'aide de papier filtre (N° 589³, diamètre 11 cm).

▀ Dosage

1 ml de l'extrait prélevé est mélangé avec 1 ml d'HCL (2N) (annexe IV). Après homogénéisation rapide au vortex, 0,5 ml de ce mélange est transféré dans des tubes en verre auxquels on a ajouté 0,2 ml de potassium tri-iodide (KI-I₂) (annexe IV).

Les contenus sont ensuite secoués occasionnellement, pendant 90 minutes, dans un bain glacé placé sur un agitateur. Puis, 2 ml d'eau distillée glacée et 20 ml de 1-2 dichlorométhane refroidi à - 10 °C sont rajoutés. Le mélange fait apparaître une bonne séparation de deux couches qui sont agitées pendant 1 à 2 minutes tout en gardant les tubes dans un bain glacé.

Après élimination de la phase supérieure aqueuse avec une seringue, la densité optique de la phase inférieure organique est déterminée à une longueur d'onde de 365 nm.

► Gamme étalon

Les valeurs obtenues sont converties en teneur de glycine bêtaïne par le biais d'une « courbe étalon », préalablement établie à partir d'une série de solutions de concentrations en glycine bêtaïne connues. La concentration de la solution mère est de 100 µg/ml (figure 21).

La teneur de glycine bêtaïne est exprimée en mg/g de matière végétale sèche.

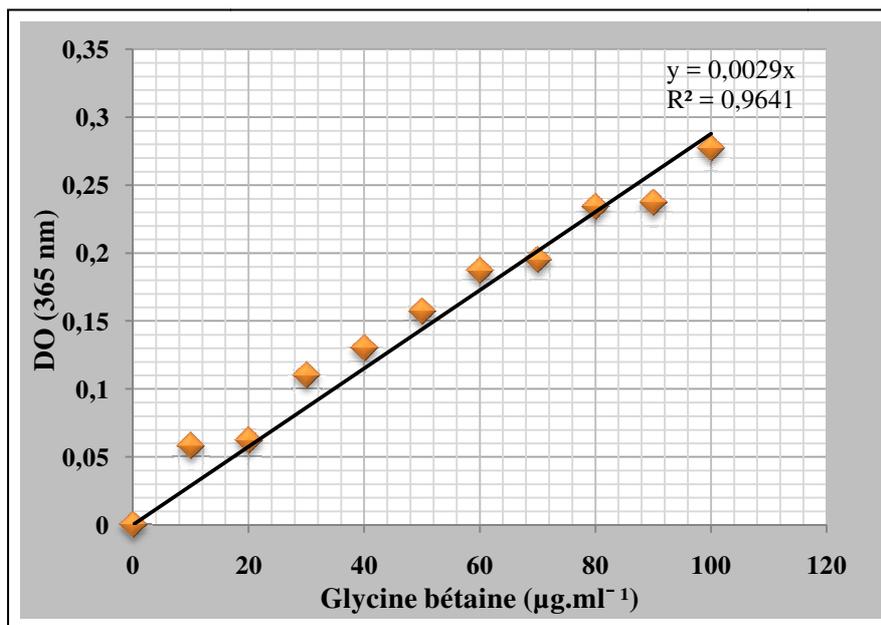


Figure 21. Courbe étalon de la glycine bêtaïne.

f. Détermination de la teneur de malondialdéhyde

► Principe

Parmi les produits terminaux formés lors de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres, le malondialdéhyde (MDA) est jugé important pour l'appréciation du stress oxydatif.

La détection spectrophotométrique de MDA par le test TBARS (*ThioBarbituric Acid-Reactive Substances*) est la plus couramment utilisée. Son dosage est réalisé ici selon la technique de Health et Packer (1968) qui consiste en une condensation de deux moles d'acide thiobarbiturique (TBA) et d'une mole de malondialdéhyde sous l'effet conjoint de la température et de l'acidité du milieu. La réaction TBA-MDA conduit à la formation d'un complexe coloré en rose présentant un maximum d'absorbance à 532 nanomètre (figure 22).

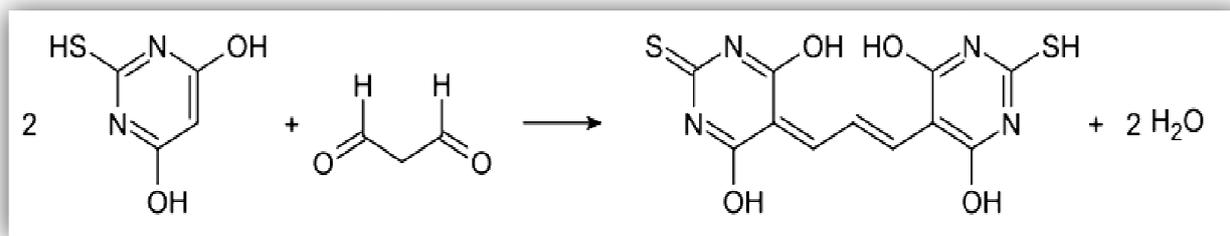


Figure 22. Réaction chimique du malondialdéhyde avec l'acide thiobarbiturique (Roland, 1952).

■ Extraction

0,1 g de la matière végétale est prélevée et bien broyée dans un mortier dans 2 ml de TCA 20% (annexe III). Le tout est transféré dans des tubes eppendorfs pour une première centrifugation à 15 000 tours/minute pendant 15 minutes.

■ Dosage

Après centrifugation, le surnageant obtenu est dilué de moitié dans la solution TCA-TBA annexe IV) par ajout de 0,5 ml de cette solution dans 0,5 ml de l'extrait végétal. Le blanc est préparé avec 0,5 ml de TCA 0,1 % (annexe IV) et 0,5 ml de TBA-TCA. Tous les échantillons à l'instar du blanc sont directement placés au bain marie à 95 °C durant 30 minutes. Refroidis dans la glace pendant 10 minutes, ils sont par la suite centrifugés à 10 000 tours/minute. Après 10 minutes, les densités optiques sont lues au spectrophotomètre sur deux longueurs d'onde $\lambda = 600$ et 532 nm. La première est mesurée pour estimer les substances libérées par l'acide thiobarbiturique d'une manière non spécifique et qui absorbent également à 532 nm.

La teneur en MDA est donnée selon la formule suivante :

$$\text{MDA } (\mu\text{moles/g}) = (\text{DO}_{532} - \text{DO}_{600}) \times 1000 \times V / 155 \times \text{PF}$$

Avec **DO** = densité optique ; **V** = volume extrait en ml ; **PF** = poids frais en mg et **155** = coefficient d'extinction molaire.

g. Activité enzymatique (activité catalase)

■ Principe

Le principe de mesure de l'activité catalase repose sur les propriétés de cette famille d'enzymes à dégrader les molécules de H₂O₂.



La méthode employée est celle décrite par Dorey et collaborateurs (1998) qui consiste à mesurer l'activité de l'enzyme en suivant la disparition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

■ Préparation des extraits

Initialement une extraction des protéines totales a été réalisée en vue de mesurer l'activité totale de la catalase.

Les protéines totales sont extraites à partir de 300 mg du matériel foliaire des plantules. Pour ce faire, ce matériel végétal est broyé à basse température dans un mortier préalablement refroidi en présence de 1 ml de tampon d'extraction (annexe IV).

Le mélange obtenu est centrifugé à 15 000 tours/minute pendant 15 min à 4 °C à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée. Le surnageant est récupéré pour la détermination de l'activité enzymatique tout en le maintenant sous froid.

La teneur en protéines des différents extraits obtenus est quantifiée par spectrophotométrie à 595 nm selon la méthode de Bradford (1976) se basant sur le même principe que celui précédemment décrit.

■ Détermination de l'activité enzymatique

Une aliquote d'extrait protéique correspondant à 30 µg de protéines totales est placée dans une cuve en quartz contenant 1ml d'un mélange réactionnel « tampon phosphate » (annexe IV). Le zéro est réalisé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 240 nm.

La réaction est initiée par addition de 5µl d' H_2O_2 à 10 mM dans la cuve de lecture. La vitesse de la décomposition d' H_2O_2 est déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant 30 secondes et pendant 1 minute donnée par le spectrophotomètre. L'évaluation de l'activité enzymatique spécifique à la catalase, exprimée en µkat par mg de protéines, est donnée par la formule suivante :

$$\text{Activité} = \Delta \text{DO} \cdot \text{min}^{-1} \times 1000 / (\epsilon \times \text{mg protéines})$$

ΔDO = variation de la densité optique mesurée à 30" et 1 mn ; ϵ = coefficient d'extinction moléculaire d' H_2O_2 à 240 nm et à 25 °C, égal à 36 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

4. Traitements statistiques

Les résultats obtenus sont traités et soumis à une analyse de la variance à un critère de classification (**ANOVA1**) et comparés (classification en groupes homogènes) selon le test Student-Newman-Keuls au seuil de 5 %, basée sur la plus petite différence significative. Cette analyse est effectuée à l'aide du logiciel **SPSS** version 10.0.

Les histogrammes présentés rejoignent les valeurs moyennes encadrées par leurs écart-type, ils sont réalisés par le logiciel Microsoft **Excel 2007**.

Enfin, l'évaluation de l'effet du sel et de la proline exogène est exprimée en terme de pourcentage de variation selon la formule : $[(m_T - m) / m_T \times 100]$ avec m_T la valeur d'un caractère donné sur le milieu témoin et m sa valeur dans le milieu traité avec du sel et/ou la proline.

Résultats et discussions

I. Stade germination

I.1. Effet de la proline exogène sur la germination

Après huit jours de mise en culture, le taux de germination obtenu se distingue d'un traitement à un autre en fonction de la composition finale (présence ou absence de sel en association ou non avec la proline) du milieu de culture Murashige et Skoog (1962) sur lequel les graines sont mises à germer.

Les pourcentages de germination calculés pour les différents lots sont rapportés dans le tableau 1 (annexe V) et illustrés dans la figure 23. Ils varient de 38,75 % à 100 %. Le taux le plus élevé est obtenu par les semences mises à germer sur le milieu MS contenant de la proline exogène (*Proline*), tandis que le taux le plus faible est enregistré par les semences ayant germé sur le milieu salin (*NaCl*).

En présence de proline exogène, le taux de germination des graines soumises à une contrainte saline est amélioré jusqu'à 76,25 %.

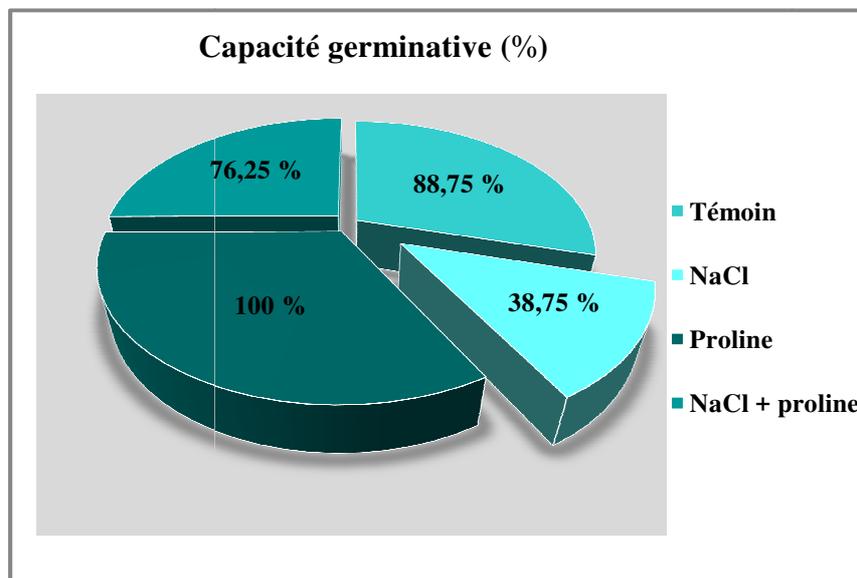


Figure 23. Impact de la proline exogène (20 mM) sur le pourcentage de germination des semences de blé dur soumises à une contrainte saline (10g/l de NaCl).

L'analyse de la variance ANOVA 1 indique une variation très hautement significative des pourcentages de germination entre les traitements ($p = 0,000$) (tableau 2 annexe V).

La comparaison des moyennes par le test de Student-Newman-Keuls au seuil de 5 % confirme cette variation par l'apparition de trois groupes homogènes (**A** : *Proline* et *Témoin*; **B** : *NaCl* + *Proline* ; **C** : *NaCl*) (tableau 3 annexe V).

La planche suivante illustre la différence observée entre les différents lots après 8 jours de mise en culture.

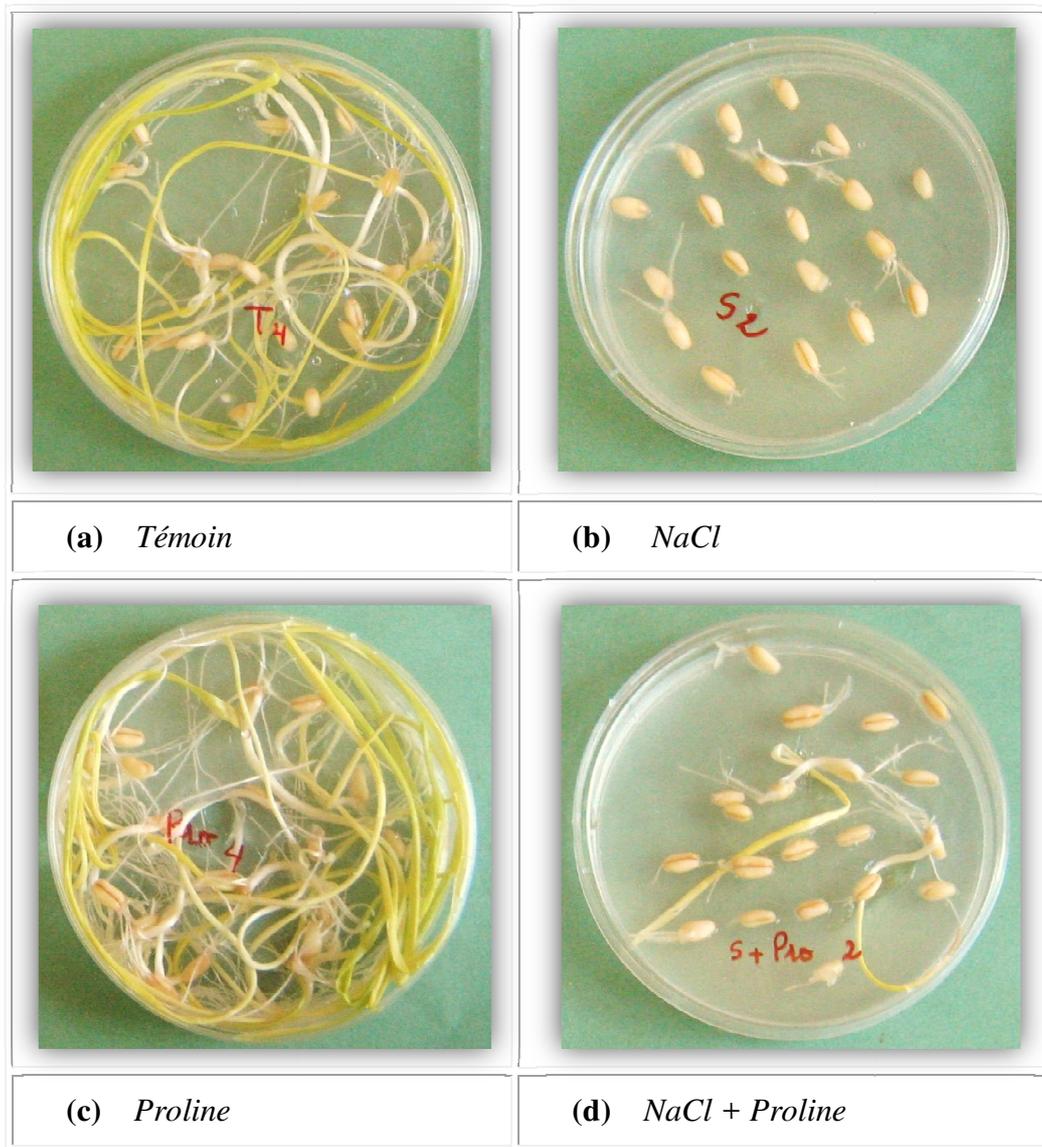


Planche 1. Impact de la proline exogène sur la germination et la croissance de blé dur « Waha » (après 8 jours de mise en culture) en conditions salines et non salines: **(a)** milieu MS standard; **(b)** milieu MS + 10 g/l de NaCl ; **(c)** milieu MS + 20 mM de L-proline ; **(d)** milieu MS + 10 g/l de NaCl + 20 mM de L-proline (Gr = 0,625).

La figure suivante témoigne de l'effet négatif du sel et de l'effet améliorateur de la proline exogène sur les premiers stades de croissance des semences de blé dur après 12 jours de mise en culture (figure 24).

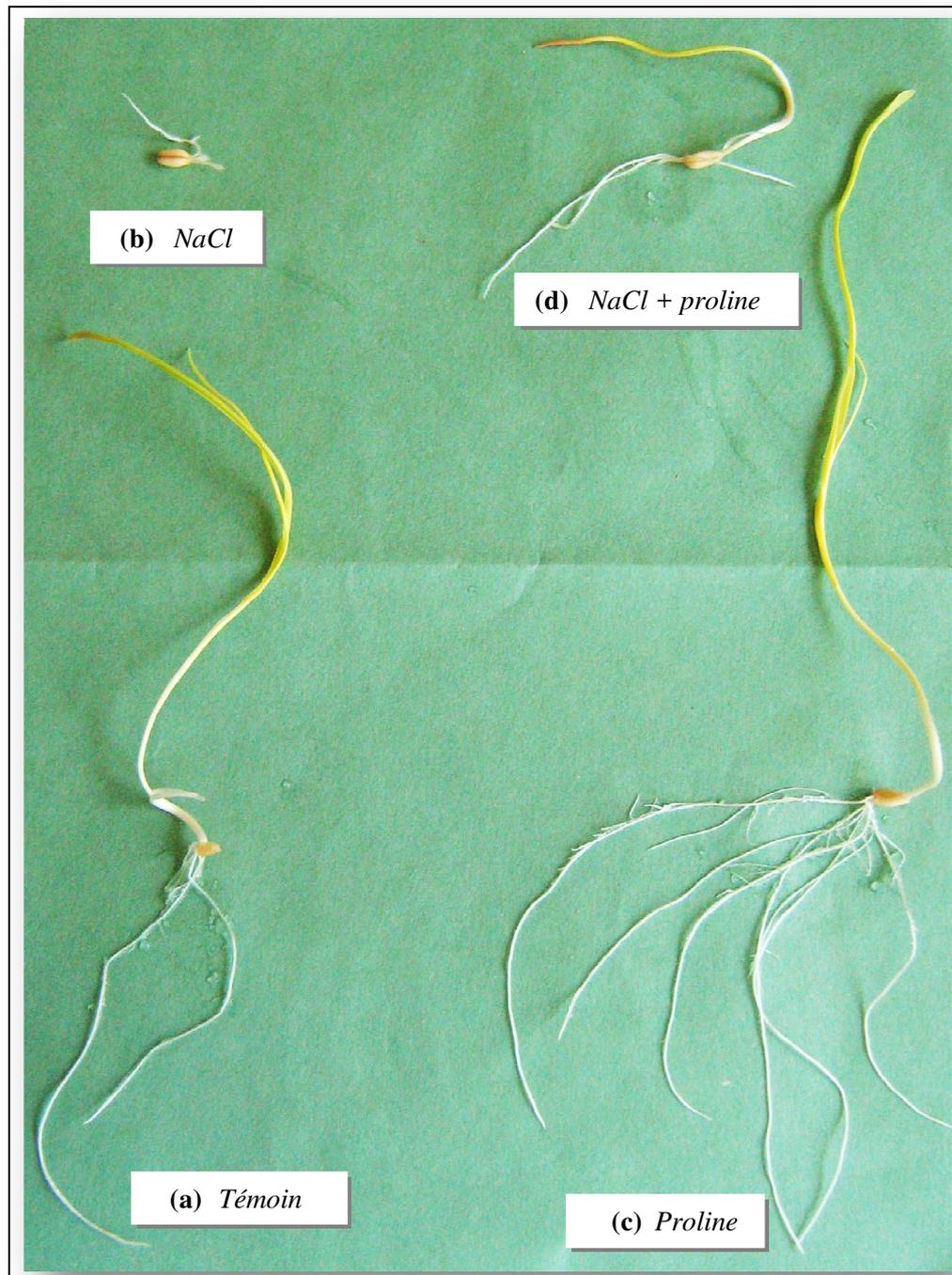


Figure 24. Plantules issues des graines germées après 12 jours : (a) milieu MS standard; (b) milieu MS + 10 g/l de NaCl ; (c) milieu MS + 20 mM de L-proline ; (d) milieu MS + 10 g/l de NaCl + 20 mM de L-proline.

Cette figure montre que la croissance de la partie racinaire et de la partie aérienne (le nombre et la longueur des racines et des feuilles) des jeunes pousses est considérablement ralentie par la présence du sel dans le milieu de culture en comparaison aux plantules témoins. En présence de proline, cet effet négatif du sel est atténué, il est traduit par une croissance des feuilles et des racines relativement améliorée. Il est à noter que l'apport de la proline en absence d'une contrainte saline induit une croissance rapide et meilleure comparativement au témoin.

➤ Discussion

➤ Effet du stress salin

La germination et les premiers stades de croissance sont cruciaux pour l'établissement des espèces se développant dans des environnements salins. Le stade plantule est le plus vulnérable dans le cycle de vie d'une plante ; la germination des semences est souvent limitée par la salinité du sol et la tolérance au sel pendant ce stade est un facteur très important (Rahman et *al.*, 2008). Atia et *al.* (2011) signalent que la germination des graines est non seulement affectée par la concentration du sel, mais aussi par la nature du sel appliqué ce qui est en accord avec les constatations de Duan et *al.* (2004) et Ungar (1996).

Les résultats obtenus concernant la capacité de la germination des semences de blé dur variété « *Waha* » montrent que le stress salin induit par le chlorure de sodium (*NaCl*) réduit considérablement la germination. Un résultat semblable concernant la germination des semences de blé dur, de blé tendre et de l'orge a été également rapporté par d'autres chercheurs (Rachidai et *al.* 1994 ; Mallek-Maalej et *al.*, 1998 ; Almansouri et *al.* 2001 ; Ben Naceur et *al.*, 2001 ; Akbari et *al.*, 2007 ; Datta et *al.* 2009 ; Benderradji et *al.*, 2010).

D'après Datta et *al.*, (2009), le taux de germination des semences des variétés de blé dur est significativement affecté par le stress salin à partir de la concentration 75 mM. Quant au blé tendre, Benderradji et *al.* (2010) indiquent que la capacité germinative est affectée à partir de 100 mM de *NaCl* avec un effet remarquable à la concentration de 200 mM. Hakim et *al.* (2010) ont également observé une inhibition complète de la germination des semences de riz (plante modèle des céréales) au delà de 20 dS m⁻¹ correspondant à 200 mM de sel. Comparativement au blé tendre et à l'orge, Mallek-Maalej et *al.* (1998) ont démontré que le blé dur est le plus sensible au *NaCl*.

Khan et ses collaborateurs (2009) suggèrent que la germination des graines soumises au stress salin peut être inhibée par des déséquilibres dans les niveaux de régulateurs chimiques (hormones, bétaine, proline ect...). Par ailleurs, Hajlaoui et *al.* (2007) considèrent que la diminution du taux final de germination correspond soit à une augmentation de la pression osmotique externe, ce qui affecte l'absorption de l'eau par les graines et/ou bien à une accumulation des ions Na^+ et Cl^- dans l'embryon. Certains auteurs expliquent le retard de germination par la difficulté d'hydratation des semences et le temps nécessaire à la mise en place des mécanismes d'ajustement de la pression osmotique interne (Hajlaoui et *al.*, 2007 ; Delatorre-Herrera et Pinto, 2009 ; Jaouadi et *al.*, 2010).

L'effet du NaCl peut s'exercer sur les activités enzymatiques elles-mêmes, sur l'hydratation des protéines et sur le transport des produits de l'hydrolyse des réserves vers l'embryon (Hajlaoui et *al.*, 2007 ; Hardikar et Pandey, 2008). Il a été aussi suggéré dans les rapports récents que le sodium (Na^+) peut être lié aux granules d'amidon. Cette liaison empêcherait l'utilisation de l'amidon comme source d'énergie nécessaire à la germination des graines (Zhang et *al.*, 2010). Ultérieurement, l'effet toxique ou ionique peut conduire à l'altération de l'ensemble des processus métaboliques de la germination et du contenu ionique des graines et dans le cas extrême à la mort de l'embryon par l'excès des ions (Katambe et *al.*, 1998 ; Hajlaoui et *al.*, 2007).

Certains auteurs attribuent l'effet du sel sur la germination à l'effet osmotique ou à l'effet ionique ; Munns et *al.* (1995) *In*. Delatorre-Herrera et Pinto (2009) définissent l'effet total (ET) de la salinité sur la germination comme résultant de l'effet combiné des effets osmotique et ionique.

D'après Atia et *al.* (2006), la viabilité des graines n'est pas altérée par la salinité : une étude menée par Leatherwood et *al.* (2007) sur l'*Arabidopsis*, le tabac, le céleri et le chou a montré que quoique les graines n'aient pas germé à de fortes concentrations de NaCl, elles étaient encore métaboliquement actives, en raison du contenu en saccharose qui était deux à huit fois plus élevé que celui des graines non traitées. Cependant, il a été observé récemment chez une fabacée (*Cassia fistula* L.) par Hardikar et Pandey (2008) que les graines demeurant pendant quelques jours dans le sol contenant des concentrations élevées en sel sont devenues non-viables.

Plusieurs études ont indiqué que les semences des glycophytes telles le riz (Hakim et *al.*, 2010), le sorgho (Nawaz et *al.*, 2010), le niébé (Arulbalachandran et *al.*, 2009 ; Taffouo et *al.*,

2009), le colza (Athar et al., 2009), la betterave sucrière, le chou, l'amarante, le chou chinois (Jamil et al., 2006), le cyprès de l'été (Khan et al., 2009), le soja, le haricot, le mucuna (Taffouo et al., 2009), le pois chiche (Hadjlaoui et al., 2007), la canne à sucre et des halophytes telles l'alfalfa (Zhanwu et al., 2011), l'acacia (Ndour et Danthu, 1998 ; Jaouadi et al. 2010), l'atriplex (Ungar, 1996), l'okra (*Abelmoschus esculentus*) (Ben dkhil et Denden, 2010), *Crithmum maritimum* (Atia et al., 2011), *Chenopodium Glaucum* (Duan et al., 2004) et *Cakile maritima* (Debez et al., 2004), répondent de la même manière au stress salin, en réduisant le nombre total des graines germées et en retardant la germination.

Toutefois Benderradji et al. (2010) ont noté l'existence d'une interaction significative sel-génotype pour le taux ou le pourcentage de germination et que le génotype représente l'effet principal pour ce paramètre. Chérifi et al. (2011) et Mohamed et al. (2010) confirment que le ralentissement de la germination varie en fonction des génotypes. Cette dépendance est mentionnée aussi par Bajji et al. (2000) qui considèrent que le NaCl est plus nuisible pour la germination d'une espèce glycophyte comme le blé dur (*Triticum durum*) que pour celle d'une espèce halophyte tel que l'atriplex (*Atriplex halimus* L.). De plus, Delatorre-Herrera et Pinto (2009) signalent que les différences dans la germination observées entre les semences tolérantes ou sensibles pourraient être le résultat d'activation de différents mécanismes cellulaires dans les diverses parties de l'axe embryonnaire et ce, afin de tolérer le stress osmotique et ionique pendant ce stade.

En plus de l'effet du sel sur le taux de germination, il a été également remarqué un retard dans le temps de la germination (Atak et al. 2006), une diminution de la vitesse et de l'énergie de la germination (Hakim et al., 2010), un abaissement du contenu des graines en ions, une perturbation de la perméabilité membranaire (Atia et al., 2011 ; Zhanwu et al., 2011) et une réduction de la croissance des hypocotyles et de la radicule (Akbari et al., 2007).

Au final toute altération pendant le stade germination des semences peut se répercuter sur la croissance et le rendement du génotype.

► Effet de la proline exogène

L'effet négatif du stress salin sur le pourcentage de la germination semble être significativement atténué par un apport exogène en proline. En effet, les résultats relatifs à l'effet de l'addition exogène de cet acide aminé dans le milieu de culture montrent que la germination des semences est doublement améliorée. Nos résultats rejoignent ceux obtenus par des études antérieures : Bal, en 1976 a montré que le traitement des graines de colza

(*Brassica napus*) avec de la proline induit leur tolérance au sel (Roy et *al.*, 1993). Chez le riz (*Oryza sativa*), l'application exogène de 30 mM de proline a contrecarré les effets nuisibles de la salinité sur les graines en germination (Roy et *al.*, 1993).

Récemment, d'autres travaux rapportent l'efficacité de la proline sur la germination des graines soumises à une contrainte saline. Dans ce contexte, Athar et *al.*, (2009) ont montré que l'application exogène de la proline à une concentration de 1 à 5 mM atténue les effets inhibiteurs du stress salin sur la germination des graines chez deux variétés de colza. Les résultats enregistrés par Nawaz et *al.* (2010) montrent également que l'ajout de la proline dans une solution saline limite ces effets pendant le stade de germination des graines du Sorgho (*Sorghum bicolor*). Il a été suggéré de ce fait que la proline exogène induit la tolérance au stress salin au stade de germination.

L'effet améliorateur de la proline exogène sur la germination a été confirmé par l'étude de Deivanai et *al.* (2011), qui ont révélé une influence significative du prétraitement des graines du riz avec de la proline sur le pourcentage de germination.

De même, l'approvisionnement des graines de différentes espèces *Salicornia utahensis*, *Allenrolfea occidentalis*, *Halogeton glomeratus*, *Triglochin maritime* (Khan et Gul, 2006 ; Khan et *al.*, 2009) en proline exogène est efficace pour leur germination en conditions salines.

La proline exogène agirait en maintenant un meilleur statut hydrique entraînant ainsi l'équilibre osmotique dans les graines en germination (Kavi Kishore et *al.*, 2005 ; Deivanai et *al.*, 2011). Elle protégerait également les membranes contre la toxicité ionique et le stress oxydatif induit par le stress salin (Athar et *al.*, 2009).

Le rôle de la proline exogène au stade de germination a été aussi associé à son amélioration de la croissance des cellules (Athar et *al.*, 2009) et de leurs fonctions (Deivanai et *al.*, 2011). Zeid et *al.* (2011) ont constaté que sous l'effet de la proline exogène l'activité amylase (stimulée par l'acide gébbérikique), les teneurs en sucres solubles et en protéines solubles et la teneur en proline endogène ont augmenté d'une manière significative au niveau des semences de l'orge stressées et non stressées.

II. Stade croissance

II.1. Paramètres morphologiques

II.1.1. Effet de la proline exogène sur la croissance en longueur (*partie aérienne et partie racinaire*)

Sur le plan de la croissance, après 21 jours de croissance, la longueur de la partie aérienne et de la partie racinaire de la variété étudiée a été différemment affectée selon le lot. Cette discrimination est clairement observée dans la planche suivante, essentiellement dans la partie aérienne (planche 2) et est appuyée par une mesure centimétrique de l'allongement des feuilles et des racines

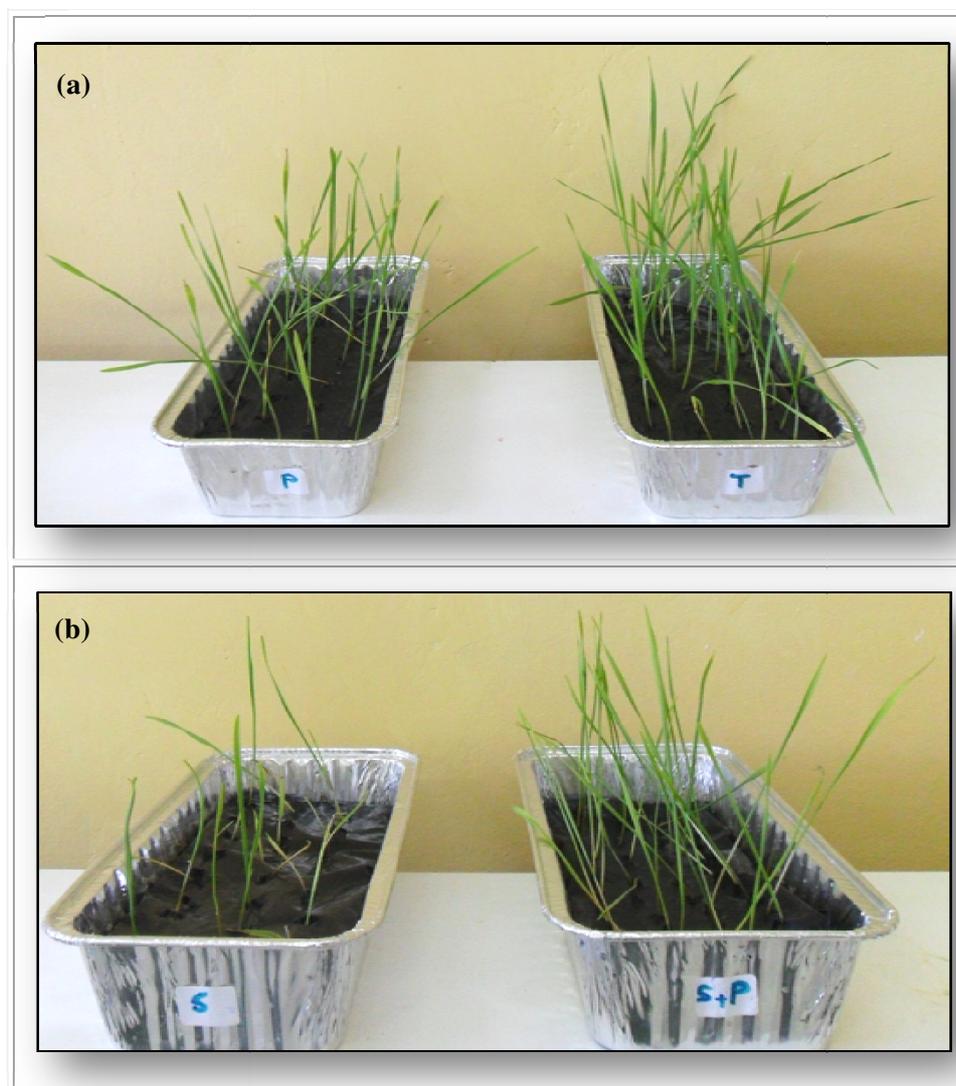


Planche 2. Effets de la proline exogène sur la croissance en longueur des plantules en conditions salines et non salines après 21 jours de croissance : (a) « *Témoin* » et « *Proline* » ; (b) « *Stressé* » et « *stressé + proline* ».

L'histogramme suivant représente les résultats obtenus concernant la croissance en longueur des plantules de blé (figure 25).

Il en ressort que le stress salin entraîne un raccourcissement au niveau de la partie aérienne. La longueur moyenne des jeunes plantes est de 4,87 cm pour le témoin et de 2,56 cm pour les plantules stressées soit une diminution de 47,38 %. Tandis que les plantules stressées ayant bénéficié d'un apport exogène en proline présentent une moyenne de 3,13 cm soit une augmentation de 22,03 % en comparaison avec les plantules soumises au sel. De même, le stress salin exerce un effet répressif sur la croissance de la partie racinaire. La longueur moyenne enregistrée est de 11,4 cm pour le témoin et de 6,40 cm pour les plantules stressées soit une diminution de 43,86 %. L'apport de la proline dans les conditions stressantes semble améliorer la longueur des racines qui atteint une moyenne de 8,10 cm soit une augmentation de 26,64 % par rapport aux plantules stressées (figure 25). Cependant, en conditions non stressantes la proline ne semble pas avoir un effet favorable sur la croissance.

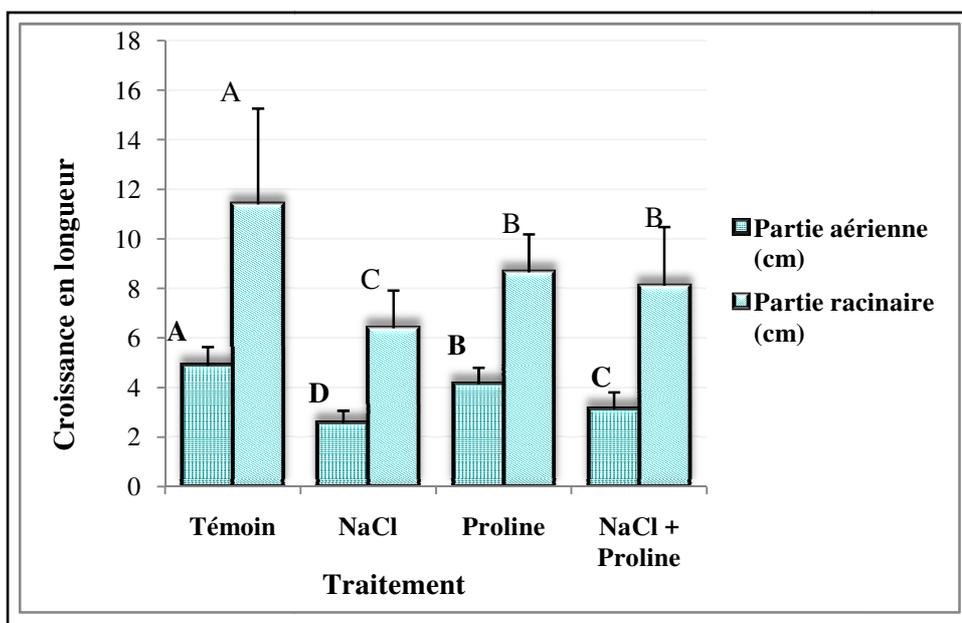


Figure 25. Impact de la proline exogène sur la croissance en longueur (partie aérienne et racinaire) des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.

L'analyse de la variance (ANOVA 1) montre une différence très hautement significative entre les traitements concernant la croissance en longueur de la partie aérienne et de la partie racinaire ($p=0,000$) (tableau 4 annexe V; tableau 6 annexe V). La comparaison des moyennes (Student-Newman-Keuls à 5 %) a permis de mettre en évidence quatre groupes homogènes pour la longueur de la partie aérienne des plantules (**A** : Témoin; **B** : Proline; **C** : NaCl +

Proline; **D** : *NaCl*) (tableau 5 annexe V), et trois groupes homogènes pour la partie racinaire (**A** : *Témoin* ; **B** : *NaCl + Proline* et *Proline* ; **C** : *NaCl*) (tableau 7 annexe V).

II.1.2. Effet de la proline exogène sur la croissance pondérale

■ Poids de matière fraîche (partie aérienne et partie racinaire)

Les résultats obtenus montrent que le poids moyen de matière fraîche de la partie aérienne varie de 0,018 g pour les plantules stressées à 0,052 g pour celles traitées avec de la proline. Les valeurs intermédiaires (0,047 g et 0,046 g) sont respectivement enregistrées dans le témoin et chez les plantules traitées en même temps avec le NaCl et la proline (figure 4). Le chlorure de sodium provoque une diminution de 61,68 % du poids de la matière fraîche par rapport au témoin, tandis que la proline exogène induit une augmentation de 156,79 % et de 191,22 % en présence et en absence du sel respectivement. On déduit que le stress salin affecte la masse fraîche de la partie aérienne et que la proline permet son amélioration dans les conditions stressantes et non stressantes.

Quant aux racines, le sel ne modifie pas leurs poids de matière fraîche par rapport au témoin. La présence de la proline dans la solution saline et non saline exerce un effet positif sur ce caractère. Les valeurs moyennes varient de 0,012 g pour les plantules stressées à 0,019 g pour les celles traitées avec la proline. Les valeurs intermédiaires sont de l'ordre de 0,013 g pour le témoin et de 0,020 g pour les plantules traitées simultanément avec de la proline et du sel (figure 26).

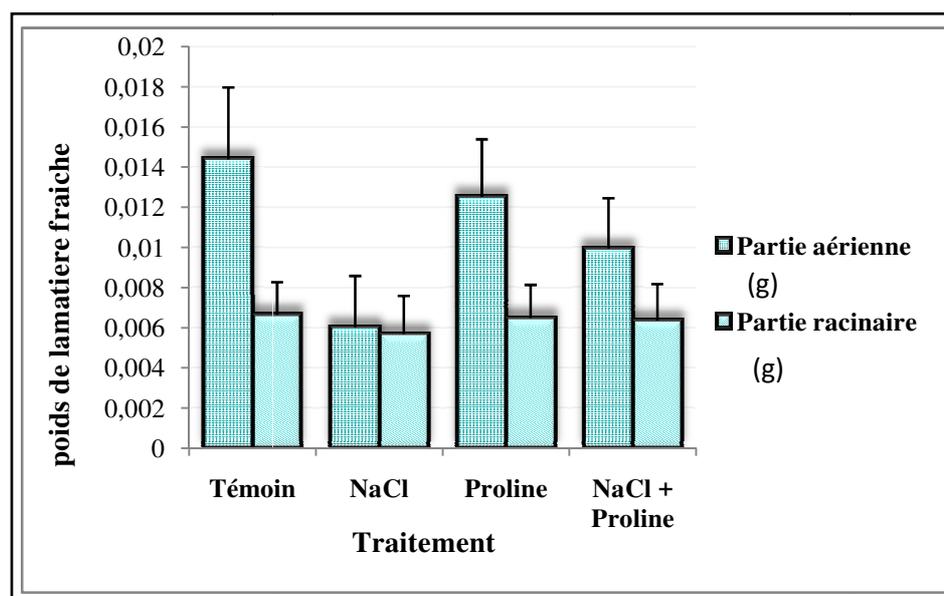


Figure 26. Impact de la proline exogène sur le poids de la matière fraîche (partie aérienne et partie racinaire) des plantules soumises à une contrainte saline.

Le test ANOVA 1 n'indique pas de différence significative entre les traitements concernant la matière fraîche de la partie aérienne et de la partie racinaire des plantules (tableau 8 et tableau 9 annexe V).

■ **Poids de matière sèche (partie aérienne et partie racinaire)**

Les résultats illustrés dans la figure 27 montrent que dans l'ensemble le sel provoque une diminution du poids de matière sèche de la partie aérienne et racinaire des plantules et que l'addition exogène de la proline entraîne son augmentation dans les plantules stressées.

Le poids moyen de matière sèche de la partie aérienne est de 0,0144 g pour le *témoin*, de 0,006 g pour le traitement « *NaCl* » soit une différence de 58,12 %, et il est de 0,012 g pour le troisième traitement « *proline* » et de 0,009 g pour le dernier traitement « *NaCl + proline* » soit une augmentation de 65 % par rapport aux plantules stressées.

Pour ce qui est du poids de matière sèche de la partie racinaire, la moyenne la plus élevée est enregistrée au niveau du témoin (0,006 g) et la plus faible est obtenue dans la solution saline (0,005 g). L'addition de proline exogène dans la solution saline induit une augmentation de 11,77 % dans la matière sèche des racines (figure 27).

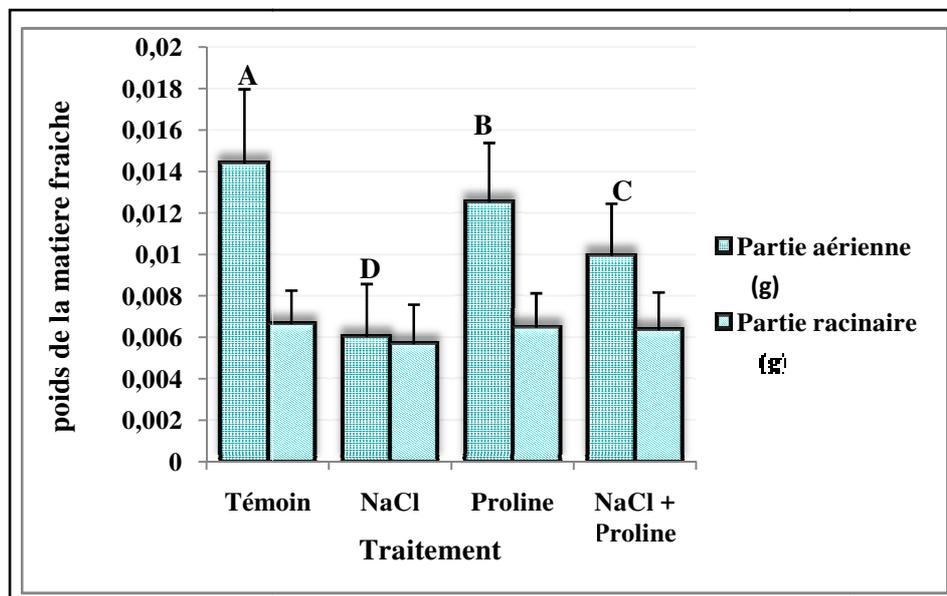


Figure 27. Impact de la proline exogène sur le poids de la matière sèche (partie aérienne et partie racinaire) des plantules soumises à une contrainte saline.

L'analyse de la variance à un seul critère de classification révèle que l'existence de différence significative entre les traitements concernant le poids de matière sèche de la partie aérienne des plantules ($p = 0,000$) (tableau 10 annexe V). Cependant, aucune différence significative n'a été inscrite dans la partie racinaire ($p = 0,332$) (tableau 12 annexe V).

Le test de Student-Newman-Keuls (5 %) a fait ressortir quatre groupements homogènes pour le poids de matière sèche de la partie aérienne: le groupement **A** représenté par le traitement « *Témoin* », le groupement **B** représenté par « *Proline* », le groupement **C** correspond au traitement « *NaCl + proline* » et le groupement **D** correspond au traitement « *NaCl* » (tableau 11 annexe V).

II.1.3. Effet de la proline exogène sur la surface foliaire (SF « cm^2 »)

Les mesures de la surface foliaire présentent aussi des variations notables qui sont illustrées dans la figure 28.

La surface foliaire varie entre 0,83 et 2,40 cm^2 . Les plantules non stressées (témoin) présentent la valeur maximale qui est de 2,40 cm^2 . Quant aux plantules stressées au chlorure de sodium, la surface foliaire est largement diminuée jusqu'à 0,83 cm^2 soit une baisse de 65,32 % comparativement au témoin.

En présence de 20 mM de proline, les plantules stressées ont augmenté leurs surfaces foliaires jusqu'à atteindre 1,95 cm^2 soit une augmentation de 133,76 %. (Figure 28).

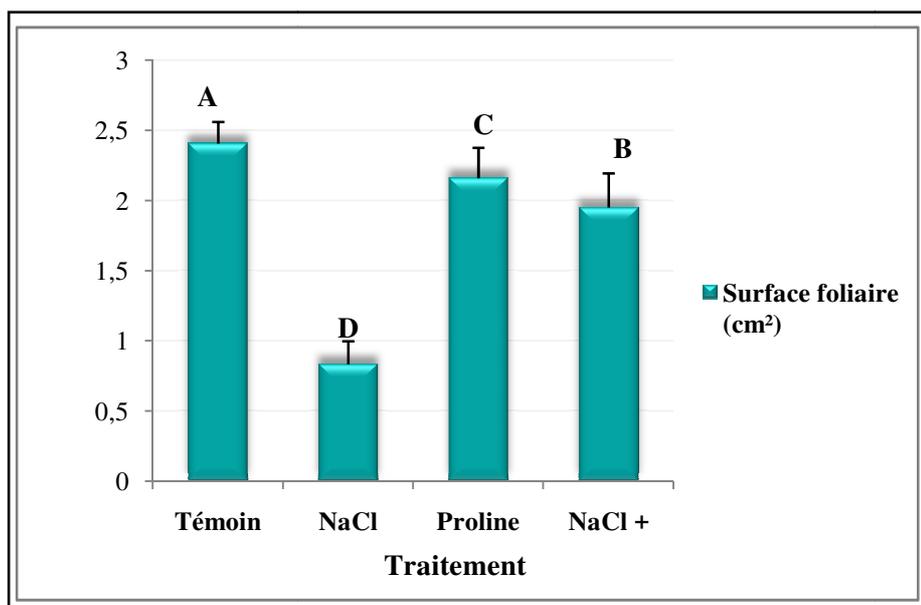


Figure 28. Impact de la proline exogène sur la surface foliaire des plantules du blé dur soumises à une contrainte saline.

L'analyse statistique à un seul critère de classification (ANOVA 1) nous a révélé une différence très hautement significative vis-à-vis de ce caractère (SF) ($p = 0,000$) (tableau 13 annexe V).

Le test de Student-Newman-Keuls au seuil de 5 % a montré l'existence de quatre sous-ensembles homogènes (**A** : *Témoin* ; **B** : *NaCl + Proline* ; **C** : *Proline* ; **D** : *NaCl*) (tableau 14 annexe V). Cette classification indique que l'apport de la proline induit un changement révélateur de la surface foliaire des jeunes plantes soumises à une contrainte saline

➔ Discussion

➤ Effet du stress salin

Sur le plan morphologique, le stress salin induit par le chlorure de sodium a retardé la croissance des plantules de blé qui s'est traduit par une réduction de la longueur de la partie aérienne et de la partie racinaire.

Notre résultat rejoint celui obtenu par Datta et *al.* (2009) qui ont montré que la croissance en longueur de la tige et des racines de blé est réduite par le sel. Il a été noté que cette croissance est affectée à partir de 50 mM de NaCl et qu'elle est complètement inhibée à partir d'une concentration de 125 mM. Beldjoudi (2001) a constaté que le sel retarde la croissance de la partie aérienne des tiges de blé dur (variété Waha) et réduit considérablement sa hauteur. L'étude de Kadri et *al.* (2009) a permis aussi de mettre en évidence l'influence de la salinité sur la croissance de quelques accessions de l'orge, cependant l'allongement de la partie souterraine des plants varient en fonction du génotype.

Dans le présent travail, le stress salin a provoqué un effet plus prononcé sur la longueur de la partie racinaire qui est directement exposé à la solution saline, concordant ainsi avec les résultats de Jamil et *al.* (2006), d'El Midaoui et *al.* (2007) et de Datta et *al.* (2009).

En plus de la croissance en longueur, il a été montré que l'imposition de la salinité dans le milieu racinaire a un effet négatif sur le poids de matière fraîche et sèche des plantules. Des résultats similaires ont été observés sur la croissance pondérale de la matière fraîche et sèche de l'orge (Zeid, 2011), du sorgho (Gill et *al.*, 2001 ; Nawaz et *al.*, 2010), du riz (Chutipaijit et *al.*, 2011 ; Nounjan et Theerakulpisut, 2011) et du soja (Amirjani, 2010).

La réduction de la croissance des plantes en hauteur et en poids a été attribué au ralentissement de l'absorption de l'eau due à l'effet osmotique du sel, à l'absorption nutritive

non équilibrée par les racines causée par le déséquilibre ionique conduisant ainsi à une insuffisance en certains éléments nutritifs (Bajji et *al.*, 2000 ; Houimli et *al.*, 2008 ; Datta et *al.*, 2011), et aussi à la diminution de nombreuses activités métaboliques des cellules et de la fonction des macromolécules (Kumar et *al.*, 2005 ; Nawaz et *al.*, 2010). Houimli et *al.* (2008) et Deivanai et *al.* (2011) suggèrent que le stress osmotique est dû principalement à une séquestration des ions de sodium et de chlore dans la vacuole induisant ainsi une diminution du potentiel osmotique interne, qui sera à l'origine d'une déshydratation partielle du cytoplasme. Cette déshydratation conduit alors à une altération du métabolisme cellulaire et par conséquent à une réduction de la croissance. Houimli et *al.* (2008) ajoutent que le NaCl empêche la croissance en réduisant la division et l'agrandissement cellulaires.

Selon Levitt (1980), la croissance est d'autant plus réduite que la plante est sensible à l'effet spécifique de l'ion en excès dans ses tissus. L'entrée massive de Na⁺ entraîne quelques symptômes de toxicité chez les espèces tolérantes ; chez les glycophytes, elle cause par contre une sévère réduction de la croissance voire la mort des plantules (Allaoui, 2006).

Selon Zhu (2001), la réduction de la croissance est une capacité adaptative nécessaire à la survie d'une plante exposée à un stress abiotique, lui permettant ainsi d'éviter les dommages engendrés lors d'un stress notamment le stress salin (Zhu, 2002). En effet, les stratégies mises en œuvre pour maintenir l'homéostasie en condition de stress hydrique ou ionique sont consommatrices d'énergie et des ressources qu'elles détournent aux dépens de la croissance (Munns, 2002).

D'après nos résultats, l'action du sel est plus marquée sur le poids de matière fraîche et sèche de la partie aérienne que sur celui de la partie racinaire dont la réduction est relativement faible. Ce résultat rejoint ceux d'Ouerghi et *al.* (2000) et Atak et *al.* (2006) qui rapportent que les parties aériennes de blé sont nettement plus sensibles au sel que les racines. La même observation a été faite chez la tomate (Salim, 1989 ; Manaa et *al.* 2011), le tournesol, le niébé et le haricot (Salim, 1989).

Le rapport élevé de racine/tige comme conséquence du stress salin, est dû à une forte réduction de la croissance de la tige que celle de la racine. Manaa et *al.* (2011), rapportent que les concentrations les plus élevées de Na⁺ et de Cl⁻ se retrouvent au niveau des tiges et des feuilles et que c'est l'un des effets nocifs de la salinité sur la croissance des plantes.

Abo-kassem (2007) rapporte que la croissance plus importante des racines est une stratégie d'adaptation des plantes leur permettant d'aller à la recherche de l'eau. Tammam et *al.* (2008)

au contraire ont démontré que chez le blé, la racine était l'organe le plus sensible au sel. Un résultat similaire a été enregistré par Mane et *al.* (2011) chez une autre graminée (*Pennisetum alopecuroides*).

En termes de poids de matière sèche, la concentration élevée de NaCl exerce un effet défavorable sur les tiges et les racines des plantules de blé. Cette observation rejoint celle de Moud et Maghsoudi (2008) qui ont noté une diminution de poids de matière sèche au niveau des différents génotypes de blé étudiés. Gupta et Srivastava (1990) ont noté une corrélation entre la diminution du poids de matière sèche des tiges et des racines et celle de leurs longueurs avec toutefois un effet plus prononcé du sel sur les longueurs.

La réduction du poids de matière sèche des plantes est une réponse typique des non halophytes à la salinité et son estimation peut servir pour évaluer l'effet de la salinité sur la croissance (Viégas et Silveira 1999).

La contrainte saline appliquée aux plantules de blé a engendré une réduction significative de leur surface foliaire. Cet impact du stress salin sur la croissance des feuilles a été rapporté par plusieurs auteurs chez de nombreuses espèces : le blé dur et le blé tendre (Ben Naceur et *al.*, 2001 ; Benderradji et *al.* 2010 ; Fercha, 2011a), l'orge (Kadri et *al.*, 2009), la luzerne (Abdelly, 1995), l'acacia (Hardikar et Pandey, 2008), le vulpin, le riz, le maïs, la tomate, le pois chiche et la pervenche de Madagascar (Mane et *al.*, 2011).

D'après Slama et *al.* (2008), les plantes stressées par le sel sont beaucoup plus sensibles que celles confrontées au problème de la sécheresse en termes de développement de la surface de la feuille.

La réduction de la surface foliaire peut résulter d'un ralentissement de la vitesse de croissance foliaire (Loussaief et *al.*, 2009), d'une diminution de l'expansion et de la division cellulaires (Poormohammad Kiani, 2007 ; Zgallaï et *al.*, 2007), d'une sénescence accélérée de la feuille (Attia, 2007), ou de changements anatomiques (Diakalia et *al.*, 2011).

L'effet du sel sur les feuilles est souvent associé à la composante osmotique du stress salin plutôt qu'à l'effet toxique ou spécifique du sel (Munns, 2002 ; Benderradji et *al.*, 2011).

Doudech et *al.* (2008) considèrent que la réduction de la surface foliaire est l'un des signes de stress les plus évidents au niveau de la végétation soumise à une contrainte saline. D'autres la considèrent comme un critère de tolérance au sel (Ben Naceur et *al.*, 2001) puisque une

telle réduction permet aux plantes de limiter leur perte en eau par transpiration et de garder une certaine hypertonie (Mekliche et *al.*, 2003 ; Chaumeil, 2006 ; Attia, 2007 ; Belkharchouche et *al.* 2009 ; Loussaief et *al.*, 2009). Selon Alem et *al.* (2002) cette diminution de la surface transpirante se présente comme étant la principale stratégie développée par le blé dur et le blé tendre pour atténuer les effets limitatifs de la disponibilité de l'eau dans les conditions de stress salin.

La réduction de la surface de l'appareil foliaire peut provoquer une diminution du rendement à cause de la réduction de la capacité photosynthétique (Mefti et *al.*, 2001 ; Mekliche et *al.*, 2003 ; Hardikar et Pandey, 2008 ; Kachout et *al.*, 2009 ; Ali, 2011) ; en effet, quand la surface foliaire est réduite par la salinité, la production des hydrates de carbone devient insuffisante pour supporter la croissance et le rendement (Radhouane, 2008).

Les effets de la salinité sur la croissance des plantes seraient liés à l'induction de la synthèse de l'acide abscisique (inhibiteur de la croissance) qui cause la sénescence précoce des feuilles, la réduction de la surface foliaire et la fermeture des stomates entraînant ainsi la diminution de la photosynthèse (Azeem et Ahmad, 2011).

➤ Effet de la proline exogène

D'après les résultats obtenus, il ressort que l'addition de la proline dans le milieu de culture en conditions salines se montre relativement efficace en raison de son amélioration des paramètres de croissance des plantules notamment la croissance en longueur, la croissance pondérale de la partie aérienne et de la partie racinaire et aussi la surface foliaire. En termes de la croissance en longueur, la proline exogène (20 mM) a entraîné une augmentation significative au niveau de la partie aérienne et de la partie racinaire. Deivanai et *al.* (2011) et Nawaz et *al.* (2010) rapportent que l'application exogène de la proline a un impact positif sur la longueur des tiges et des racines chez le riz et le Sorgho respectivement.

Concernant le poids de matière fraîche et sèche des plantules, une augmentation a été obtenue sous l'effet de la proline. Toutefois, cette augmentation ne paraît pas significative exception faite pour le poids de matière sèche de la partie aérienne sur lequel la proline a exercé un effet significatif. Certains auteurs ont mis en évidence l'intervention de la proline exogène dans l'amélioration de la croissance pondérale des plantules conduites sous un régime salin. Par exemple, Athar et *al.* (2009) ont observé un perfectionnement significatif de la croissance (poids de matière fraîche et sèche) des plantules stressées de deux variétés de colza (*Brassica napus*) suite à l'application externe de la proline à une concentration de 1 et

de 5 mM. Chez le tabac (*Nicotiana tabacum*), Okuma et al., (2004) ont observé que la proline exogène (20 mM) permet de lever l'inhibition imposée par une concentration élevée du sel (200 mM) et que le poids de matière fraîche de ces cellules de tabac augmente davantage en présence de la proline exogène durant les 10 jours de culture. Ce résultat est confirmé par Reza et al. (2006) qui ont démontré que la présence de 5 mM de proline dans le milieu de culture entraîne une hausse de 15 % à 20 % dans la matière fraîche aérienne de deux variétés de l'orge (*Hordeum vulgare*) soumises à une concentration de 200 mM de NaCl. De même, Khedr et al. (2003) ont apporté que 5mM de proline exogène améliore significativement le poids de matière fraîche de la partie aérienne des plantules de *Pancratium maritimum* L. sévèrement stressées par 300 mM de NaCl.

Antérieurement, Okuma et al. (2000) ont signalé l'effet positif de la proline exogène (1 et 10 mM) sur le poids de matière fraîche des cellules de tabac cultivées sur un milieu salin et non salin.

Dans une analyse de l'effet bénéfique de la proline exogène dans des conditions salines, Huang et al. (2009) considèrent que son rôle essentiel se situe au niveau de l'amélioration du statut hydrique de la plante puisque la réduction initiale de la croissance après l'imposition d'un stress salin résulte de son effet osmotique. Selon Nawaz et al. (2010), le rôle de la proline exogène sur la croissance consiste en son intervention dans la protection des cellules contre les effets délétères du sel par le maintien de l'équilibre osmotique et par la stabilisation des structures subcellulaires.

Par ailleurs, certaines études suggèrent que la proline exogène participe à la diminution des de l'accumulation des ions Na^+ et de Cl^- dans la plante et de ce fait augmente la croissance dans les conditions salines (Reza et al., 2006). Par exemple, Prasad et Potluri (1996) ont montré que la fourniture de la proline exogène ou bien de son analogue l'hydroxyproline aux cultures de bourgeons axillaires de pomme de terre (*Solanum tuberosum*), permet la réduction du niveau de sodium comparé aux niveaux obtenus sous l'effet exclusif du sel. Ce résultat est confirmé par Abd El-Samad et al. (2010) qui ont constaté que l'apport foliaire de cet acide aminé dans les plantes de maïs et de fève en conditions salines limite leur absorption en Na^+ et augmente leur absorption en K^+ , leur rapport K^+ / Na^+ et leur sélectivité pour le Ca^{++} et le P.

D'autres chercheurs comme Yan et ses collaborateurs (2011) associent le rôle de la proline exogène vis-à-vis de la croissance pondérale à son action en tant que nutriment et à sa contribution dans la division et l'agrandissement cellulaires dans les conditions non

stressantes. D'autre part en conditions salines, ils considèrent que la proline exogène agit aussi en tant qu'antioxydant intervenant dans quelques mécanismes de défense dans les plantules endommagées par l'effet du stress salin. Ces mécanismes consistent en :

- L'élévation de la photosynthèse ;
- Le maintien des activités enzymatiques ;
- Et, l'élimination ou détoxification des espèces réactives de l'oxygène.

Ali *et al.* (2007) et Kaya *et al.* (2007) suggèrent que la proline exogène fournit de l'énergie pour la croissance et la survie des plantes stressées contribuant de ce fait dans leur tolérance au stress salin ou hydrique.

Cependant, Nounjan et Theerakulpisut (2011) ont observé que la proline exogène apportée dans le milieu de culture de riz (*Oryza sativa* L.) n'avait aucun effet bénéfique sur sa croissance. Khedr *et al.* (2003) ont signalé que le poids de matière sèche des jeunes plantes de *Pancreaticum maritimum* n'est pas affecté par l'apport externe de la proline en condition saline et non saline.

II.2. Paramètres physiologiques

II.2.1. Effet de la proline exogène sur la teneur relative en eau (TRE « % »)

Les résultats observés pour ce paramètre sont apportés dans la figure 29.

Les moyennes de la teneur relative en eau obtenues varient de 66,53 % à 95,17 %. La teneur la plus faible est notée dans le traitement « NaCl », tandis que la plus élevée est enregistrée dans le témoin. Les valeurs intermédiaires sont de 88,71 % pour le traitement « proline » et de 70,89 % pour « NaCl + proline » (figure 29).

Ces résultats montrent que d'une part le chlorure de sodium provoque une réduction dans la teneur hydrique des plantules par rapport au témoin. La réduction est de l'ordre de 30,08 %.

D'autre part, l'application exogène de la proline en conditions stressantes semble atténuer l'effet négatif de NaCl sur la teneur hydrique comparativement aux plantules stressées. L'augmentation enregistrée dans la TRE sous l'effet de la proline est de l'ordre de 33,32 % et de 6,55 %, en absence et en présence d'une contrainte saline respectivement (figure 29).

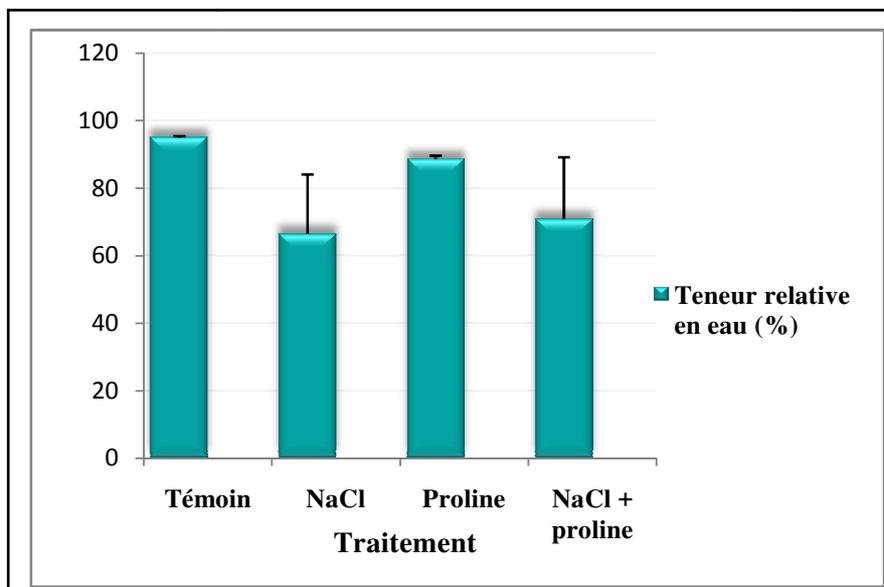


Figure 29. Impact de la proline exogène sur la teneur relative en eau des plantules de blé dur soumises à une contrainte saline.

L'analyse de ces résultats par le test ANOVA à un seul critère de classification montrent que l'application externe de la proline ne provoque pas de différence significative ($p=0,424$) dans la teneur relative en eau des plantules soumises à une contrainte saline (tableau 15 Annexe V).

➔ Discussion

➤ Effet du stress salin

L'estimation du statut hydrique des plantes se fait généralement par la mesure de la teneur relative en eau (TRE) qui est considérée par plusieurs chercheurs comme un bon indicateur de l'état hydrique du végétal (Mefti et *al.* 2001 ; Lauchli et Grattan, 2007 ; Hassani et *al.* 2008 ; Abdelmalek et Khaled, 2011).

Nos résultats concernant ce paramètre indiquent que le stress salin provoque une diminution dans le contenu hydrique des feuilles de blé ; mais cette diminution est non significative sur le plan statistique. Abdelmalek et Khaled (2011) ont montré l'effet négatif du sel sur la teneur relative en eau des plantes de blé dur soumises à un régime salé. Chez le blé tendre, le stress salin a entraîné une réduction significative de la teneur relative en eau (El-Bassiouny et Bekheta, 2005 ; Benderradji et *al.*, 2011). Un même résultat a été observé chez d'autres espèces : l'Orge (Hassani et *al.*, 2008), le melon (Kaya et *al.*, 2007), le concombre (Huang et *al.*, 2009), l'olivier (Ben ahmed et *al.*, 2010), l'acacia (Hardikar et Pandey, 2008),

l'atriplex (Soualmi, 2009), le niébé (Osmane, 2009), l'alfalfa (Mezni et al., 2010), le pistachier (Karimi et al., 2009), le pourpier (Yazici et al., 2007), le sarrasin (Jovanović et al., 2011), la lis de mer (*Pancratium maritimum*) (Khedr et al., 2003).

Certaines études rapportent que cette diminution de la TRE chez le blé dur est plus rapide dans les variétés sensibles que les variétés résistantes (El-Bassiouny et Bekheta, 2005 ; Mouellef, 2010).

Il a été démontré que plus le stress salin s'intensifie plus la teneur relative en eau chute (El-Bassiouny et Bekheta, 2005 ; Jamil et al., 2008 ; Soualmi, 2009).

D'après Turkan et Demiral (2009), la perte du contenu intracellulaire en eau dans les plantes est l'une des principales conséquences du stress salin sur les plantes. En effet, le sel affecte négativement le flux de l'eau vers les racines des plantes (Seaman, 2004), ce qui réduit leur aptitude à absorber l'eau (Mahajan et Tuteja, 2005) et leur potentiel hydrique (Maia et al., 2010).

La diminution de la teneur relative en eau indique une perte de la turgescence qui a comme résultat une faible disponibilité de l'eau pour les processus d'expansion cellulaire (Benderradji et al., 2011), une réduction rapide de la croissance et une induction de changements métaboliques (Seaman, 2008 ; Xiao-Hua et al., 2009 ; Le et al., 2011 ; Mane et al., 2011). Il en ressort alors que l'effet inhibiteur du NaCl sur la croissance des plantes passe par une perturbation de leur alimentation en eau. Rappelons que cette dernière est d'une part, essentielle pour tous les processus physiologiques de la plante entière, et d'autre part elle constitue le milieu principal de transport des métabolites et des nutriments au niveau cellulaire (Bartels et Souer, 2004).

Divers auteurs mentionnent que c'est la capacité de succion développée par les racines qui conditionne le maintien d'un bon potentiel hydrique au niveau des feuilles chez les plantes soumises à un stress hydrique ou salin (Alem et al., 2002).

Par ailleurs, Hassani et al. (2008) ont observé que la TRE dans la feuille diminue légèrement chez les génotypes d'orge stressés à la salinité à partir de 200 mM. D'après les mêmes auteurs, cette diminution semble être un comportement de résistance au stress salin par lequel la plante limite ses pertes hydriques. Ils expliquent que l'absorption d'eau est maintenue à un niveau suffisant pour éviter la déshydratation des tissus de la plante et pour établir le phénomène de succulence.

D'après Mane et *al.* (2011), les plantes ne peuvent pas maintenir leur statut hydrique à de fortes concentrations de sel ce qui se traduit par sa diminution lorsque le stress est sévère. Tandis que l'augmentation de leur contenu hydrique à de faibles niveaux de salinité pourrait être une adaptation par l'ajustement osmotique (accumulation des solutés organiques), qui permet aux plantes de maintenir leur absorption en eau et leur turgescence. Cette capacité de maintenir le niveau hydrique permettant aux feuilles de conserver leur état de turgescence est considérée comme un critère d'adaptation à la sécheresse et donc à la salinité. Selon Huang et *al.* (2009), le statut hydrique est extrêmement sensible à la salinité et est, donc, dominant dans la détermination des réponses de la plante au stress.

Un déséquilibre dans le potentiel osmotique aurait comme conséquence la dégradation des cellules et dans le cas extrême la mort cellulaire (Deivanai et *al.*, 2011).

➤ Effet de la proline exogène

En présence de proline exogène dans le milieu, la quantité d'eau contenue dans les feuilles de blé stressé (TRE) n'est pas significativement augmentée, ce qui signifie que la proline exogène n'exerce pas d'effet améliorateur vis-à-vis du statut hydrique des plantules soumises à la salinité. Une même observation a été apportée par Okuma et *al.* (2000) qui ont noté l'absence de différence dans le contenu hydrique des cellules de tabac stressées (100 mM de NaCl) et celui des cellules stressées et additionnées de proline (100 mM de NaCl + 10 mM de L-proline). Cela est dû d'après les mêmes auteurs au fait que les concentrations de cations (K^+ et Na^+) dans les cellules (sélectionnées préalablement comme inadaptées au sel) cultivées sur un milieu contenant ou pas de proline exogène sont similaires. Il a été donc considéré que la proline ne joue pas un rôle important dans le maintien de potentiel osmotique, la proline exogène interviendrait néanmoins dans la protection des enzymes et des membranes cellulaires.

En revanche, plusieurs études ont démontré que la proline exogène améliore significativement la teneur relative en eau des plantes confrontées au stress salin. Ce qui est en contradiction avec notre résultat. Par exemple Huang et *al.* (2009) ont enregistré l'augmentation de la teneur relative en eau des plantes de concombre (*Cucumis sativus*) conduites en culture hydroponique sur un milieu nutritif additionné de 100 mM de NaCl et de 10 mM de proline. Chez le melon (*Cucumis melo*), Kaya et *al.* (2007) ont aussi noté l'effet positif d'un apport externe de proline (10 mM) dans la solution nutritive vis-à-vis la TRE des plantes soumises à l'effet de sel (150 mM de NaCl). Des résultats similaires ont été obtenus

dans différentes espèces par d'autres chercheurs : l'orge (Zeid, 2011), l'olivier (Ben Ahmed et *al.*, 2010), le colza (Athar et *al.*, 2009), le maïs et la fève (Abd El-Samad et *al.*, 2011) et le *Pancreaticum sp.* (Khedr et *al.*, 2003).

Récemment, Bekka (2012) a également mis en évidence le rôle améliorateur de la proline exogène (1 mM / 2 mM) de la teneur relative en eau des plantules de blé tendre et de lentille dans les conditions de stress osmotique induit par le polyéthylène glycol (PEG).

D'après Athar et *al.* (2009), la proline exogène pourrait maintenir un meilleur statut hydrique des plantes par l'augmentation de l'absorption de l'eau et la réduction de sa perte dans les conditions de stress salin. De plus, la proline exogène pourrait aussi améliorer le statut hydrique par la réduction de la transpiration à travers son effet sur la régulation de l'ouverture stomatique (Kaya et *al.*, 2007).

Selon Khedr et *al.* (2003), la capacité de la proline exogène à maintenir une teneur élevée en eau dans les jeunes plantes sévèrement stressées pourrait être attribué à sa contribution à l'ajustement osmotique directement en augmentant la teneur en proline endogène et indirectement en augmentant le contenu interne en d'autres acides aminés. Verbruggen et *al.* (1996) admettent l'existence d'une corrélation linéaire et directe entre la teneur en eau des différents organes d'*Arabidopsis* et leur teneur en proline libre.

Huang et *al.* (2009) considèrent que l'amélioration de la tolérance des plantes de concombre au sel par l'application de la proline exogène peut être partiellement associée à la forte TRE des feuilles. Toutefois, la contribution relative des solutés organiques notamment la proline dans l'ajustement osmotique varie selon les espèces, les variétés et selon les organes au sein d'une même plante (Ashraf, 2004 ; Raza, 2006).

II.3. Paramètres biochimiques

II.3.1. Effet de la proline exogène sur la teneur en pigments chlorophylliens

■ Chlorophylle a et chlorophylle b

Les teneurs en chlorophylle (a) et (b) présentent aussi des variations entre les différents traitements qui sont illustrées graphiquement dans la figure 30. Les résultats enregistrés montrent une nette diminution de la chl (a) (- 35,42 %) et de la chl (b) (- 58,51 %) sous l'effet du sel (NaCl) par comparaison au témoin.