

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

Thèse de doctorat en Biotechnologies Végétales

Sujet :

**Contribution à la compréhension de l'effet de la proline exogène
sur le blé dur soumis à une contrainte saline**

Par: **Katia AMI**

Soutenu devant le jury composé de :

Président	Pr KHELIFI Lakhder	ENSA Alger
Directeur de thèse	Pr ABROUS-BELBACHIR Ouzna	USTHB Alger
Co-encadreur	Pr KHELIFI Majda	ENSA Alger
Examinateur	Pr MEFTI Mohamed	ENSA Alger
Examinateur	Pr KAMELI Abdelkrim	ENS de Kouba
Examinateur	Pr MAHDID Mohamed	ENS de Kouba
Invité	Pr CAROL Pierre	Sorbonne université, Paris
Invité	Pr DJEBBAR Reda	USTHB Alger

ENSA, le 21/01/2023

Remerciements

Tous mes remerciements vont à mes parents pour leur soutien, encouragements et leur aide depuis le début et tout au long de mon parcours. Rien ne saurait exprimer la fierté, la grande affection et reconnaissance que je vous porte. Que Dieu vous accorde santé et longue vie.

Je voudrais remercier vivement mon co-encadreur Mr CAROL professeur à Sorbonne université de Paris d'avoir accepté de m'accueillir au sein de l'équipe APCE dans le cadre de ce projet. Je tiens à vous exprimer ma grande reconnaissance pour votre encadrement, suivi et disponibilité tout au long de mes stages pratiques malgré vos occupations et engagements pédagogiques et scientifiques. Merci pour la formation scientifique et technique, vos corrections continues et la rédaction de notre article ainsi que pour tous vos conseils judicieux qui ont permis assurément d'aboutir à ce travail et d'améliorer mes acquis. Je tiens à vous témoigner ma grande gratitude pour votre soutien et pour tous les moyens mis à ma disposition pour la réalisation des manipulations et d'avoir fait le nécessaire pour l'obtention et la mise en marche du spectrophotomètre à flamme. Merci de m'avoir initiée à la technique Western Blot et pour votre agréable compagnie. Je suis honorée d'être votre stagiaire, vous étiez toujours disponible pour répondre à toutes mes requêtes. Merci beaucoup pour vos qualités humaines, pour votre soutien dans la procédure administrative relative à mon accueil et pour l'attention que vous avez accordé à l'élaboration de ce travail de recherche.

Je tiens à remercier le Pr SAVOURE responsable du laboratoire d'adaptation aux contraintes environnementales (APCE) à Sorbonne Université de m'avoir fait confiance en m'accueillant au sein de son équipe. C'était une vraie opportunité pour moi d'avoir intégré votre équipe et j'ai grandement apprécié de travailler avec tous ses membres. Vous trouvez ici mon respect et ma reconnaissance.

Je présente mes sincères remerciements à Séverine PLANCHAIS et Cécile CABASSA de m'avoir aidée à prendre mes repères au sein du laboratoire et de m'avoir initiée et formée aux techniques de biologie moléculaire et de physiologie notamment l'extraction des ARN et la préparation des RT-PCR, le dosage des différents paramètres et la technique de purification des mitochondries. Une grande gratitude pour le sacrifice, le suivi et l'aide que vous m'apportez au cours des manipulations. Merci pour vos précieux conseils, les échanges scientifiques, pour les relectures et pour le temps que vous avez consacré à la réalisation de ce travail tout au long de mon séjour scientifique au sein de l'équipe. J'ai beaucoup apprécié travailler avec vous et de partager le même bureau avec vous, merci à vous deux. Un grand merci Anne GUIVARCHE enseignante et chercheuse à l'équipe pour sa participation et son aide scientifique et matérielle pour la préparation et l'observation microscopique des racines de nos plantes et pour sa sympathie. Je tiens également à remercier Mr Régis MALDINEY de m'avoir initiée à la technique RT-qPCR et pour ses divers conseils. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes ma grande reconnaissance pour leur contribution dans ce travail. Merci à toute l'équipe pour leur sympathie et pour les moments partagés lors des pauses déjeuners.

Mes respects et remerciements vont également à Mme Anne-Alienor Very Professeure à l'université de Montpellier d'avoir accepté de nous apporter plus d'éclaircissements sur les transporteurs de sodium HKT son domaine de compétence et pour la relecture de notre article. Qu'elle trouve ici ma grande reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent aussi à ma directrice de thèse Mme ABROUS professeur à l'USTHB de m'avoir confiée ce projet et qui m'a accueilli au sein de son équipe. Merci de m'avoir initiée à la recherche et en physiologie végétale, pour vos encouragements et votre encadrement ainsi que vos conseils et vos relectures tout au long de ces années malgré vos occupations. Je suis reconnaissante pour vos disponibilités, votre aide et soutien ainsi que pour vos qualités humaines.

C'est également avec plaisir que je remercie Mme KHELIFI, professeur à l'ENSA, de m'avoir fait l'honneur de participer à ce travail en qualité de co-encadreur et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce projet malgré ses occupations. Merci pour votre gentillesse, vos relectures et pour votre disponibilité.

Je remercie cordialement Mr KHELIFI professeur à l'ENSA d'Alger d'avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de soutenance. Je tiens également à le remercier pour son soutien en acceptant de m'accueillir au sein du laboratoire des ressources génétiques et biotechnologies.

Je présente également mes sincères remerciements à Mr MEFTI Maître de conférence à l'ENSA d'Alger d'avoir accepté d'examiner ce travail. Je le remercie pour le temps qu'il a accordé à la lecture de cette thèse.

Mes sincères remerciements à Monsieur KAMEI Professeur à l'ENS de Kouba pour avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examineur et pour le temps qu'il a accordé à la lecture de cette thèse.

Je tiens à remercier aussi Mr MAHDID Maître de conférence à l'ENS de KOUBA d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail et pour le temps qu'il a accordé à la lecture de ce document.

Mes remerciements vont également à Mr Djebbar professeur à l'USTHB pour ses conseils scientifiques, ses encouragements et ses motivations et pour avoir accepté notre invitation pour faire partie de jury.

Merci à tous mes collègues et amis de l'équipe ressources génétiques et biotechnologie de l'ENSA et de l'équipe physiologie végétale de l'USTHB avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pour les moments partagés de sciences et de convivialité. Un merci à l'ingénieur de laboratoire Mme ZAOUI Djamilia pour son aide et sa qualité d'écoute.

Un grand merci à mon amie et collègue Halima qui a répondu favorablement à mes demandes d'aide malgré ses occupations, merci pour ton soutien et tes encouragements.

Je ne pourrais terminer sans remercier ma famille particulièrement mes parents qui m'ont soutenue tout au long de mon cheminement. Je tiens à remercier ma sœur jumelle Kamélia de m'avoir toujours encouragée. Un grand MERCI à vous

Que tous ceux qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre trouvent ici l'expression de ma reconnaissance et mes amitiés ✍.

LISTE DES ABBREVIATIONS ET ACRONYMES

ABA : abscissic acid

ADN : acide désoxyribonucléique

ANOVA1 : Analyse de la variance à un facteur

AO : ajustement osmotique

APX : Ascorbate peroxydase

ATP : Adénosine tri-phosphate

BSA : bovine serum albumin

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

GSA : glutamate-semialdehyde

H₂O₂: peroxyde d'hydrogène

HK : histidines kinases

HSPs: Heat Shock proteins

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 : millimhos par cm ; **µmhos/cm** : micromhos 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 réduit

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

PCR: Polymerase Chain Reaction = Réaction de polymérisation en chaîne

PCD : mort cellulaire programmée

P5C : pyrroline-5-carboxylate

P5CR : 1-pyrroline-5-carboxylate réductase

P5CS : pyrroline-5-carboxylate synthétase

PDH : proline deshydrogenase

P5CDH : pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase

PEG : polyethylene glycol

PM : poids moléculaire

POX : gaïacol peroxydase

Pro T : proline transporter

RCF : relative centrifugal force (ou g-force)

ROS: reactive oxygen species (espèces réactives d'oxygène)

RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR

SOD: superoxyde dismutase

SOS: salt overly sensitive

tab : tableau

TAE : Tris Acétate EDTA

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

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Schéma de la peroxydation des lipides membranaires	10
Figure 2. Fonctions et localisation des protéines de transport du Na ⁺ et Cl ⁻ dans la plante ...	17
Figure 3. Fonctions de la proline dans la croissance, le développement et la tolérance des plantes au stress.....	29
Figure 4. Les voies biosynthétiques du métabolisme de la proline dans les plantes supérieures	35
Figure 5. Récapitulation des étapes de la reverse-transcription.....	65
Figure 6. Représentation schématique du principe de la relation du catabolisme de la proline et la respiration mitochondriale.....	67
Figure 7. Exemple de la calibration de l'électrode Clark avant d'effectuer des mesures de la respiration mitochondriale des plantules de blé.....	70
Figure 8. Schéma illustrant l'enregistrement de la consommation d'oxygène dans les mitochondries de l'haricot (<i>Vigna radiata</i>) et les différents états	71
Figure 9. Effet de la proline exogène sur la germination des graines de deux variétés de blé dur sous stress salin	76
Figure 10. Effet de l'application exogène de proline sur le pourcentage de germination de deux variétés de blé dur MBB et HD3 sous stress salin.....	77
Figure 11. Effet du sel et de la proline sur la croissance des plantules de blé dur (variété HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	79
Figure 12. Effet du sel et de la proline sur les extrémités racinaires des plantules de blé dur (variété HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl.....	80
Figure 13. Effet du sel et de la proline sur la teneur relative en eau des feuilles (TRE) des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	81
Figure 14. Effet du sel et de la proline sur la teneur en chlorophylles et caroténoïdes des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	82
Figure 15. Effet du sel et de la proline sur la teneur en protéines des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	83
Figure 16. Effet du sel et de la proline sur la teneur en sucres et en amidon des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	85
Figure 17. Effet du sel et de la proline sur l'accumulation de la proline dans les plantules de blé dur (variété HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	86
Figure 18. Effet du sel et de la proline sur la teneur en sodium des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	87
Figure 19. Effet du sel et de la proline sur la teneur en potassium des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	88

Figure 20. Le ratio K^+/Na^+ des plantules de blé dur cultivées in vitro pendant 10 jours dans sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	89
Figure 21. Effet du sel et de la proline sur la teneur en malondyaldéhyde des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	89
Figure 22. Effet du sel et de la proline sur la fuite d'ions des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline	90
Figure 23. Effet du sel et de la proline sur l'activité superoxyde dismutase (SOD) des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.	91
Figure 24. Effet du sel et de la proline sur l'expression du gène du stress déhydrine (DHN) des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.....	92
Figure 25. Effet du sel et de la proline sur l'expression du gène de biosynthèse et du catabolisme de la proline (P5CS et PDH) des plantules de blé dur (<i>variété HD3 et MBB</i>) cultivées sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline	94
Figure 26. Détection immunologique par Western blotting de la protéine Prodh dans les les plantules de blé dur dans nos conditions	95
Figure 27. Exemple de la consommation d'oxygène enregistrée dans les mitochondries brutes des racines de variété HD3.....	97
Figure 28. Effet du sel et de la proline sur l'expression des gènes candidats des transporteurs du sodium HKT (HKT1;4-1, HKT1;4-2, HKT1;5) des plantules de blé dur.....	99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. La répartition des sols affectés par le sel dans les zones arides par continent	6
Tableau 2. Plantes transgéniques transformées avec les gènes de biosynthèse de la proline leur conférant une tolérance au stress salin	44
Tableau 3. Études représentatives portant sur le rôle de la proline exogène dans la régulation des principaux processus métaboliques et leurs conséquences sur les plantes soumises au stress salin.	48
Tableau 4. Séquences des primers utilisés et conditions de l'amplification <i>in vitro</i>	66
Tableau 5. Pourcentage de l'indice de sensibilité chez les deux variétés	79

SOMMAIRE

Liste des abbréviations

Liste des figures et des tableaux

Introduction	1
Revue bibliographique	
I. Salinité	5
II. Effet du stress salin sur les plantes	6
✓ Stress osmotique.....	7
✓ Stress ionique	7
> Cas du sodium Na^+	7
> Cas du chlore Cl^-	8
✓ Stress nutritionnel.....	8
✓ Stress oxydatif.....	9
> L'oxydation de l'ADN.....	9
> La peroxydation des lipides membranaires.....	10
> L'oxydation des protéines par les ROS.....	11
III. Mécanismes de réponses des plantes au stress salin	11
III.1. Régulation de l'expression génique et transduction du signal : facteurs de transcription.....	12
III.2. Régulation de l'homéostasie ionique cellulaire.....	12
III.2.1. Compartimentation ou inclusion des ions.....	13
III.2.1.1. Transporteurs NHX de sodium.....	13
III.2.2. Exclusion ionique.....	14
III.2.2.1. Transporteurs de type <i>Salt Overly Sensitive</i>	14
III.2.2.2. Transporteurs HKT.....	15
III.2.3. Maintien d'un rapport Na^+/K^+ minime dans les tiges	18
III.3. Synthèse des protéines.....	18
III.4. Système antioxydant	20
III.5. Ajustement osmotique	22
III.5.1. Accumulation des sucres.....	22
III.5.2. Accumulation de la proline.....	24
> Fonction d'osmolyte.....	26
> Protection de la structure cellulaire pendant la déshydratation.....	26
> Rôle dans la régulation de l'homéostasie cellulaire.....	27
> Proline comme molécule signal.....	29
> Détoxification des espèces réactives d'oxygène.....	30
III.6. Métabolisme de la proline chez les plantes.....	31
III.6.1. Métabolisme de la proline	31
a- Pyrroline-5-carboxylate synthase P5CS.....	32
b- Pyrroline-5-carboxylate reductase P5CR.....	34
c- Proline déshydrogénase (ProDH).....	35

d- Pyrroline 5 Carboxylate Dehydrogenase (P5CDH).....	36
III.6.2. Régulation du métabolisme de la proline durant le stress.....	37
III.3.4.3. Transport de la proline.....	41
III.3.4.4. Approche transgénique du métabolisme de la proline et la tolérance au sel.....	42
III.3.4.5. Approche de l'apport exogène de la proline et son effet sur la contrainte saline.....	45

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal.....	52
II. Méthodes d'étude.....	52
II.1. Test de l'effet de la proline exogène sur la germination.....	52
a. Conditions de germination.....	52
II.2. Test de l'effet de la proline exogène sur les caractères morpho-physiologique et biochimiques de deux variétés de blé dur HD 3 et MBB en stress salin.....	53
II.2.1 Conditions de culture.....	53
a. Application du stress et de la proline exogène.....	53
II.2.2. Prélèvements	54
II.2.3. Techniques analytiques.....	54
II.2.3.1. Pourcentage de germination.....	54
II.2.3.2. Analyses physiologiques et biochimiques.....	55
II.2.3.2.1. Croissance en longueur et croissance pondérale.....	55
II.2.3.2.2. Anatomie des racines.....	55
II.2.3.2.3. Teneur relative en eau TRE.....	55
II.2.3.2.4. Teneur en pigments photosynthétiques.....	55
II.2.3.2.5. Teneur en protéines hydrosolubles.....	56
II.2.3.2.6. Teneur en sucres solubles.....	56
II.2.3.2.7. Teneur en proline libre.....	57
II.2.3.2.8. Teneur en cations Na ⁺ et K ⁺	57
II.2.3.2.9. Estimation de l'intégrité membranaire.....	58
a. Teneur en malondialdéhyde.....	58
b. Fuite d'électrolytes.....	59
II.2.3.2.10. Mesure de l'activité antioxydante superoxyde dismutase.....	59
a. Activité du superoxyde dismutase.....	60
II.2.3.3. Analyse moléculaire	60
II.2.3.3.1. Test de l'expression génique de quelques gènes d'intérêt	60
1. Choix des amorces.....	60
2. Extraction et dosage des ARNs totaux.....	62
a. Méthode phénol chloroforme.....	62
b. Méthode d'extraction avec le kit Qiagen.....	62
3. Analyse quantitative et qualitative des ARNs extraits.....	63
4. Traitement DNase.....	63
5. RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction).....	64
a. Synthèse d'ADNc (rétrotranscription).....	64
b. L'amplification <i>in vitro</i> par PCR.....	64

6. Visualisation des amplifiats.....	66
II.2.3.4. Tentative de la détection de l'enzyme de catabolisme de la proline (PHD) dans les mitochondries de blé dur.....	67
II.2.3.4.1. Extraction des mitochondries brutes.....	68
II.2.3.4.2. Mesure de la consommation d'oxygène dans les mitochondries.....	69
a. Principe.....	69
b. Description de l'oxymètre.....	69
c. Mesure de la consommation d'oxygène dans les mitochondries extraites.....	71
II.2.3.5. Tentative de la révélation de la protéine PDH.....	73
II.2.3.5.1. Détection de l'enzyme PDH par western blotting.....	73
II.2.3.5.2. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturants.....	73
II.2.3.5.3. Transfert sur membrane.....	74
II.2.3.5.4. Révélation immunologique.....	74
II.3. Analyse des données.....	67

Résultats et discussion

Résultats

1. Effet de la proline exogène sur la germination.....	77
2. Effet de la proline sur les réponses morphologiques.....	78
3. Effet de la proline sur la teneur relative hydrique.....	81
4. Effet de la proline sur la teneur en pigments photosynthétiques.....	82
5. Effet de la proline sur la teneur en protéines hydrosolubles.....	84
6. Effet de la proline sur la teneur en sucres solubles.....	85
7. Effet de la proline sur la teneur de blé en proline.....	86
8. Effet de la proline sur la teneur de blé en sodium et potassium.....	87
9. Effet de la proline sur la peroxydation lipidique.....	90
10. Effet de la proline sur l'activité antioxydante superoxyde dismutase.....	91
11. Effet de la proline sur l'expression génique.....	92
11.1. Expression du marqueur du stress.....	92
11.2. Effet du stress salin et de la proline sur l'expression des gènes candidats de biosynthèse de la proline.....	93
11.3. Expression des gènes candidats des transporteurs de Na ⁺ (transporteurs HKT).....	99

Discussion

1. L'effet améliorateur de la proline sur la germination de blé dur.....	100
2. Le stress salin affecte la croissance des plantules de blé dur.....	101
3. Le stress salin affecte le statut hydrique des plantules de blé dur.....	102
4. Le stress salin a provoqué le stress oxydatif dans les plantules de blé dur.....	103
5. L'apport de la proline exogène a partiellement atténué les effets négatifs du sel sur la croissance des plantules de blé.....	104

6. La modification des niveaux des métabolites sous le stress du sel NaCl et l'effet variable de la proline	106
7. Le stress salin et la proline exogène augmentent la teneur des plantules en proline et modulent l'expression des gènes de la biosynthèse de la proline.....	109
8. Le niveau du sodium et du potassium est perturbé par le stress salin.....	113
9. La régulation différentielle et spécifique aux tissus des gènes HKT1,4-1 et -2 par le stress salin	114
Conclusion et perspectives.....	117
Références bibliographiques.....	121
Annexes	

Résumé en français

Le blé dur, *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn. est l'une des cultures céréalières les plus sensibles à la salinité, mais les réponses physiologiques des différents variétés au stress salin sont variables. Les variétés qui sont adaptées aux conditions arides comme en Algérie ne sont pas nécessairement tolérantes à une augmentation de la salinité. Lorsque des plantules de 10 jours des variétés algériennes de blé dur Hedba 3 (HD3) et Mohamed Ben Bachir (MBB) ont été soumises à un stress salin en *in vitro* avec 10g/l de NaCl, leur comportement physiologique et biochimique a été perturbé. Les résultats ont montré une réduction de leur germination et croissance, leurs teneurs en eau et en pigments photosynthétiques et une augmentation de la fuite d'ions et du marqueur de stress oxydatif le malondialdéhyde. Les plantules ont également accumulé de la proline et ont exprimé des gènes liés au stress et des gènes du métabolisme de la proline dans une réponse classique au stress salin. L'expression des gènes des transporteurs sélectifs de sodium *HKT1;4-1* et *-2* s'est avérée spécifique à l'organe et modulée par le stress salin chez les deux variétés. L'ajout de la proline au milieu de culture contenant du sel a atténué certains effets négatifs du stress salin tels que la diminution de la teneur en eau, la fuite d'ions et la teneur en malondialdéhyde. Par contre, les paramètres de croissance ont été partiellement améliorés à des degrés différents chez les deux variétés. Les plantules de blé dur ont accumulé des ions sodium (Na^+) au détriment des ions potassium (K^+) sous l'effet du stress salin, ce qui a fait baisser le rapport de K^+/Na^+ dans les tissus. Les deux variétés de blé dur étudiés réagissent différemment au stress salin en réponse à la proline exogène, au niveau de l'expression du gène *HKT1;4* et de l'accumulation de Na^+ et K^+ . L'effet de stress salin peut être partiellement atténué par la proline dans le variété MBB, résistant à la sécheresse, même s'il est relativement sensible au sel.

Mots clés : Blé dur, *Triticum turgidum* · Stress salin, Proline exogène, HKT · *in vitro*

Résumé en anglais

Durum wheat, *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn., is one of the most salt-sensitive cereal crops, but the physiological responses of different varieties to salt stress vary. Varieties that are suited to arid conditions like in Algeria may not necessarily be tolerant to increased salinity. When 10-day seedlings of Algerian durum wheat varieties Hedba 3 (HD3) and Mohamed Ben Bachir (MBB) were subjected to salt stress *in vitro* with 10g/l NaCl, their physiological and biochemical behavior was disturbed. The results showed a reduction of their germination and growth parameters, their water and photosynthetic pigments contents and an increase of the ions leakage and the oxidative stress marker the malondialdehyde content. The seedlings also accumulated proline and expressed stress-related and proline metabolism genes in a classic salt-stress response. Expression of the selective sodium transporter genes *HKT1;4-1* and *-2* was found to be organ-specific and modulated by salt stress in both varieties. Adding proline to the salt-containing growth medium alleviated some salt stress effects such as decrease in water content, ion leakage and expression oxidative stress markers while growth parameters were partially rescued to different extents in the two varieties. Durum wheat seedlings accumulated sodium ions (Na^+) at the expense of potassium ions (K^+) under salt stress which lowered the in planta K^+/Na^+ ratio. The two durum wheat varieties studied here respond differently to salt stress in terms of responsiveness to proline, *HKT1;4* gene expression, and Na^+ and K^+ accumulation. Notably, salt stress can be partially alleviated by proline in the drought-resistant variety MBB, even though it is relatively salt sensitive.

Keywords : Durum wheat · *Triticum turgidum* · Salt stress · exogenous proline · HKT · *in vitro*

المخلص

نبات القمح الصلب Husn (*Triticum turgidum subsp. durum* (Desf.) Husn) من المحاصيل الزراعية الأكثر حساسية للملوحة. لكن الاستجابات الفيزيولوجية للأصناف المختلفة اتجاه الإجهاد الملحي متنوعة. الأصناف المتكيفة للظروف الجافة كما هو الحال في الجزائر، ليست بالضرورة متحملة لزيادة في الملوحة. عندما تعرضت شتلات ذات عمر 10 أيام من صنفين جزائريين هدبة 3، (HD3) ومحمد بن بشير (MBB) لإجهاد ملحي في وسط زجاجي لـ 10 غ/ل من ملح NaCl، فإن سلوكها الفيزيولوجي والبيوكيميائي قد اختلف. بينت النتائج انخفاض انباتها، نموها، محتواها المائي وفي الأصبغة اليخضورية وتراكم للأيونات وإشارة لإجهاد تأكسدي من المالونديا ألدهيد malondialdehyde. بالتساوي مع ذلك، راکمت الشتلات البرولين وعبرت عن مورثات مرتبطة بالإجهاد ومورثات أيض البرولين في استجابة كلاسيكية للإجهاد الملحي. اتضح أن التعبير الجيني لنواقل الصوديوم الانتقائية HKT1;4-1 و -2 كان خاصاً بالعضو وتم تعديله بالإجهاد الملحي في كلا الصنفين. أدت إضافة البرولين إلى وسط الزرع المحتوي على الملح إلى تخفيف بعض الآثار السلبية للإجهاد الملحي مثل انخفاض محتوى الماء، وتسرب الأيونات ومحتوى المالونديالدهيد. و على العكس، حسنت جزئياً مؤشرات النمو بدرجات مختلفة في الصنفين. راکمت الشتلات الصوديوم على حساب البوتاسيوم تحت تأثير الإجهاد الملحي، مما أدى إلى خفض نسبة البوتاسيوم إلى الصوديوم في الأنسجة. كان تفاعل صنف القمح مختلفاً نحو الإجهاد الملحي استجابة للبرولين الخارجي على مستوى تعبير مورثة HKT1;4 وتراكم N+ و K+. تأثير الإجهاد الملحي يمكن أن يكون قد خفف بالبرولين في الصنف MBB مقاوماً للجفاف، حتى وإن كان نسبياً حساساً للملح.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب، *Triticum turgidum*، الإجهاد الملحي، البرولين الخارجي، HKT، في الوسط الزجاجي

Revue bibliographique

INTRODUCTION

Le blé dur, *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn., est une culture importante tant sur le plan économique que nutritionnel. Il est particulièrement cultivé dans les régions méditerranéennes qui comme d'autres dans le monde sont actuellement soumises à une salinisation progressive des sols (Munns and Tester, 2008). En plus de la nappe phréatique salée, 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. Dans les exploitations où le seul approvisionnement en eau pour l'agriculture provient de l'irrigation, la salinité du sol a tendance à augmenter car les précipitations ne sont pas suffisantes pour éliminer le sel par lessivage (Corwin et al., 2007). La salinité limite la croissance de nombreuses cultures sensibles au sel dites glycophytes, ce qui diminue leur rendement (Horie et al., 2011). Le riz (*Oryza sativa*) est l'une des espèces céréalières les moins tolérantes au sel (Colmer et al., 2006a; Dionisio-Sese and Tobita, 2000; Munns et al., 2010; Munns and Tester, 2008), tandis que l'orge (*Hordeum vulgare*) est relativement tolérante au sel, étant capable de pousser en présence de 250 mM de NaCl. Parmi les espèces de blé, *Triticum monoccocum* est résistant au sel, *Triticum aestivum* (blé tendre) est modérément tolérant au sel, et le blé dur est le moins tolérant au sel (Munns et al., 2012; Munns and Tester, 2008; Wu et al., 2018). La tolérance relative au sel dépend toutefois de la variété autant que de l'espèce de blé (Płazek et al., 2013).

L'impact de la salinisation sur la croissance des plantes résulte de la combinaison d'un stress hyperosmotique et d'une toxicité ionique causée par l'accumulation des sels, principalement de NaCl, dans les organes de la plante (Almeida et al., 2017; Munns and Tester, 2008; Waters et al., 2013). Les plantes qui poussent sur un sol salin accumulent de fortes concentrations d'ions de sodium (Na^+) qui peuvent endommager la membrane cellulaire, modifier le niveau des régulateurs de croissance, inhiber les enzymes, perturber la photosynthèse, interférer avec l'homéostasie ionique, produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) nuisibles et entraîner la mort de la plante (Munns and Tester, 2008; Julkowska and Testerink, 2015). Les concentrations élevées de Na^+ ont également des effets inhibiteurs sur l'absorption par la racine des principaux nutriments aux propriétés physicochimiques similaires comme le potassium K^+ (Hamamoto et al., 2015; Almeida et al., 2017).

Le contrôle du transport et l'exclusion du Na^+ de tissus foliaires sont des processus importants qui protègent les plantes de la toxicité du sodium (Hanin et al., 2016). Le blé dur et le riz ont

tous deux une faible capacité d'exclusion du Na⁺ (Dionisio-Sese and Tobita, 2000; Colmer et al., 2006b; Munns and Tester, 2008; Munns et al., 2010). Les transporteurs de sodium sont avérés importants pour la tolérance au sel, comme les gènes SOS1 et SOS4 chez le blé dur (Feki et al., 2011; Ramezani et al., 2013). Les gènes HKT codant pour des transporteurs de K⁺ de haute affinité HKT (*High-affinity K⁺ Transporters*) sont importants pour la tolérance des espèces de *Triticum* au sodium (Huang et al., 2006; James et al., 2006; Huang et al., 2008; James et al., 2011; Byrt et al., 2014). Un mécanisme a été proposé pour l'activité des HKT de classe I dans les cellules parenchymateuses du xylème qui est de pomper du Na⁺ hors du xylème, abaissant la concentration de Na⁺ dans la sève brute, ce qui empêche son accumulation dans le limbe (Byrt et al., 2014; Horie et al., 2009). Les HKT de classe II sont impliquées dans l'absorption nutritionnelle du sodium lors d'une carence en potassium (Horie et al., 2009). La détection et l'exclusion du sel sont également attribuées à la protéine de type SOS1 (Shi et al., 2000, 2002; Wu et al., 2018) et aux échangeurs Na⁺/H⁺ (Apse et al., 1999; Shabala et al., 2015). Il est intéressant de noter que l'introduction de certaines caractéristiques génétiques de la souche relativement résistante au sel de *T. monoccocum* a conduit à une meilleure tolérance au sel chez le blé dur (Huang et al., 2006; James et al., 2006; Huang et al., 2008; James et al., 2011). Les loci Nax1 et Nax2 de *T. monoccocum*, qui sont responsables de l'amélioration de la tolérance au sel, codent pour les transporteurs HKT (Platten et al., 2006; Horie et al., 2009; Byrt et al., 2014; Almeida et al., 2017).

Les conséquences délétères du stress salin sur la plante peuvent dans certains cas être contrecarrées par l'accumulation de composés solutés, comme l'acide aminé proline (Zhang and Becker, 2015; Rana et al., 2016; Annunziata et al., 2017). L'accumulation de la proline dans les plantes cultivées dans des conditions salines peut contribuer à leur protection contre le stress via plusieurs mécanismes, par exemple, en tant qu'agent osmotique, comme stabilisateur des membranes et des macromolécules, ou comme un inducteur de l'expression des gènes sensibles au stress salin (Hayat et al., 2012). Les processus de métabolisme et du catabolisme de la proline contribuent à l'équilibre du potentiel redox (Szabados and Savoure, 2010). La biosynthèse de la proline se fait par deux voies, soit à partir du glutamate, soit à partir de l'ornithine, mais la voie du glutamate est probablement prédominante dans les conditions du stress (Hu et al., 1992; Delauney and Verma, 1993a). Les enzymes *Δ1-pyrroline-5-carboxylate* (P5C) *synthétase* (P5CS) et *P5C réductase* (P5CR), catalysent respectivement les deux premières étapes de la biosynthèse de la proline à partir du glutamate (Verbruggen et al., 1993; Amini et al., 2015). Le catabolisme de la proline implique l'action séquentielle de la *proline déshydrogénase* (PRODH) qui convertit la proline en P5C, et de la

P5Cdéshydrogénase (P5CDH) qui convertit le P5C en glutamate (Elthon and Stewart, 1981; Hare et al., 1998; Verbruggen and Hermans, 2008a; Zhang and Becker, 2015). Chez la plupart des espèces végétales, le métabolisme de la proline est régulé à la hausse par le stress, souvent par l'activation transcriptionnelle de P5CS, ce qui entraîne des concentrations intracellulaires élevées de la proline (Silva-Ortega et al., 2008; Verslues and Sharma, 2010; Liang et al., 2013; Zhang and Becker, 2015). Cependant, l'accumulation de proline induite par le stress est variable dans les plantes et dépend de l'espèce, du stade de croissance et de la concentration du sel (Annunziata et al., 2017). La proline peut être apportée de manière exogène aux plantes stressées par le sel pour augmenter ses niveaux endogènes dans la plante, minimisant ainsi les dommages, rétablissant la tolérance au sel (Roy et al., 1993; Hoque et al., 2007b) et améliorant la rétention d'eau, la croissance et les défenses antioxydantes. Plusieurs études ont montré l'effet bénéfique de la proline exogène sur le blé dur et d'autres cultures soumises à un stress modéré induit par NaCl (jusqu'à 100 mM) (Mahboob et al., 2016), bien que la tolérance au sel ne soit pas corrélée avec la teneur du blé dur en proline endogène (Płazek et al., 2013).

La résistance à la sécheresse est un trait souhaitable chez le blé dur, mais elle n'est pas nécessairement associée à la résistance au stress salin (Dionisio-Sese and Tobita, 2000; Colmer et al., 2006a; Munns and Tester, 2008; Munns et al., 2010). Dans ce présent travail, nous avons étudié deux variétés de blé dur Algérien qui se comportent différemment sous le stress de la sécheresse. Le variété Hedba 3 (HD3) a été caractérisé comme étant relativement sensible à la sécheresse alors que la variété Mohamed Ben Bachir (MBB) est relativement tolérante (Monneveux and Nemmar, 1986; Dib et al., 1992; Mekhlouf et al., 2006). Les réponses des plantes au stress salin varient selon l'emplacement de l'essai (Munns et al. 2006) et peuvent également varier selon le mode de la conduite de l'essai *in vitro* ou au champ (Munns et al., 2006; Tavakkoli et al., 2012). Nous avons évalué les réponses physiologiques et l'expression géniques de ces deux variétés de blé dur au stress salin dans des conditions contrôlées *in vitro*. Un stress salin sévère (10 g/L, 171 mM NaCl) reflétant la gamme élevée du stress salin (Per et al., 2017; Wu et al., 2018) a été choisi pour étudier l'effet de la proline exogène sur la réponse des variétés de blé dur au stress. L'objectif est d'élucider quelques mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires à travers lesquels l'apport de proline pourrait impacter ces réponses au stress salin.

Revue bibliographique

I. Salinité

Selon la définition standard, un sol classé salin est caractérisé par une forte concentration des sels solubles. Sa conductivité électrique excède les 4 deciSiemens/m équivalente à 45mM NaCl (Carillo et al., 2011; Wahid, 2004). Dans les régions semi-arides, les concentrations du sel peuvent atteindre 100mM (Greenway and Munns, 1980). Outre les causes naturelles de salinité des sols, la mauvaise qualité des eaux d'irrigation accompagnée d'un drainage insuffisant et d'une utilisation de certains types d'engrais conduisent à l'accumulation des sels dans les terres agricoles (Munns, 2005). Dans la plupart des sols salins, le chlorure de sodium NaCl est le sel le plus répandu et le plus soluble avec un excès des ions sodium (Na^+) et chlorure (Cl^-) dans la solution (Munns, 2005; Munns and Tester, 2008). L'eau de pluie contenant 10 mg.kg^{-1} de NaCl pourrait déposer 10 kg. ha^{-1} de sel pour chaque 100mm de précipitations par an (Munns and Tester, 2008). L'excès d'autres ions tels que le calcium (Ca^{+2}), le magnésium (Mg^{+2}), les sulfates (SO_4^{-2}), et les bicarbonates (HCO_3^-) peut être aussi enregistré dans ce type de sols suite à l'altération des roches mères (Provin and Pitt, 2001). Ainsi, la conjugaison de tous ces facteurs favorise la dégradation de près de 10 millions d'hectares de terres cultivables dans le monde du fait de l'accumulation, au cours du temps, de ces sels (Shahid et al., 2018). Cette situation s'accroît avec les changements climatiques ressentis ces dernières années et les régions arides et semi arides sont fortement touchées par ce fléau (Munns, 2005), le bassin méditerranéen est également exposé à ce problème. Ghassemi et al., (1995) qui ont réalisé une recherche approfondie sur la salinisation des terres et les ressources hydriques 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. Plus récemment, les données sur la répartition des sols affectés par le sel dans les zones arides de différents continents montrent que l'Afrique englobe une large distribution de ces surfaces salées qui dépasse 200 millions d'hectares après l'Australasie (tableau 1).

Tableau 1. La répartition des sols affectés par le sel dans les zones arides par continent (Shahid et al., 2018).

Continent	Surfaces affectées par le sel (mha)		
	Sols salins	Sols sodiques	Total
Afrique	122.9	86.7	209.6
Australasie	17.6	340.0	357.6
Mexique/Amérique centrale	2.0	/	2.0
Amérique du Nord	6.2	9.6	15.8
Asie du Nord et centrale	91.5	120.2	211.7
Amérique du Sud	69.5	59.8	129.3
Asie du sud	82.3	1.8	84.1
Asie du sud Est	20.0	/	20.0
Total	412.0	618.1	1030.1

En Algérie, les sols salés occupent de grandes étendues et ils sont particulièrement localisés dans les zones sèches (Touaf et al., 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 (Halitim, 1985). La salinité touche, selon les données disponibles, 3.2 millions d'hectares dans le pays (INSID, 2008). En raison de la délimitation de toutes les zones touchées par la salinité des terres, la cartographie globale est toujours difficile. Il existe toutefois quelques données fragmentaires qui donnent une idée sur le phénomène de la salinité et de la dégradation des terres à l'échelle régionale. D'après Szablocs (1989), plusieurs 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. Dans une étude menée en 1997 par l'institut national des sols de l'irrigation et du drainage dans l'Ouest algérien le Bas Chéiff il est révélé que sur 40 000 hectares étudiés près de 11 000 ha soit 27% sont affectées par un degré de salinité de plus de 8ds/m.

II. Effet du stress salin sur les plantes

Nombreuses sont les recherches effectuées sur l'influence de la salinité sur la physiologie des végétaux et il a été mis en évidence que les fortes concentrations de sel dans la solution du sol

ou dans le milieu de culture influencent négativement la croissance des plantes. Deux processus majeurs ont été définis :

- ✓ **Phase 1.** l'effet du stress osmotique exercé par le sel, qui résulte de la baisse du potentiel hydrique de la solution du sol. Le stress salin est inextricablement lié au stress hydrique. De manière spontanée, l'eau a tendance à migrer dans les compartiments ayant un faible potentiel hydrique c'est-à-dire vers les zones les moins hydratées qui ont le potentiel hydrique le plus négatif et qui retiennent le plus l'eau. Elle se déplace toujours du haut potentiel hydrique de l'extérieur le plus hydraté vers le faible potentiel hydrique de la plante (Attumi, 2007). L'état hydrique de la plante dépend donc de celui du sol dans lequel est installé le système racinaire. L'abaissement du potentiel hydrique dans la rhizosphère autour des racines en conditions stressantes conduit à la réduction d'acquisition de l'eau par la plante (Jérémie Diédhiou, 2006; Munns et al., 2010; Omami, 2005; Ondrasek et al., 2011; Zhu, 2007). Ceci entraîne des changements de la conductivité hydraulique tissulaire, du mouvement des stomates et de l'équilibre ionique. La perte de la turgescence cellulaire ainsi imposée affecte l'ensemble des activités normales des cellules et perturbe les processus physiologiques de la plante tels que la transpiration et la photosynthèse qui sont traduits par la suite par une réduction de la croissance (Manchanda and Garg, 2008; Munns et al., 2010). C'est l'effet du déficit hydrique ou l'effet immédiat non spécifique de la salinité sur les végétaux (Munns et al., 2010).
- ✓ **Phase 2.** la seconde phase de la réduction de la croissance dans les milieux salins s'installe avec l'entrée du sel dans la plante. L'accumulation des ions spécifiques tels que le sodium et le chlore (Na^+ , Cl^-) atteignent les concentrations toxiques dans le cytoplasme ou l'apoplasme des tissus végétaux (Subbarao and Johansen, 1999). Cet excès résulte de l'influx massif de ces ions à partir des racines et sa faible recirculation vers les racines :

➤ *Cas du sodium Na^+*

Le plus souvent c'est le sodium qui provoque en premier la nocivité des milieux salins à l'égard des végétaux (UNESCO, 1957). Les cations Na^+ entrent passivement dans les cellules racinaires via des canaux membranaires et s'accumulent au-delà de leur seuil normal dans les cellules végétales (Cheeseman, 1982). Ils interfèrent avec les transporteurs racinaires sélectifs du K^+ diminuant ainsi son absorption (Chen et al., 2007; Horie et al., 2011; Rubio et al., 1995). D'un point de vue physico-chimique, le Na^+ entraîne une forte compétition entre les deux cations pour les sites actifs de

protéines en raison de ses propriétés ioniques semblables avec le K^+ tels que l'énergie d'hydratation et le rayon ionique (Chinnusamy et al., 2005; Hanana et al., 2011). Or, le potassium est un macroélément important impliqué dans de nombreux processus biologiques vitaux comme l'osmorégulation, la fixation des ARNt aux ribosomes et la synthèse protéique (Blaha et al., 2000; Tester and Davenport, 2003). Avec plus de quatre-vingt enzymes cytoplasmiques activées par le K^+ , l'effet toxique du sodium dans les cellules se traduit par des perturbations métaboliques (Hanana et al., 2011; Nawaz et al., 2010). Le sodium inhiberait l'activité de nombreuses enzymes et protéines entraînant des dysfonctionnements de la cellule (Blaha et al., 2000). Le niveau de toxicité sur l'activité enzymatique est atteint généralement à partir d'une concentration de 100mM (Apse and Blumwald, 2002; Greenway and Munns, 1980). Son accumulation excessive, notamment dans les tissus des tiges, est au cœur de sa toxicité (Kronzucker et al., 2013).

► *Cas du chlore Cl^-*

Le chlore est un macro-élément indispensable au fonctionnement normal des végétaux. Il fait partie des ions inorganiques majoritaires et est principalement présent à l'état ionique (Cl^-). Il est impliqué dans des fonctions métaboliques telles que l'équilibre ionique et osmotique, la turgescence, la stabilisation du gradient pH et la régulation des activités enzymatiques. Il est couplé en tant que cofacteur à des enzymes qui participent dans la photosynthèse (Kawakami et al., 2009; Teakle and Tyerman, 2010). Toutefois, bien que le chlore soit important à la cellule, il ne demeure pas moins toxique que le sodium à des concentrations élevées particulièrement chez certaines espèces telles que les agrumes, la vigne et le soja. Contrairement au Na^+ , le Cl^- n'est pas retenu efficacement dans leurs racines, ainsi il devient l'anion le plus cytotoxique en cas d'accumulation et entraîne des déséquilibres dans les cellules (Teakle and Tyerman, 2010). Il est donc assez surprenant que la plupart des recherches s'intéressant à la tolérance au sel se focalisent uniquement sur le sodium.

✓ **Stress nutritionnel**

L'accumulation excessive des ions de chlore et de sodium provoque aussi un déséquilibre nutritionnel dans la plante en limitant l'absorption d'autres nutriments indispensables. Le sodium a tendance à entrer en compétition avec le potassium, le calcium et le magnésium vis-à-vis des transporteurs ioniques (Bohra and Doerffling, 1993; Chen et al., 2007; Horie et al.,

2011; Rubio et al., 1995) et les chlorures ont un effet antagoniste avec les nitrates, les sulfates et le phosphore (Ballesteros et al., 1997; Jin et al., 2007). Toute déficience en ions essentiels tels que le K^+ , Ca^{2+} nécessaires aux activités enzymatiques altèrent inévitablement les fonctions physiologiques et biochimiques des cellules. Des phénomènes de carences en calcium et en potassium peuvent alors apparaître (Nawaz, 2007). Cette perturbation de l'homéostasie ionique cellulaire est une cause possible de la réduction de la croissance dans les milieux salins particulièrement des plantes sensibles (Zhu, 2001).

✓ **Stress oxydatif**

Lors d'un stress salin intense, le métabolisme normal de l'oxygène au niveau des mitochondries et chloroplastes des tissus cellulaires est également perturbé. Cette perturbation génère la production de composés intermédiaires toxiques tels que les métabolites réactifs d'oxygène (ROS) (Blumwald et al., 2004). Le terme ROS fait référence aux espèces d'oxygène hyperactives et instables telles que les radicaux libres caractérisés par un ou plusieurs électrons non appariés (Halliwell, 2006; Lerverve, 2009; Rochette, 2008). Elles incluent les ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyles ($\cdot OH$) et les radicaux peroxydes ($RO\cdot$) (Zahid, 2010). Physiologiquement, la production continue de ces radicaux est nécessaire pour le maintien d'un statut redox normal et les fonctions cellulaires mais il en faut en faible quantité (Yazici et al., 2007). Leur accumulation excessive entraîne un déséquilibre entre les niveaux ROS et le système de défense antioxydant provoquant un état de stress oxydatif dans la plante (Deby-Dupont et al., 2002; Durand and Beaudeau, 2011). Ces formes actives d'oxygène (ROS) peuvent endommager différentes macromolécules biologiques importantes comme les acides nucléiques, les protéines et les lipides (Anjum et al., 2015).

Elles peuvent provoquer :

- **L'oxydation de l'ADN** qui résulte de l'attaque d'une de ses bases puriques ou pyrimidiques, de la destruction des désoxyriboses ou bien de la liaison base-désoxyribose par les ROS. Bien que l'ADN soit le matériel génétique de la cellule, il est très sensible à l'oxydation notamment par le radical hydroxyle $\cdot OH$ (Favier, 2003). Quand $\cdot OH$ Attaque l'ADN ou les protéines qui lui sont associées, des réticulations de protéines de l'ADN sont formées et sont difficiles à réparer. La réplication ou la transcription qui précède la réparation peut être mortelle (Sharma et al., 2012). Cette oxydation par $\cdot OH$ peut conduire à des erreurs voire des mutations qui, à leur tour altèrent la synthèse des protéines (Haleng et

al., 2007). Les ROS peuvent attaquer l'ADN nucléaire, chloroplastique et mitochondriale. Ces derniers sont plus sensibles au stress oxydatif que l'ADN nucléaire en raison du manque des protéines protectrices, des histones et de leurs emplacements proches des sites de la production des ROS (Sharma et al., 2012).

► **La peroxydation des lipides membranaires** particulièrement des acides gras polyinsaturés (PUFAs) est dérivée de l'attaque par le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ qui est le radical le plus réactif. Il réagit avec toutes les molécules se trouvant à proximité. L'anion OH^- est issu de la réaction d'oxydation des cations métalliques tels que le fer (Fe^{2+}) par une autre molécule active d'oxygène le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) au niveau de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons (Trembl and Šmejkal, 2016). Les lipides de la membrane cellulaire comme les phospholipides sont aussi ciblés par l'anion superoxyde O_2^- (Arora et al., 2002). Quand cette peroxydation est importante, elle conduit à la perturbation de la fluidité des membranes et augmente leur perméabilité modifiant ainsi l'homéostasie et l'état redox cellulaires (Sharma et al., 2012). Parmi les produits de l'oxydation des lipides, on trouve les aldéhydes tels que le malondialdéhyde (MDA) qui est généralement utilisé comme marqueur pour l'estimation du degré de l'altération membranaire (Anjum et al., 2015; Sharma et al., 2012) (figure 1).

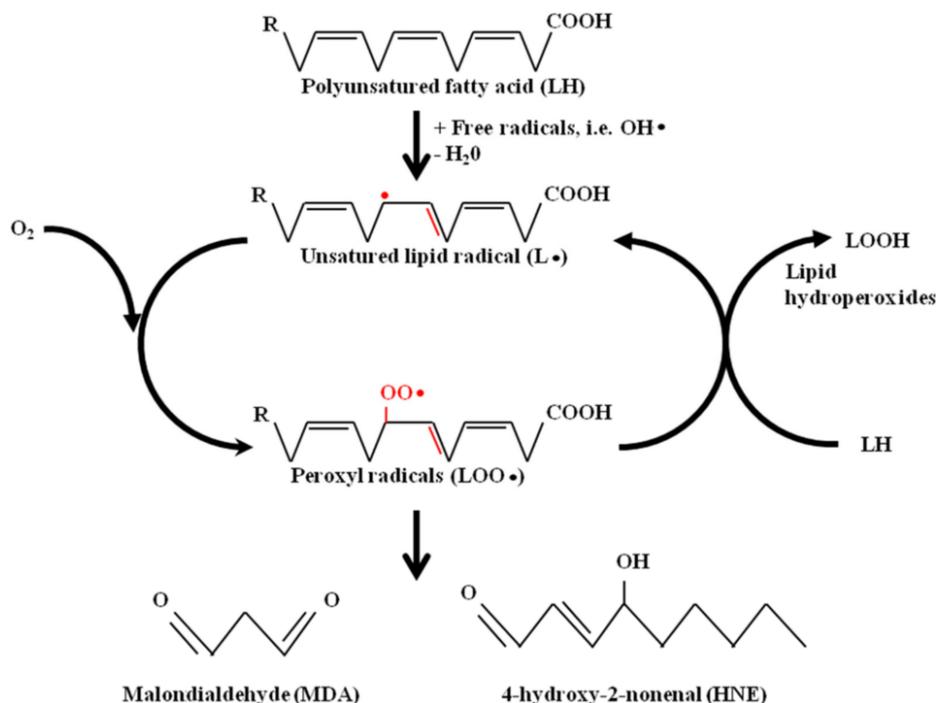


Figure 1. Schéma de la peroxydation des lipides membranaires : oxydation des acides gras insaturés et formation de Malondialdéhyde (MDA) et du 4-hydroxynonanal (HNE) (Barrera et al., 2018).

► **L'oxydation des protéines par les ROS** qui a lieu via plusieurs mécanismes directs soit-ils ou bien indirects. Les acides aminés qui forment les protéines sont également vulnérables au processus d'altération oxydative (Haleng et al., 2007). La présence du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 mais surtout les radicaux hydroxyles $OH\cdot$ dans la cellule provoque des altérations irréversibles en introduisant le groupement carbonyle dans la chaîne peptidique (Anjum et al., 2015). L'histidine, l'arginine, la lysine, le tryptophane, la cystéine ou encore la proline sont les cibles privilégiées de l'oxydation (Anjum et al., 2015; Haleng et al., 2007). D'autres réactions d'oxydation peuvent dénaturer les protéines en cassant leurs liaisons peptidiques ou bien par l'addition des produits de peroxydation lipidique (Favier, 2003). Toute modification de la propriété structurale des enzymes renvoie à la perte de leurs fonctions catalytiques et donc leur inactivation (Sharma et al., 2012).

Toutes ces altérations des biomolécules par le stress oxydatif peuvent conduire à des troubles métaboliques voire même la mort cellulaire qui peut-être délétère pour l'organisme (Anjum et al., 2015).

Outre le stress oxydatif, un déséquilibre hormonal peut s'installer suite au stress salin, il se traduit d'une part par une réduction de certaines hormones des tissus cellulaires comme les gibbérellines, les cytokinines et les auxines et, d'autre part par une augmentation de la concentration de l'acide abscisique (ABA) (Kaya et al., 2009).

III. Mécanismes de réponses des plantes au stress salin

La tolérance au sel chez les végétaux est un caractère complexe et polygénique (Parida and Das, 2005). Elle correspond à la capacité des plantes à maintenir leur croissance en présence de sels solubles au niveau de la rhizosphère (Rathinasabapathi, 2000). La plupart des plantes cultivées sont des glycophytes, ce groupe d'espèces végétales sensibles au sel ne peut pas survivre dans des milieux salins dont la concentration de NaCl dépasse 100mM c'est le cas d'*Arabidopsis*, de la fève, du blé, du riz par exemple. Elles ne peuvent tolérer qu'une faible quantité de sels dans leurs rhizosphères (Sairam and Tyagi, 2004). L'effet du sel sur la plupart des cultures se manifeste généralement par un effet négatif voire même létale sur leur croissance et rendement (Munns et al., 1995). Tandis que les halophytes, une flore native des environnements salins, ont la capacité de croître en présence de fortes concentrations de sel comprises entre 200 et 500mM et cela grâce à la grande diversité de leurs propriétés adaptatives d'ordre morphologique, anatomique et biochimique (Carillo et al., 2011; Hussain et al., 2010; Seaman, 2008; Tester and Davenport, 2003).

En dépit de la variabilité de la tolérance de ces deux groupes à la salinité, la réponse aux concentrations excessives des sels au niveau de la rhizosphère repose généralement chez la plupart des plantes par des modifications de leur comportement suite à des mécanismes divers.

III.1. Régulation de l'expression génique et transduction du signal : facteurs de transcription

La réponse des plantes à la salinité est complexe, elle implique plusieurs gènes qui codent les voies de régulation distinctes ou chevauchantes.

Les protéines régulatrices telles que les facteurs de transcription et les protéines de signalisation suscitent un intérêt croissant dans la mesure où elles devraient moduler en aval l'expression de nombreux gènes impliqués dans les réponses au stress. Il est bien documenté que les facteurs de transcription appartenant aux familles DREB, NAC, MYB, MYC, bZIP, AP2/ERF et WRKY sont pertinents dans la tolérance au stress salin (Golldack et al., 2014, 2011). A cet égard, plusieurs facteurs de transcription comme DREBs, MYCs, AP2/ERFs et NACs ont été testés sur des plantes modèles et sur certaines cultures. Quelques résultats ont démontré que la surexpression de ces facteurs de transcription a permis l'amélioration de la tolérance des plantes à la salinité. Par exemple, les plantes transgéniques de riz exprimant DREB1A/CBF3 étaient plus tolérantes à la salinité (Oh, 2005). De plus, des effets de la surexpression des gènes codant les protéines de signalisation telles que les kinases et les phosphatases sur la tolérance au sel ont été aussi rapportés. En tant que protéines conservées dans plusieurs cascades de signalisation, les MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*) jouent un rôle essentiel dans la réponse des plantes aux divers stress entre autres le stress salin. De nombreuses plantes transgéniques conçues avec la cascade de MAPK ont été rapportées comme étant tolérantes au stress salin (Hanin et al., 2016).

III.2. Régulation de l'homéostasie ionique cellulaire

Les cellules végétales parviennent à maintenir la concentration de sodium dans le cytosol à un niveau inférieur à celui de potassium. L'homéostasie ionique est cette capacité des plantes d'autoréguler et d'équilibrer leur état ionique dans leurs tissus. Sous une contrainte saline, les plantes tendent à ajuster leur potentiel hydrique via la régulation de l'homéostasie ionique pour limiter l'accumulation toxique des ions de Na⁺ dans le cytoplasme. Deux principales stratégies sont impliquées :

III.2.1. Compartimentation ou inclusion des ions

La séquestration des ions toxiques de sodium au sein de la vacuole intracellulaire est une stratégie importante pour maintenir leurs concentrations cytosoliques à un niveau faible et donc conserver un faible potentiel osmotique cellulaire (Zhu, 2003). En effet, en conditions salines le flux de Na^+ est ascendant, il atteint les parties aériennes et les ions Na^+ s'accumulent soit dans le cytoplasme des cellules soit dans leurs parois. La saturation de ces compartiments engendre la perte de la turgescence cellulaire. Or, la vacuole ce compartiment le plus volumineux de la cellule peut stocker l'excès des cations de sodium sans inhiber les processus métaboliques cellulaires. Les plantes caractérisées par cette stratégie sont dites *includer* vis-à-vis du sodium Na^+ . Ce mécanisme de l'entrée du Na^+ dans la vacuole est assuré grâce à des protéines tonoplastique (antiport Na^+/H^+) de la famille NHX :

III.2.1.1. Transporteurs NHX de sodium

L'influx de sodium à l'intérieur de la vacuole cellulaire se fait à l'aide des protéines transmembranaires NHX (Na^+/H^+ Antiporter) chargées des échanges de cations de sodium contre les protons au niveau du tonoplaste utilisant l'énergie du gradient électrochimique de protons (ΔpH) qui est générée par le fonctionnement des pompes triphosphatases (ATPases) et pyrophosphatases (PPases) (Blumwald et al., 2000; Hasegawa et al., 2000). En plus d'avoir un rôle dans la compartimentation vacuolaire de l'excès de Na^+ , les antiports NHX se trouvent aussi localisés dans l'endosome et contribuent dans l'équilibre intracellulaire de K^+ , le contrôle du pH cellulaire et la régulation de la circulation vésiculaire conférant ainsi aux plantes un système de tolérance au stress ionique (Hanana et al., 2011). La surexpression des gènes de NHX a été testée chez plusieurs espèces végétales, chez *Arabidopsis thaliana* par exemple les plantes surexprimant *AtNHX1* ont affiché une amélioration de la tolérance au stress salin et une meilleure croissance que les plantes non transformées (Apse et al., 1999; Hanana et al., 2009). Cinq autres isoformes de gène NHX (*AtNHX2-AtNHX6*) ont été identifiés chez la même espèce et contribuent à améliorer la performance de stockage de Na^+ (Hanana et al., 2009; Yokoi et al., 2002) contre deux chez le blé (*Triticum* spp.; *TNHX1-TNHX2*) (Brini et al., 2006; Yu et al., 2007). Les NHX vacuolaires sont présents dans les cellules des tissus foliaires et les cellules racinaires aussi. Ils jouent un rôle primordial dans l'homéostasie cellulaire (Hanana et al., 2009) et dans la croissance (Barragan et al., 2012; Bassil et al., 2011). Dans les parties aériennes, les ions de

Na⁺ semblent s'accumuler préférentiellement dans les vieilles feuilles que dans les tissus jeunes.

La tolérance au stress salin peut également être améliorée par la compartimentation vacuolaire des ions de Cl⁻ à l'aide des canaux chlorures (CLC) (Hanana et al., 2011; Teakle and Tyerman, 2010). Ces canaux anioniques ont été clonés chez *Arabidopsis* par Hechenberger et al. (1996). Les cellules tolérantes peuvent stocker une forte concentration en Cl⁻ (jusqu'à 1000 mmol/L) à l'intérieur des vacuoles intracellulaires (Hanana et al., 2009).

III.2.2. Exclusion ionique

Des études récentes se sont intéressées au mécanisme de l'exclusion de sodium Na⁺ comme critère important de la tolérance à la salinité pour plusieurs espèces (Teakle and Tyerman, 2010). Cette stratégie caractérise le comportement des plantes dites *excluder* de limiter la remontée de l'excès du sel jusqu'aux parties aériennes. A l'inverse de celle des plantes type *include*, celle-là consiste à exclure le sodium du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Au niveau de la plante, le Na⁺ entre dans la racine, il est transporté par la sève xylémique des plantes exclusives et véhiculé jusqu'aux feuilles par le flux de transpiration. Afin d'éviter son accumulation dans le feuillage qui est le site principal de la toxicité de sodium particulièrement le limbe, l'excès de Na⁺ est par la suite re-véhiculé par le phloème vers les racines. Cela permet de maintenir sa concentration à des niveaux compatibles avec le métabolisme cellulaire normal au niveau des tissus aériens (Lacan and Durand, 1995). Cette exclusion est réalisée grâce à l'action des transporteurs membranaires :

III.2.2.1. Transporteurs de type *Salt Overly Sensitive*

L'efflux de Na⁺ à partir des cellules racinaires vers le milieu extérieur implique une série de protéines de type SOS. C'est l'un des systèmes de transport de sodium du plasmalemme les mieux caractérisés chez les plantes (Gierth and Mäser, 2007). La protéine membranaire (SOS1) dotée d'une activité antiport Na⁺/H⁺ joue un rôle important dans le mécanisme de l'exclusion des cations Na⁺ vers la solution du sol dans les conditions salines (Hanana et al., 2011). Les plantes mutantes d'*Arabidopsis* (*atsos1*) cultivées sous un régime salin (25mM) ont accumulé plus de Na⁺ dans leurs racines que les plantes sauvages. D'autre part, la surexpression du gène SOS1 a amélioré la croissance des plantes en milieu salin par rapport aux types sauvages (Shi et al., 2002). Cette protéine est localisée dans les cellules de l'épiderme racinaire, dans les cellules du parenchyme racinaire à la limite avec le xylème

mais aussi dans les parties aériennes (tiges et feuilles) (Shi et al., 2002). L'activité de la SOS1 est régulée conjointement par le complexe protéique SOS2/SOS3 (Gierth and Mäser, 2007; Hanana et al., 2011; Shi et al., 2002). En effet, en présence du sel le signal calcique induit par le stress salin est perçu par le senseur de Ca^{2+} (SOS3) qui le transmet à une protéine kinase Serine/Thréonine (SOS2) et se lie entre eux formant ainsi un complexe SOS3/SOS2. Une fois activée, la kinase (SOS2) phosphoryle et active à son tour l'antiport sodium/proton (SOS1) chargé de pomper l'excès de Na^+ en dehors du cytosol à travers la membrane plasmique (Batelli et al., 2007). Face à la contrainte saline, la voie métabolique SOS constitue non seulement une voie de signalisation mais participe aussi dans le maintien de l'homéostasie ionique (Agarwal and Zhu, 2005; Ishitani et al., n.d.; Zhu, 2002).

III.2.2.2. Transporteurs HKT

Plusieurs autres transporteurs sont potentiellement impliqués dans ce mécanisme de l'exclusion des ions de Na^+ entre autres ceux de la famille HKT (High-affinity K^+ Transporter). Il a été mis en évidence que ces protéines membranaires à haute affinité de potassium K^+ sont également perméables au sodium Na^+ et qu'elles jouent un rôle majeur dans le contrôle du transport de ces cations *in planta* (Horie et al., 2009). Ces transporteurs ont été identifiés pour la première fois chez les végétaux lors des études de caractérisations fonctionnelles sur des mutants de levures déficients pour le transport de K^+ (Schachtman and I. Schroeder, 1994). Sur la base de la sélectivité ionique, les transporteurs HKT sont classés en deux sous familles. La sous famille1 (HKT1) regroupe les transporteurs caractérisés par la perméabilité sélective de leur membrane uniquement aux cations de Na^+ à l'inverse des co-transporteurs K^+-Na^+ de la seconde sous famille (HKT2) (Byrt et al., 2014; Horie et al., 2009; Munns et al., 2012; Munns and Tester, 2008). Des études récentes ont montré que HKT1 pourrait potentiellement contribuer dans la tolérance des plantes au stress salin (Berthomieu, 2003; Munns and Tester, 2008; Munns et al., 2012; Ben Amar et al., 2014; Byrt et al., 2014; Tounsi et al., 2016). Il a été suggéré que les transporteurs HKT1 interviennent dans la désalinisation de la sève xylémique et l'adaptation des di- et monocotylédones à la contrainte saline (Almeida et al., 2013; Sassi et al., 2012). Chez *Arabidopsis*, les plants surexprimant le gène codant le transporteur HKT1 (*AtHKT1*) dans les tissus racinaires ont affiché une amélioration de leur tolérance à la salinité (Farquharson, 2009).

Chez le blé dur (tétraploïde AA BB), les deux loci *Nax1* et *Nax2* proposés comme candidats des gènes HKT ont été mis en évidence pour la première fois par une équipe australienne

Munns et al. (2000) lors d'une hybridation avec le blé ancestral (diploïde) pour la résistance à la rouille. Ces loci ont été transférés accidentellement dans la tige de blé dur suite à des croisements entre le blé dur (*Triticum durum* Var. 149) avec *Triticum monococum* porteur de ces transporteurs qui sont impliqués dans l'exclusion du Na^+ de la plante (Almeida et al., 2013; Byrt et al., 2007). L'introduction de ces deux loci a permis une amélioration de 25% de la tolérance du blé dur au stress salin par comparaison au blé témoin (Munns et al., 2008). Il a été démontré que le rôle majeur de la classe 1 des gènes HKT (HKT1) est l'exclusion du Na^+ du flux xylémique des racines et de la gaine des feuilles et la classe 2 est chargée exclusivement de l'exclure des racines (James et al., 2006). Ben Amar et al. (2014) ont identifié chez le blé dur deux transporteurs de type HKT1 ; 4 (TdHKT1;4-1 et TdHKT1;4-2) qui présentent une ressemblance avec leurs homologues de blé sauvage *Triticum monococum* (TmHKT1;4-A1 et TmHKT1;4-A2). Il a été récemment démontré par Tounsi et ses collaborateurs (2016) que ces transporteurs TmHKT1;4-A1 et TmHKT1;4-A2 sont tous deux sélectifs au sodium Na^+ mais la sélectivité pour le Na^+ s'avère supérieure dans TmHKT1 ;4-A2 que TmHKT1;4-A1. Ceci a été déduit sur la base de la conductance interne en présence de sodium qui était d'environ 3-4 fois plus élevée dans TmHKT1 ;4-A2 comparativement à la présence d'autres cations (Tounsi et al., 2016). De plus, ces transporteurs sont exprimés de la même façon dans les feuilles de blé ancestral mais que TmHKT1;4-A2 est plus fortement régulé dans les racines, ce qui lui permettrait donc de contribuer davantage à la prévention du transfert de Na^+ vers les tiges en conditions du stress salin (Tounsi et al., 2016; wang and xia, 2018). Une hypothèse a été émise sur le rôle de TmHKT1; 4-A2 en tant que responsable du Nax1 (Tounsi et al., 2016). L'exclusion de Na^+ par les gènes HKT dans les feuilles est considérée comme l'un des mécanismes majeurs de la tolérance du blé à la salinité (wang and xia, 2018). La présence d'un autre transporteur HKT de la première classe candidat du locus Nax2 (TmHKT1;5 appelé aussi HKT1;8) a été également mis en évidence et proposé d'être impliqué, de la même manière, dans le contrôle de transfert du Na^+ de la racine vers la tige dans les conditions de la salinité (Byrt et al., 2014, 2007).

Il est admis que le blé dur est moins tolérant au sel que le blé tendre (AA BB DD), ce dernier a plus de capacité de maintenir un ratio K^+/Na^+ élevé dans les tissus foliaires. Cette caractéristique est gouvernée par la présence de locus Knas1 dans le génome D de blé tendre hexaploïde (Almeida et al., 2013). Chez les autres espèces végétales, il a été également montré que les transporteurs HKT participent dans l'adaptation des plantes au stress salin comme OsHKT1;5 exprimé dans le parenchyme xylémique des racines du riz. Il empêche les

ions de Na^+ de parvenir aux tissus aériens maintenant ainsi leur homéostasie en K^+ (Ben Amar et al., 2014).

Deux mécanismes d'implication de transporteur AtHKT1;1 ont été proposés : le dessalement de la sève ascendante dans les racines en contrôlant l'absorption de Na^+ dans les cellules du parenchyme xylémique et la recirculation du Na^+ de la tige vers les racines via la sève du phloème (Berthomieu, 2003; Sunarpi et al., 2006) (figure 2).

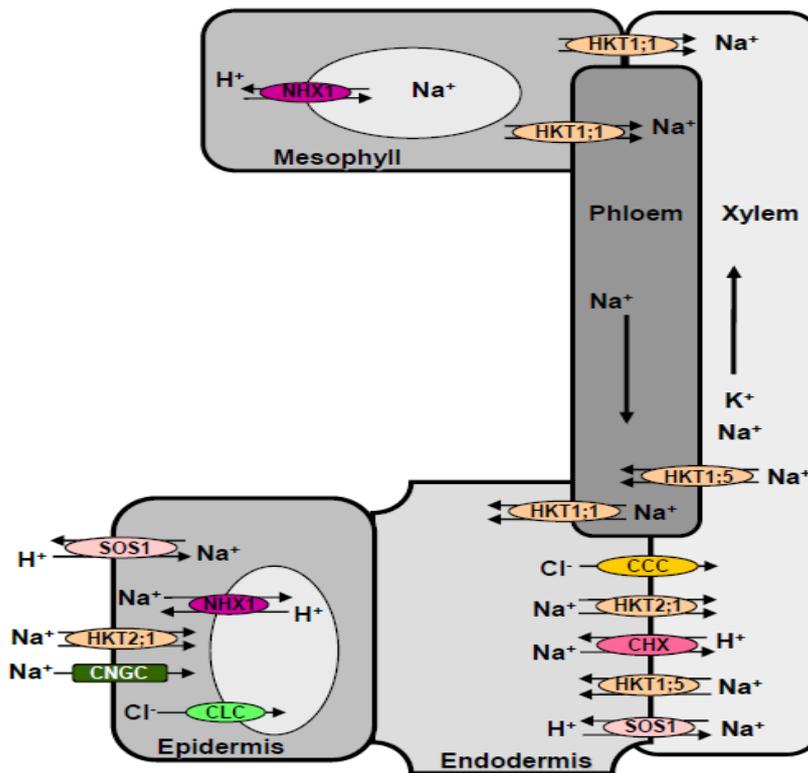


Figure 2. Fonctions et localisation des protéines de transport du Na^+ et Cl^- dans la plante (Mian et al., 2011)

D'une manière générale, la figure ci-dessus illustre la localisation des transporteurs du Na^+ et du Cl^- entre autres les transporteurs HKT dans la plantes. Il est supposé que l'absorption de sodium Na^+ à la limite sol-racine est assurée principalement par le biais des canaux cationiques non sélectifs comme les CNGC et les transporteurs de la famille HKT. Chez les halophytes, les canaux K^+ tels que AKT1 peuvent également être impliqués dans l'absorption de Na^+ . Le transporteur AtHKT1;1 aide à contrôler l'accumulation de Na^+ dans les tiges et la récupération de Na^+ à partir du xylème. HKT2;1 intervient dans la forte affinité d'absorption

du Na^+ dans le riz, mais peut également participer à la charge de Na^+ dans le xylème. HKT1:5 situé dans les cellules de parenchyme de xylème du riz réduit la concentration du Na^+ dans le xylème et réduit ainsi la charge de Na^+ dans les tiges. L'efflux de Na^+ dans la vacuole et l'apoplaste se produit via des systèmes d'antiport tels que NHX1 au niveau du tonoplaste et SOS1 au niveau de la membrane plasmique, et les mécanismes sont conservés chez de nombreuses espèces. SOS1 peut également induire une charge de Na^+ dans le xylème avec d'autres antiports tels que les CHX. L'absorption et le transport du chlorure ne sont pas bien élucidés. Les canaux de chlorure (CLC) peuvent être impliqués dans la compartimentation de Cl^- dans la vacuole et les co-transporteurs de cations de chlorure (CCC) peuvent induire une charge xylémique de Cl^- dans la plante. Le mécanisme et l'identité des systèmes d'absorption du Cl^- ne sont pas connus (Mian et al., 2011).

III.2.3. Maintien d'un rapport Na^+/K^+ minime dans les tiges

Il est largement admis que le maintien d'un rapport Na^+/K^+ cytosolique minime dans les tiges des glycophytes est un critère important et une condition préalable à la tolérance au stress salin (Assaha et al., 2017). Cette capacité de maintenir ce rapport est considéré comme une stratégie critique pour la tolérance (Torabi, 2014) car cela garantit des fonctions métaboliques cellulaires optimales (Assaha et al., 2017). Pour atteindre ceci, la régulation du chargement du xylème au niveau de la racine est cruciale (Assaha et al., 2017). Les transporteurs SOS et HKT, décrits précédemment, parviennent à assurer cet équilibre. Zhu et al. (2016) ont indiqué l'existence d'un lien utile entre les voies SOS1 et HKT pour la tolérance au stress causé par le sel.

Chez les plantes, la concentration optimale de K^+ serait d'environ 100-150 mM et la valeur minimale du rapport K^+/Na^+ d'environ 1 (Torabi, 2014). Chez le blé, les résultats obtenus par Chhipa et Lal (1995) ont montré que pour désigner une variété tolérante au sel le rapport Na^+/K^+ de sa graine doit être inférieur à 0.15 et celui de sa paille inférieur à 0.4. Ce rapport au stade de tallage est de 0.5.

III.3. Synthèse des protéines de stress

Différentes classes de protéines sont *de novo* synthétisées dans les conditions du stress salin entre autres les protéines LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) (Dajic Stevanovic, 2006; Tester and Davenport, 2003). Ce sont des protéines très hydrophiles identifiées pour la première fois dans les graines de coton et de blé tendre durant l'embryogénèse (Dure et al., 1981). Les gènes codant les protéines LEA représentent l'un des plus gros groupes de gènes

régulés par le stress osmotique. Chez les plantes, ces protéines se trouvent dans de nombreux compartiments cellulaires et sont localisés aussi bien dans le cytosol que dans le noyau (Battaglia and Covarrubias, 2013). Elles sont fortement accumulées pendant les phases tardives de la maturation des graines (Hundertmark and Hinch, 2008). De plus, leur présence est généralement associée à la tolérance des cellules à la déshydratation induite par les différents stress. Elles peuvent jouer le rôle d'osmosenseur, elles seraient impliquées dans le maintien des structures membranaires et protéiques en maintenant un niveau d'hydratation minimale autour de celles-ci et en empêchant leur dénaturation ou leur changement de conformation (Aberlenc-Bertossi et al., 2006; Battaglia and Covarrubias, 2013; Hoekstra et al., 2001). Chez le pois, Grelet et al. (2005) ont montré qu'après déshydratation la protéine LEA (LEAM) a partiellement empêché l'inactivation de deux enzymes mitochondriales. Certaines de ces molécules chaperonnes pourraient également réduire les effets négatifs des ions en situation de stress salin. Les protéines déhydrines appelées aussi protéines *Rab responsive to ABA* appartiennent à la famille D11 des LEAs du groupe II et sont présentes dans l'ensemble du règne végétal (B. Jarvis et al., 1996). Le terme déhydrine apparue en 1989 désigne des protéines induites par une déshydratation (Close et al., 1989). Les déhydrines (DHNs) sont très abondantes dans les embryons des graines de plantes tolérantes à la dessiccation et sont souvent accumulées en conditions de stress hydrique (Campalans et al., 1999). L'association des déhydrines avec les structures protéiques semble avoir un rôle protecteur vis-à-vis de la surface membranaire des protéines et des lipides (Close, 1996). Brini et al. (2007) ont montré que l'expression de la protéine déhydrine DHN5 de blé chez *Arabidopsis* a conduit à l'amélioration de sa tolérance au stress osmotique et salin. Du point de vue structural, les déhydrines ont un poids moléculaire qui varie entre 9 et 200 kDa (Battaglia and Covarrubias, 2013; Close, 1996). Elles se caractérisent par la présence d'une séquence conservée d'acides aminés au voisinage de leurs extrémités carboxy-terminales (Close, 1996). Il a été prédit que les DHNs forment une suite d'hélices alpha-amphipatiques qui sont considérées comme une importante propriété structurale de ces protéines (Hanin et al., 2011). Conformément à ces caractéristiques, d'autres fonctions ont été suggérées pour les protéines déhydrines y compris la séquestration des ions et leur rôle de molécule chaperonne (Tripepi et al., 2011). Il a été aussi suggéré que les déhydrines pourraient avoir une activité antioxydante en conditions de stress salin (Sun and Lin, 2010). Par exemple, Hara et ses collaborateurs (2004) ont démontré que chez le citron la déhydrine CuCOR19 détoxifie les radicaux hydroxyles et les radicaux peroxy qui sont toxiques aux cellules. D'autres études rapportent le rôle des DHNs dans l'atténuation de la formation des radicaux hydroxyles par la

chélation et la séquestration des ions métalliques sources de radicaux libres. Cette aptitude de se lier aux métaux participe dans la protection de la plante contre les formes actives d'oxygène (Sun and Lin, 2010). Chez le blé, Wang et al. (2014) ont identifié 54 gènes de déhydrines qui codent 7 types de déhydrines. Un groupe de 10 gènes appartient aux déhydrines induites par les contraintes de déshydratation comme le stress salin et le stress hydrique en raison de la présence de plusieurs éléments ABRE dans leurs promoteurs (Kosová et al., 2014). L'expression de nombreux gènes DHNs est régulée par la phytohormone acide abscisique ABA (Hanin et al., 2011).

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*) (Wang et al., 2003). Celles-ci permettent de maintenir les protéines dans leurs conformations fonctionnelles, le repliement des protéines dénaturées et d'empêcher l'agrégation des protéines (Timperio et al., 2008; Toivonen and 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 and Hodges, 2011).

L'osmotine est un autre type de protéine de stress qui ne manque pas d'importance et qui est accumulée dans la plante en conditions salines. L'osmotine contribue dans la protection des cellules du stress osmotique en maintenant l'équilibre osmotique mais son mécanisme détaillé dans la tolérance au sel n'est toujours pas clair. Les mécanismes probables de cette protéine dans la tolérance au stress salin est la séquestration et la compartimentation des ions Na⁺ dans les vacuoles et les espaces intercellulaires, l'accumulation de la proline et d'autres osmolytes et l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes (SOD, APX) (Wan et al., 2017).

III.4. Système antioxydant

Dans des conditions de croissance normales, la production des espèces réactives d'oxygène ROS dans les cellules est permanente mais faible, alors que pendant le stress, leur taux de production augmente. L'accumulation des ROS pendant le stress résulte d'un déséquilibre entre la production et l'élimination des ROS (Mittler, 2002; Mittler et al., 2004). Le niveau des radicaux superoxydes et du peroxyde d'hydrogène doit être étroitement contrôlé (Mittler, 2002). Pour éviter les dommages potentiels causés par les molécules toxiques aux composants cellulaires et maintenir aussi le métabolisme et la croissance des plantes, cet équilibre est assuré par des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Caverzan et al., 2016). Le pool enzymatique comprend diverses enzymes antioxydantes telles que la superoxyde

dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxidase (GPX), peroxidase (POX), peroxyredoxines (Prxs) et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion (AsAGSH) comme l'ascorbate peroxydase (APX), la monodehydroascorbate reductase (MDHAR), la dehydroascorbate reductase (DHAR) et la glutathion reductase (GR) (Esfandiari et al., 2007; Hossain et al., 2011b; Mittler, 2002; Mittler et al., 2004). Les composants non enzymatiques incluent l'ascorbate (AsA) et le glutathion (GSH) ainsi que le tocophérol, les caroténoïdes et les composés phénoliques (Caverzan et al., 2016; Mittler et al., 2004).

Plusieurs études ont rapporté le changement de l'activité des enzymes du système antioxydant pour contrôler le stress oxydatif dans les plantes soumises au stress salin. Chez le blé, par exemple, il a été montré que les mécanismes de la détoxification des ROS sont positivement activés. En effet, la majorité des enzymes ont augmenté leurs activités en réponse au stress salin (Caverzan et al., 2016). Une augmentation de l'activité enzymatique de la SOD et de la CAT a été observée dans les génotypes de blé par Sairam et al. (2002) et Esfandiari *et al.* (2007) en réponse au traitement salin. Pour la détoxification des ROS en excès, Heidari et ses collaborateurs (2009) ont également noté que la CAT a augmenté dans le blé face au stress salin. De plus, il a été démontré que la surexpression du gène de la catalase de blé a conféré la tolérance au stress salin dans les plants transgéniques du riz (Matsumura et al., 1997). En effet, le niveau intracellulaire du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est régulé principalement par l'enzyme catalase (Willekens et al., 1995). En réponse au stress salin, l'accroissement de l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX) a été aussi rapporté pour avoir un rôle dans la détoxification d' H_2O_2 au niveau des cellules (Willekens et al., 1995). Concernant la SOD, l'augmentation de l'activité de cette enzyme chez le blé a été observée en réponse au traitement salin (Sairam et al., 2002; Eyidoğan et al., 2003; Esfandiari et al., 2007). Les superoxydes dismutases constituent une ligne de front dans la défense contre les ROS, elles catalysent la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ (radical superoxyde) en H_2O_2 . Ces enzymes sont classées en fonction de leur localisation subcellulaire et de leur cofacteur métallique (Cu/Zn, Mn, Fe et Ni) (Caverzan et al., 2016; Chang-Quan and Rui-Chang, 2008). Les SOD se trouvent sous différentes isoformes, les plus connues des SOD présentes dans les plantes sont les SOD à cuivre-zinc (Cu/Zn SOD) dans le cytosol et le chloroplaste, les SOD à manganèse (Mn-SOD) dans la mitochondrie, les SOD à fer ferreux (Fe-SOD) dans le chloroplaste (Reilly et al., 2004; Stephenie et al., 2020). L'acide ascorbique et le glutathion, que l'on trouve à forte concentration dans les chloroplastes et d'autres compartiments cellulaires, jouent également un rôle crucial dans la défense des plantes contre le stress oxydatif (Miller et al., 2010).

L'augmentation observée des activités enzymatiques est étroitement liée avec la diminution des dommages oxydatifs et résulte de l'activation de l'expression de ces enzymes. Il a été rapporté que l'expression de nombreuses enzymes antioxydantes est positivement corrélée à des niveaux de tolérance plus élevés vis-à-vis des stress abiotiques entre autres le stress salin (Apel and Hirt, 2004; Caverzan et al., 2016). Chez le riz, une plante modèle des céréales, l'augmentation de l'expression des gènes de ces enzymes antioxydantes est une réponse aux facteurs du stress. (Caverzan et al., 2016). Cependant en terme de tolérance au stress oxydatif, il existe des différences entre les génotypes (Munns and Tester, 2008; Torabi, 2014).

III.5. Ajustement osmotique

Les plantes sont capables de supporter le déficit hydrique engendré par le stress salin, en ajustant plus ou moins rapidement le potentiel osmotique de leurs compartiments cellulaires avec celui du milieu extérieur grâce à une modification de leur contenu biochimique. Cette réaction se traduit par une synthèse de composés d'origine organique tels que les sucres, les polyols (le mannitol, le sorbitol), les acides aminés (proline, alanine, β -alanine), des composés d'ammonium quaternaire (glycine bétaine, proline bétaine, la choline-o-sulfate) et aussi des composés d'origine inorganique comme les ions essentiellement le potassium. Ces composés ont en commun la propriété de ne pas être chargés à pH neutre et d'être hydrophiles susceptibles de s'accumuler sans perturber les processus cellulaires, ils agissent donc comme osmolytes compatibles (Gagneul et al., 2007). Ces osmolytes sont supposés avoir un rôle important dans l'ajustement osmotique en réponse à la contrainte osmotique telle que la salinité. L'accumulation active de ces métabolites non toxiques, à localisation cytoplasmique, interviennent pour la rétention de l'eau en réduisant le potentiel hydrique des cellules qui a pour objectif le maintien de leur turgescence (Gagneul et al., 2007). Les osmolytes pourraient remplacer l'eau dans certaines réactions biochimiques et peuvent également s'associer à des lipides ou à des protéines et empêcher ainsi la désintégration des membranes, la dissociation des complexes protéiques ou l'inactivation d'enzymes (Zhang et al., 1999).

Cette réponse de mise en place d'un état de régulation hydrique constitue chez diverses espèces végétales un mécanisme important de l'adaptation au stress salin. Parmi les osmorégulateurs, les sucres, l'acide aminé proline et la glycine bétaine sont les plus importants qui s'accumulent en conditions salines. Chez les plantes supérieures, le stress osmotique induit la synthèse des protéines dans leurs tissus qui peuvent également contribuer dans l'ajustement osmotique.

III.5.1. Accumulation des sucres

Outre leur fonction de stockage et de transport d'énergie, le rôle des hydrates de carbones tels que les sucres dans l'ajustement osmotique en conditions de stress a été rapporté chez différentes espèces végétales. Il semblerait que lorsque les glycophytes sont exposées à une forte salinité les sucres pourraient contribuer à plus de 50% à l'ajustement osmotique en conditions de salinité (Parvaiz and Satyawati, 2008; Torabi, 2014). Ils pourraient agir comme osmoticum en protégeant les macromolécules (enzymes) et contribuer à la stabilité des structures membranaires. Des travaux ont montré une relation entre l'accumulation de sucres chez les plantes et leur niveau de tolérance à la salinité (Nemati et al., 2011; Rahimi and Biglarifard, 2011). Cette accumulation de sucres solubles sous l'action du stress salin peut être due à l'hydrolyse de l'amidon ou à une faible consommation des glucides par les tissus (Parida et al., 2002 ; Hare et al., 1998). Parida et al. (2002) ont rapporté que les carbohydrates tels que les mono et les disaccharides (glucose, fructose, saccharose, fructanes) et les polysaccharides tel que l'amidon s'accumulent en réponse au stress salin et jouent un rôle majeur dans l'osmoprotection, l'ajustement osmotique, le stockage du carbone et l'élimination des radicaux (Torabi, 2014). Rosa et al. (2009) ont précisé que tous les sucres solubles ne jouent pas le même rôle dans les changements associés au métabolisme des plantes stressées. Alors que le glucose est le sucre majoritairement accumulé dans les tissus foliaires, le saccharose participe également dans la régulation osmotique et la protection des macromolécules. Tandis que le fructose, n'est pas lié à l'osmoprotection et semble lié à la synthèse des métabolites secondaires comme substrat dans la synthèse de la lignine et des composés phénoliques (Rosa et al., 2009). En outre, il a été observé que les dérivés alcools de sucre (polyols, le mannitol, sorbitol) s'accumulent dans les plantes soumises au stress salin. Il a été rapporté que les polyols par exemple interviennent dans l'osmoprotection des membranes et protéines vis-à-vis des ROS et dans la nutrition carbonée pendant le stress (Bohnert and Jensen, 1996; Sairam and Tyagi, 2004). Singer et Lindquist (1998) dans une étude sur les stress abiotiques ont constaté l'accumulation du tréhalose. En tant que disaccharide, il réduit l'agrégation des protéines dénaturées et protège les protéines et les membranes cellulaires (Torabi, 2014). Actuellement, il est admis que les sucres peuvent agir en tant que signal métabolique en réponse au stress (Gupta and Kaur, 2005; Chaves et al., 2009). Les voies de signalisation des sucres interagissent avec les mécanismes de stress pour moduler les réponses métaboliques des plantes. Cependant, les mécanismes impliqués dans la transduction glucidique et la régulation des gènes de sucres dans les plantes supérieures ne sont pas encore clairement identifiés. Les progrès réalisés ont montré que dans les conditions

de stress le métabolisme et les fluctuations des sucres solubles sont un processus dynamique impliquant simultanément des changements dans l'assimilation de CO₂, dans la répartition du carbone et dans l'activité des enzymes ainsi que dans l'expression de gènes spécifiques.

III.5.2. Accumulation de la proline

La proline est l'un des acides aminés le mieux étudié et la recherche a révélé qu'il est l'osmolyte le plus fréquemment accumulé dans les conditions du stress environnemental comme la sécheresse et la salinité chez un grand nombre d'espèces. Le niveau d'accumulation de la proline dans les plantes varie d'une espèce à l'autre et peut être 100 fois plus élevé qu'en conditions normales (Verbruggen and Hermans, 2008a). Sous stress hydrique, la concentration en proline peut dépasser 80% du pool d'acides aminés totaux chez certaines plantes alors qu'elle ne représente que 5% dans les plantes témoins (Kavi et al., 2005). Dans de nombreuses espèces végétales, l'accumulation de la proline sous le stress salin a été corrélée avec la tolérance au stress (Hayat et al., 2012). L'accumulation de la proline en réponse à la contrainte saline a été observée chez diverses espèces de cultures telles que le riz (Zuther et al., 2007), l'orge (Widodo et al., 2009), le blé (El-Bassiouny and Bekheta, 2005), le haricot vert (Nagesh Babu and Devaraj, 2008), l'épinard (Di Martino et al., 2003), le soja (Sobhanian et al., 2011), le melon (Kaya et al., 2007), le basilic (Orsini, 2008). Il a été suggéré que la proline accumulée peut servir de critère de sélection pour la tolérance de la plupart des espèces aux conditions stressantes (Hasanuzzaman et al., 2013). Cependant, certains rapports ont révélé des différences spécifiques dans l'accumulation de la proline liées à l'espèce (Dar et al., 2016). En effet, il existe des différences dans les niveaux constitutifs de la proline (et d'autres métabolites) entre les espèces (et les variétés) tolérantes et sensibles et différentes espèces montrent des réponses conservées (ou divergentes) de métabolites vis-à-vis de la salinité. Ces tendances ont été démontrées par la comparaison d'*Arabidopsis thaliana* avec une espèce relativement tolérante au sel *Thellungiella halophila* (halophyte) (Gong et al., 2005) et en comparant les différents variétés de riz (*Oryza sativa*) avec les différents niveaux de la salinité (Widodo et al., 2009; Zuther et al., 2007). De ce fait, la corrélation entre l'accumulation de la proline et la tolérance des plantes au stress salin (et le stress abiotique en général) n'est toujours pas claire (Dar et al., 2016). La proline accumulée dans les feuilles dans les tissus végétaux était considérée comme un symptôme des dommages dus au sel plutôt qu'une réaction de tolérance au sel (Dar et al., 2016). Donc entre réponse adaptative au sel ou bien signe de perturbation métabolique comme une conséquence du stress, cette corrélation positive entre les niveaux élevés de la proline et la tolérance au sel

n'est pas toujours évidente (Hanson et al., 1990; Jithesh et al., 2006; Szabados and Savoure, 2010).

La preuve la plus convaincante que l'accumulation de la proline est en effet un élément essentiel de l'adaptation d'une cellule au stress hyperosmotique provient des études sur l'osmorégulation chez les bactéries. La proline s'est révélée être un osmoprotecteur puissant dans les bactéries et les mutants surproducteurs de la proline d'*Echerichia* présentent clairement une augmentation de l'osmotolérance. Ces observations ont suggéré que chez les plantes également, l'accumulation de la proline peut jouer un rôle direct et adaptatif pour faire face aux effets du stress osmotique. Des démonstrations de la fonction protectrice de la proline ont été donc fournies par les études de mutants et de plantes transgéniques présentant une hyperaccumulation ou un déficit en proline. Szabados et al., (2011) ont montré par exemple, que les mutants d'*Arabidopsis* (*p5cs1*) ne contenant que 10% de la proline par rapport au type sauvage sont hypersensibles au stress salin. Ils ont produit plus de ROS et de produits de la peroxydation lipidique, ce qui confirme l'importance de la proline dans la tolérance au stress, en particulier dans le scavenging des ROS (Székely et al., 2008). Par ailleurs, l'accumulation de la proline et l'amélioration de la tolérance du tabac au sel ont été atteints en augmentant la voie de biosynthèse par le biais de la surexpression de cDNA P5CS du Vigna dans le tabac transgénique (Kishor et al., 1995).

La forte accumulation de la proline dans les plantes stressées se produit dans le cytosol où elle contribue de manière substantielle dans l'ajustement osmotique cytoplasmique (Carillo et al., 2011). Cette accumulation est principalement due à la synthèse *de novo* associée à sa faible oxydation et se produit rapidement après l'apparition du stress d'où l'hypothèse de proposer cette accumulation comme une réaction initiale au stress salin et non pas une réponse associée à la tolérance (Carillo et al., 2011). L'accumulation de la proline peut être médiée à la fois par les voies de signalisation dépendantes de l'ABA et indépendantes de l'ABA (Zhu, 2002). Il est bien connu que cette accumulation de la proline est liée à son rôle essentiel dans l'osmoprotection des cellules végétales. Chez le blé dur, la proline peut contribuer à plus de 39 % de l'ajustement osmotique dans les compartiments cytoplasmiques des feuilles (Carillo et al., 2011, 2008). Actuellement, il y a une forte évidence que la proline accumulée joue plusieurs autres rôles que l'ajustement osmotique en réponse au stress (Ben Rejeb et al., 2012; Szabados and Savoure, 2010). Elle pourrait être impliquée dans la stabilisation des structures cellulaires (les membranes et les protéines), dans le piégeage des radicaux libres et le quenching de l'oxygène singulet (Burritt, 2012; Matysik et al., 2002), jouer un rôle dans le

maintien du potentiel rédox cellulaire (Kavi et al., 2005; Servet et al., 2012) et aussi dans la participation à la transmission du signal du stress (Verslues and Sharma, 2010) :

‣ **Fonction d'osmolyte**

La proline est une des petites molécules classées comme osmolyte ou osmoprotectrice. Son rôle fondamental est l'augmentation de la capacité de la plante à résister à la déshydratation cellulaire causée par la salinité. Son accumulation dans le cytoplasme conduit à la réduction du potentiel hydrique cellulaire à un niveau faible que le potentiel externe ; ceci permet le déplacement de l'eau vers la cellule pour maintenir le statut hydrique et la turgescence des cellules. Dans la plante, la proline s'accumule généralement dans le stroma du chloroplaste et dans le cytoplasme. Etant donné que le cytoplasme est une petite fraction du volume cellulaire, les concentrations locales de la proline dans le cytoplasme peuvent être beaucoup plus élevées que le volume global des tissus. Il a été suggéré que les petites fluctuations dans les niveaux cytosoliques de la proline pourraient avoir d'importants effets sur l'ajustement osmotique en induisant une accumulation supplémentaire du potassium et d'autres solutés dans la vacuole (Verslues and Sharma, 2010).

‣ **Protection de la structure cellulaire pendant la déshydratation**

Lorsque la teneur hydrique des cellules diminue sous l'effet du stress osmotique, la proline et les autres molécules osmolytes qui partagent ces mêmes propriétés et aussi certaines classes des protéines LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) peuvent agir comme des substituts hydriques pour stabiliser la structure cellulaire (Sharma and Verslues, 2010). Il semble que la proline affecte les enzymes/protéines en stabilisant leur conformation active et les protège ainsi contre les perturbations conformationnelles causées par les ions (Hayat et al., 2012; Paleg et al., 1981). En effet grâce à sa forme zwitterion, la proline a des propriétés structurales qui consistent en la présence de charges aussi bien négatives que positives au niveau de ses groupes carboxylique et azoté respectivement (Verslues and Sharma, 2010). Son extrémité carboxyle hydrophile lui permet de créer des liaisons hydrogènes et des interactions hydrophiles avec des macromolécules et des molécules d'eau (Rajendrakumar et al., 1994; Sharma and Verslues, 2010). Ces propriétés lui permettent de s'accumuler à des niveaux élevés sans perturber la structure et le métabolisme des cellules (d'où son accumulation préférentielle dans le cytoplasme) (Verslues and Sharma, 2010). La proline contribue donc dans le maintien de l'intégrité membranaire et la protection des protéines de la dénaturation (Kumar et al., 1998; Solomon et al., 1994). Elle peut interagir avec les protéines pour protéger

leurs structures et donc protéger leurs activités. Elle est impliquée, par exemple, dans la conservation et la stabilisation de certaines enzymes telles que la RubisCO (Solomon et al., 1994; Szabados and Savoure, 2010). Dans la littérature, il est souvent rapporté que la proline fonctionne comme une molécule chaperonne qui empêche l'agrégation des protéines. Ignatova et Grierasch (2006) ont montré que la proline peut empêcher l'agrégation de la protéine cellulaire importante dans le domaine biomédical en conditions du stress salin. De plus, l'activité photosynthétique et le complexe II de la chaîne mitochondriale de transfert d'électrons sont protégés par la proline sous le stress salin (Hamilton and Heckathorn, 2001).

► Rôle dans la régulation de l'homéostasie cellulaire

Il a été aussi suggéré que l'accumulation de la proline aide le maintien du pH cytosolique et le statut redox des cellules (Hayat et al., 2012). Elle est l'un des importants composants du maintien de l'homéostasie cellulaire en conditions du stress hydrique (Sharma and Verslues, 2010). Généralement, le cycle de la biosynthèse et la dégradation de la proline permet l'équilibre du potentiel redox de la plante en développement normal et aussi lors d'un déficit hydrique (Amini et al., 2015). En conditions stressantes, le CO₂ devient moins disponible pour l'activité du cycle Calvin suite à la fermeture des stomates, ce qui conduit à la réduction de la consommation du pouvoir réducteur NAD(P)H/H⁺ (Hare et al., 1998). L'augmentation de la biosynthèse de la proline dans le chloroplaste permet le maintien d'un faible rapport NADPH/NADP compatible avec le métabolisme cellulaire. Elle permet la consommation du réductant principalement sous forme de NADPH produit lors de la phase primaire de la photosynthèse et fournit l'accepteur final d'électrons NADP⁺ ce qui empêche la régénération des ROS et protège ainsi l'appareil photosynthétique (Hare and Cress, 1997). L'oxydation de la proline dans les mitochondries fournit le pouvoir réducteur, et les électrons qui en résultent sont transférés à un accepteur de la chaîne respiratoire (Szabados and Savoure, 2010). Cet effet du métabolisme de la proline sur l'état redox intracellulaire a été étudié par Phang (1985) qui ont proposé pour la première fois le rôle du cycle proline-P5C dans le maintien du niveau cytosolique de NADP⁺/NADPH (Liang et al., 2013). Les mutants p5cs1 ont montré une forte réduction de l'accumulation de la proline en réponse au stress et une réduction du rapport NADP : NADPH (Sharma et al., 2011; Székely et al., 2008). La proline est donc considérée importante pour la tolérance au stress en améliorant le potentiel redox grâce à la reconstitution du stock NADP (Anwar Hossain et al., 2014).

La proline peut également préserver le pool intracellulaire du glutathion un majeur tampon redox des cellules (Anwar Hossain et al., 2014).

De plus, la proline peut jouer un rôle central dans le stockage et le transfert d'énergie (Liang et al., 2013). Les modifications du métabolisme de la proline peuvent être plus bénéfiques pour la tolérance des plantes au stress environnementaux que les propriétés de l'acide aminé lui-même (Ben Rejeb et al., 2012). Verslues et sharma (2010) ont suggéré que la signification du mouvement de la proline dans les tissus et les organes végétaux et la séparation spatiale de sa synthèse et de son catabolisme dans les différents tissus est liée à sa participation aussi bien dans la régulation de l'état redox que dans les mécanismes du transfert d'énergie pendant le stress (Anwar Hossain et al., 2014). Dans la phase post-stress, la proline peut aussi jouer un rôle essentiel comme source d'énergie, de carbone et d'azote via son catabolisme (Vartanian et al., 1992). En effet, le catabolisme de la proline dans les mitochondries est lié à la respiration oxydative et engendre de l'énergie nécessaire pour reprendre la croissance après le stress (Szabados and Savoure, 2010). Ce métabolisme oxydatif de la proline dans les mitochondries aide à stimuler la phosphorylation oxydative et la synthèse de l'ATP (adénosine triphosphate) dans les tissus en cours de récupération d'un stress (Liang et al., 2013). Il a été expliqué que l'oxydation d'une seule molécule de la proline peut produire plusieurs molécules d'ATP, fournissant ainsi une énergie importante pour la cellule (Liang et al., 2013).. Donc la diminution rapide de la teneur de la proline dans la plante après le stress est importante pour la reprise de la croissance et ceci constitue également un déterminant vital de la tolérance globale au stress (Hayano-Kanashiro et al., 2009). Sharma et al. (2011) ont constaté que certains tissus comme l'apex des racines et le méristème des tiges d'*Arabidopsis* maintiennent cette oxydation de la proline même pendant le stress.

En général, le flux métabolique de la proline conduit à la protection des cellules en aidant les tissus à maintenir l'énergie cellulaire et l'équilibre $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (figure 3).

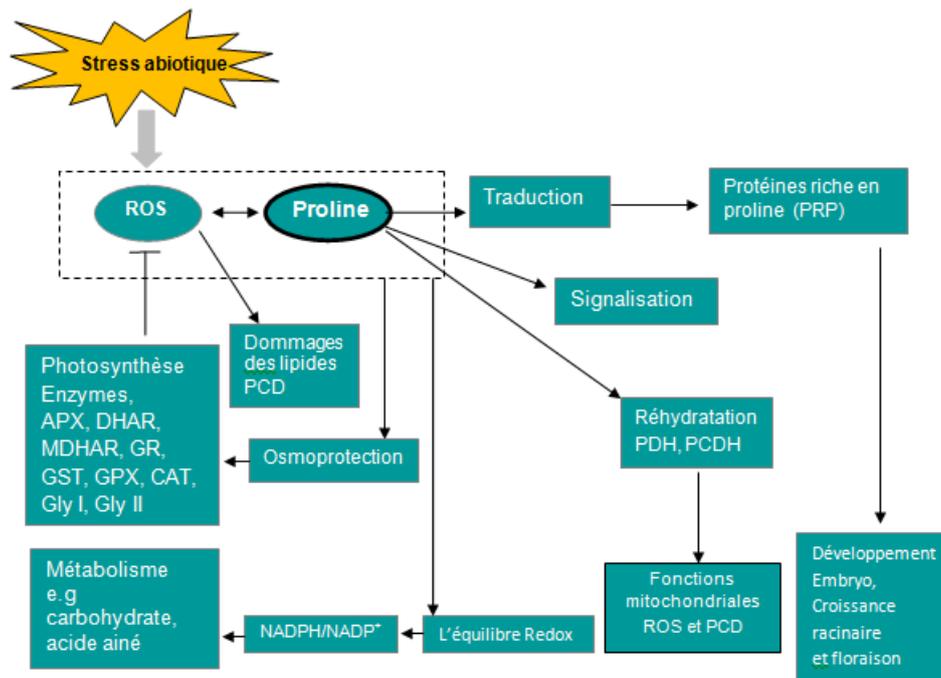


Figure 3. Fonctions de la proline dans la croissance, le développement et la tolérance des plantes au stress. *Utilisée pour la synthèse des protéines, la proline a une fonction protectrice en tant qu'osmolyte, contribue dans le maintien de l'équilibre rédox par la régulation du métabolisme des ROS, améliore les performances photosynthétiques, peut réguler le développement et est un élément de la signalisation métabolique contrôlant les fonctions mitochondriales. PCD :mort cellulaire programmé, PDH proline deshydrogenase, P5CDH pyrroline-5-carboxylate deshydrogénase* (Anwar Hossain et al., 2014).

► Proline comme molécule signal

En réponse au stress abiotique et biotique, l'accumulation de la proline paraît être une partie de la signalisation du stress qui influence les réponses adaptatives (Hayat et al., 2012). Hare et Cress (1997) ont suggéré que la proline peut agir à la fois comme osmoticum et une molécule signal régulatrice, son transport entre les différents compartiments dans la plante pourrait servir de signal métabolique. Le chercheur Stoyanov (2005), lui, a suggéré que l'accumulation de la proline pourrait être un symptôme de développement d'un stress hydrique sévère dans les plantes. Elle pourrait fonctionner comme un signal métabolique qui régule le stock en métabolites et la balance rédox, et agirait sur les processus de signalisation associés au stress salin via le contrôle et l'induction de l'expression de plusieurs gènes (Szabados and Savoure, 2010). Les gènes activés par la proline et qui sont impliqués dans la réponse au stress salin possèdent au niveau de leur promoteur des éléments de réponse à la proline tel que PRE (*Pro-or hypoosmolarity-responsive element*) et ACTCAT (*Cis-Acting Element for proline*) (Chinnusamy et al., 2005). Précédemment, le travail d'Iyer et Caplan (1998) a démontré que

le cycle de biosynthèse et de catabolisme de la proline pourrait sélectivement augmenter l'expression d'au moins trois gènes dans le riz (*Oryza sativa* L.). Szabados et Savoure (2010) ont rapporté que la proline pourrait cibler l'expression des gènes essentiels pour la récupération des plantes après le stress (Anwar Hossain et al., 2014). Le rôle de la proline dans la signalisation métabolique a été mis en évidence pour la première fois par l'équipe de Phang (2012) via les espèces réactives d'oxygène ROS dans les cellules des mammifères. En effet, la surproduction des ROS est connue pour ses dommages intracellulaires sur diverses molécules biologiques, cependant, ils sont aussi des molécules signal importantes. L'augmentation de la formation des ROS endogène par le métabolisme de la proline joue également un rôle important dans la signalisation cellulaire des plantes (Liang et al., 2013). Le catabolisme de la proline dans la mitochondrie peut influencer les voix de la signalisation par la régénération des ROS par le biais de la chaîne de transport d'électrons. L'augmentation de ces espèces serait impliquée dans la réponse hypersensible des plantes (Liang et al., 2013). Toutefois, malgré que le métabolisme de la proline et ses multiples fonctions dans la plante en conditions du stress ont été étudiés pendant plus de 40 ans, peu est connu sur les voies de signalisation dans lesquelles la proline est impliquée (Anwar Hossain et al., 2014; Hayat et al., 2012).

► **Détoxification des espèces réactives d'oxygène**

Le stress salin et hydrique sont connus pour leur induction du stress oxydatif dans la plante. A l'instar de son rôle signalétique, plusieurs laboratoires ont montré que la proline accumulée dans les tissus végétaux en conditions stressantes peut être aussi importante dans la protection contre les dommages oxydatifs causés par les espèces réactives d'oxygène (Matysik et al., 2002; Szabados and Savoure, 2010). Il a été rapporté qu'elle possède une activité antioxydante et peut agir comme quencher de l'oxygène singulet (1O_2) et du radical hydroxyl ($\cdot OH$). L'effet de la proline dans le mécanisme de la détoxification des ERO comme un scavenger *in vitro* des radicaux hydroxyl a été signalé pour la première fois par Smirnoff and Cumbes (1989). Par ailleurs, Alia et al. (2001) ont montré que la production de 1O_2 dans les thylacoïdes des cotylédons de la moutarde (*Brassica Juncea*) a été remarquablement supprimée par la proline. En outre, des études *in vivo* ont confirmé la capacité de la proline à réagir directement avec les ROS dans la plante (Ben Rejeb et al., 2014; Liang et al., 2013; Székely et al., 2008). Grâce à ses propriétés chimiques, la proline libre et la proline liée à un polypeptide réagit avec $OH\cdot$ et H_2O_2 (pH 7-8) pour former des adduits de radicaux stables et libres dérivés de la proline et d'hydroxyproline (Liang et al., 2013). (Banu et al., 2009; Hoque

et al., 2007a, 2007b; Islam et al., 2009) ont montré que les activités des enzymes antioxydantes de la catalase, de la peroxydase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion-S-transférase ont significativement augmenté dans le tabac par un apport *in vitro* de la proline en conditions salines. La proline jouerait donc le rôle d'une molécule anti-oxydante et/ou stabiliserait l'activité des enzymes impliquées dans la défense contre le stress oxydatif (Hoque et al., 2007a, 2007b; Ozden et al., 2009). Elle est capable de réguler les gènes responsables des antioxydants (de Carvalho et al., 2013). Il a été rapporté que le cycle pyrrolidine de la proline (cycle à 5 atomes) a un faible potentiel d'ionisation qui désactive efficacement l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) par le mécanisme de transfert de charge dans lequel l'oxygène moléculaire retourne vers l'état de triplet (Liang et al., 2013). De manière générale, cela offre des possibilités de réduction par la proline des dommages oxydatifs des macromolécules cellulaires essentielles (protéines, ADN, lipides) (Ashraf and Foolad, 2007; Matysik et al., 2002).

Ces fonctions ne sont pas exclusives et la raison pour laquelle les plantes accumulent la proline réside probablement dans le fait qu'elle remplit plusieurs de ces rôles à la fois. La fonction de la proline varie probablement selon les différents stress en fonction de sa différentielle accumulation sous stress salin et sous un faible potentiel hydrique et aussi la différentielle régulation de certaines enzymes de son métabolisme par ces deux contraintes. Certaines de ces fonctions telle que l'ajustement osmotique dépend des propriétés de la proline elle-même (solubilité,..) et de la quantité accumulée pendant le stress. D'autres fonctions comme l'équilibre rédox dépendent du métabolisme de la proline et du flux résultant de la synthèse et la dégradation de la proline (Sharma and Verslues, 2010).

Les fonctions protectrices de la proline peuvent être partagées avec d'autres solutés compatibles qui s'accumulent pendant le stress tel que la glycine bétaïne et les sucres. Généralement, ces composés ne sont pas rapidement catabolisés et donc ne peuvent pas contribuer dans l'oxydoréduction mais leurs rôles dans l'ajustement osmotique et dans la protection des structures cellulaires ne manquent pas d'importance. Par ailleurs, la proline est souvent présente en fortes concentrations et assure une grande contribution substantielle dans le potentiel osmotique en particulier dans les tissus en croissance (Sharma and Verslues, 2010).

III.6. Métabolisme de la proline chez les plantes pendant le stress salin

III.6.1. Métabolisme de la proline

La voie de la biosynthèse de la proline a été décrite auparavant chez *Escherichia coli* (Hayat et al., 2012). Chez les plantes, l'accumulation de la proline résulte de l'augmentation de sa synthèse et de la réduction de sa dégradation (Amini et al., 2015; Delauney and Verma, 1993b; Majumder et al., 2009; Yoshida et al., 1997). Elle est synthétisée principalement à partir du glutamate qui est converti en proline via deux réductions successives catalysées par les enzymes *pyrroline-5-carboxylate synthase* (P5CS) et *pyrroline-5-carboxylate reductase* (P5CR), respectivement.

Le précurseur alternatif de la biosynthèse de la proline, ornithine, est d'abord transaminé par une enzyme mitochondriale *ornithine-delta-aminotransferase* (OAT) produisant du *glutamate-semialdehyde* (GSA) et pyrroline-5-carboxylate (P5C) qui est converti par la suite en proline (Szabados and Savoure, 2010). Il a été rapporté que la voie d'ornithine pourrait avoir un rôle chez les plantes adultes d'*Arabidopsis* en stress osmotique, alors que chez les jeunes plantes les deux voies coopèrent pour accumuler la proline. Cependant, la voie du glutamate joue un rôle central dans la synthèse de la proline lors d'un stress (Amini et al., 2015). Sa biosynthèse a lieu dans le cytosol et dans le chloroplaste dans le cas des tissus végétaux (Kumar et al., 2015; Verbruggen and Hermans, 2008a). A contrario, le catabolisme de la proline est localisé dans les mitochondries par l'action de deux enzymes la *proline déshydrogénase* (Prodh ou PDH) également connue sous le nom de *proline oxydase* (POX) et l'enzyme *pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase* (P5CDH). Dans la première étape, la proline est oxydée par la PDH en Pyrroline-5-Carboxylate (P5C) qui est par la suite convertie en glutamate par l'enzyme P5CDH. Les enzymes clé P5CS et PDH sont déterminantes pour le métabolisme de la proline : (Liang et al., 2013; Verslues and Sharma, 2010; Zhang and Becker, 2015).

a. pyrroline-5-carboxylate synthase P5CS

P5CS est l'enzyme clé impliquée dans la régulation de l'accumulation de la proline dans les plantes supérieures (Székely et al., 2008). L'enzyme P5CS (EC 2.7.2.11/1.2.1.41) responsable de la phosphorylation du glutamate est bifonctionnelle, elle contient deux domaines qui fonctionnent comme une enzyme kinase et une déshydrogénase. Le domaine kinase est responsable de la phosphorylation du glutamate (Amini et al., 2015). La surexpression du gène codant P5CS dans des plants du tabac transgénique conduit à l'augmentation de la

production de la proline et à l'amélioration de la tolérance au stress osmotique, confirmant ainsi le rôle clé de P5CS dans la biosynthèse de la proline dans les plantes (Kishor et al., 1995; Turchetto-Zolet et al., 2009). La surexpression du gène P5CS a également entraîné un taux de survie élevé, une amélioration de la tolérance et du rendement sous stress osmotique dans d'importantes cultures telles que le blé, le riz et la pomme de terre (Amini et al., 2015). Le gène de P5CS a été isolé à partir de plusieurs plantes et dans certaines espèces deux copies ont été décrites (Turchetto-Zolet et al., 2009). La majorité des plantes vasculaires comme le sorgho et le maïs semblent avoir plus de deux isoformes (fishman et al 2015). Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe deux isoformes du gène P5CS : AtP5CS1 (NP_001189715) et AtP5CS2 (NP_191120.2.) (Fichman et al., 2015). Les mutants des deux gènes P5CS *AthP5CS1* et *AthP5CS2* ont montré non seulement une réduction de la proline en réponse au stress mais aussi une augmentation des ROS dans les feuilles et un faible rapport NADP⁺/NADPH (Anwar Hossain et al., 2014; Sharma et al., 2011; Székely et al., 2008). Les deux gènes P5CS ont une différente régulation transcriptionnelle en réponse au stress osmotique et en fonction des organes. En effet contrairement au P5CS2, P5CS1 est directement impliqué dans l'accumulation de la proline pendant les conditions stressantes (Fabro et al., 2004; Székely et al., 2008; Verbruggen and Hermans, 2008a). Il est rapidement induit par le stress et exprimé dans la plupart des organes (Turchetto-Zolet et al., 2009) et son expression est contrôlée par différentes voix de signalisation (Amini et al., 2015; Maghsoudi et al., 2018). Les mutants *p5cs1* sont caractérisés par un niveau faible en proline et une sensibilité au stress osmotique, fournissant ainsi une évidence que P5CS1 est nécessaire et suffisant pour l'accumulation de la proline (Székely et al., 2008). Chez *Arabidopsis*, le gène *P5CS1* peut être induit par le stress salin et aussi par l'hormone acide abscissique (ABA) grâce à l'élément ABRE (ABA responsive element) présent dans son promoteur (Verbruggen and Hermans, 2008a). Quant au gène *P5CS2*, il est exprimé dans les cellules en division (Strizhov et al., 1997). Chez *Arabidopsis*, *P5CS2* est un gène ménager, il est activé dans les tissus méristématiques des tiges et les extrémités racinaires, les inflorescences et les cultures cellulaires (Abrahám et al., 2003; Strizhov et al., 1997; Székely et al., 2008). Les embryons de mutants *p5cs2* ont présenté des altérations dans les divisions cellulaires et ont cessé par conséquent de se développer indiquant l'implication du gène *P5CS2* et donc de la proline dans le développement de l'embryon (Kavi et al., 2015; Mattioli et al., 2009). Le gène *P5CS2* est identifié comme l'une des cibles de CONSTANS (CO) un activateur transcriptionnel qui favorise la floraison en réponse à une longue journée (Mattioli et al., 2009; Szabados and

Savoure, 2010). Il peut être activé aussi par l'acide salicylique, le signal des ROS ou une bactérie (Szabados and Savoure, 2010).

L'activité de P5CS dans le chloroplaste peut recycler le NADP⁺ le dernier accepteur de l'électron issu de la chaîne de transfert photosynthétique des électrons et réduire la production des ROS dans le photosystème I (Verbruggen and Hermans, 2008a). D'une manière générale, considérant toutes les observations sur les plantes étudiées, les scientifiques suggèrent que la régulation de l'enzyme P5CS comme facteur limitant de la biosynthèse de la proline peut être influencée par plusieurs variables tels que l'organe de la plante, l'espèce et l'intensité du stress (Amini et al., 2015).

b. pyrroline-5-carboxylate reductase P5CR

Le produit de la réaction pyrroline-5-carboxylate synthase P5C est réduit en proline par l'enzyme P5C Réductase (P5CR, EC1.5.1.2) en utilisant NAD(P)H comme donneur d'électrons (Liang et al., 2013). En plus de son rôle dans la biosynthèse de la proline, P5CR joue également un rôle dans le cycle de la proline-P5C entre les compartiments cellulaires et dans le maintien d'un niveau du NADP⁺/NAPDH approprié dans le cytosol (Liang et al., 2013). Il est communément considéré que la P5CR n'est pas un facteur limitant de la biosynthèse de la proline basée sur l'absence de sa régulation transcriptionnelle par le stress dans plusieurs plantes et sur l'expression de son gène qui n'est pas corrélée avec la teneur de la proline (Sharma and Verslues, 2010; Verbruggen and Hermans, 2008a). Il peut cependant y avoir des différences spécifiques liées aux espèces et au type du stress car une surexpression de P5CR a été rapportée pouvant affecter les niveaux de la proline dans le soja. Chez le tabac, par exemple, il a été montré que la surexpression du gène P5CR a conduit à l'augmentation de son expression de 200 fois plus, mais aucune augmentation du taux de la proline n'a été observée (Amini et al., 2015). La protéine et l'activité de P5CR ont été détectées dans le cytosol et la fraction plastidique des cellules foliaires et racinaires de soja ; et chez le pois l'activité de P5CR était localisée dans les chloroplastes suggérant que dans des conditions osmotiques élevées la P5CR s'accumule dans les plastes (Szabados and Savoure, 2010). Chez les plants d'Arabidopsis, il y a une induction transcriptionnelle de P5CR par le stress salin et la chaleur mais pas par la déshydratation (Verslues and Sharma, 2010). Or, l'augmentation du niveau des transcrits n'aboutit pas à l'augmentation du niveau de la protéine P5CR ou de son activité enzymatique (Sharma and Verslues, 2010). En plus de cette régulation post-transcriptionnelle, le niveau de la transcription de P5CR est régulé aussi par le développement avec un maximum d'expression enregistré dans les extrémités racinaires, les méristèmes, les

cellules de garde, les grains de pollen et les graines en développement. Contrairement à la protéine P5CS, la P5CR est codée par seulement un gène dans la plupart des espèces végétales et l'enzyme P5CR semble être active dans les chloroplastes et le cytosol (Liang et al., 2013; Szabados and Savoure, 2010; Verbruggen and Hermans, 2008a). La séquence P5CR est conservée dans les bactéries, les plantes, les insectes et les vertébrés (Liang et al., 2013) (figure 4).

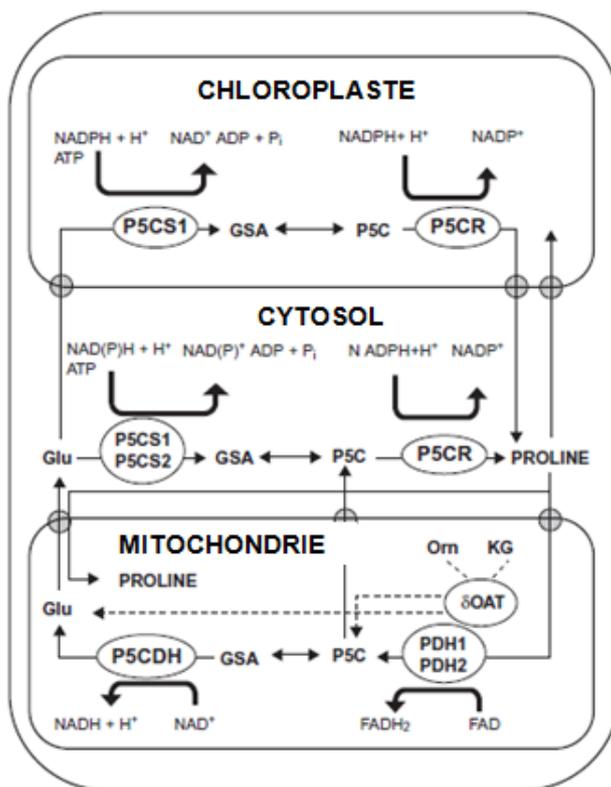


Figure 4. Les voies biosynthétiques du métabolisme de la proline dans les plantes supérieures (Anwar Hossain et al., 2014).

c. Proline déshydrogénase (ProDH)

Le catabolisme de la proline chez les plantes est spatialement séparé de la voie de sa biosynthèse chez les plantes et a lieu dans les mitochondries (Kumar et al., 2015). La première enzyme de la voie du catabolisme de la proline *PRODH*, appelée aussi proline oxidase (EC 1.5.99.8), catalyse l'oxydation de la proline en P5C dans la mitochondrie. Similaire à la biosynthèse de la proline, la première étape de la voie de la dégradation de la proline est déterminante. La *PRODH* est l'une des enzymes clés qui régule l'accumulation de la proline *in vivo* (Peng et al., 1996). Chez *Arabidopsis*, la *PRODH* a été identifiée par l'analyse de la séquence d'un clone d'ADNc du gène *ERD5* (*Early Response to Dehydration5*). L'expression du gène *PRODH* est négativement régulée par un faible

potentiel hydrique, la déshydratation et la salinité et est positivement régulée par la proline exogène et la récupération après un stress (Sharma and Verslues, 2010). La répression du gène *PRODH* durant le stress est largement acceptée comme le point contrôle qui peut favoriser l'accumulation de la proline sous le stress. Il a été rapporté que la suppression antisens de la *PRODH* dans les cultures de cellules de tabac a conduit à une altération de la croissance et de la morphologie cellulaires (Sharma and Verslues, 2010). L'enzyme *PRODH* contient une liaison non covalente flavine adenine dinucléotide (FAD) et est responsable de la catalyse de la première étape de l'oxydation de la L-proline. La plante d'*Arabidopsis* a deux isoformes de *PRODH* fonctionnelles, les deux sont localisées dans les mitochondries: *PRODH1* (*PRODH1*; At3g30775), également connue sous le nom de gène ERD5 (réponse précoce à la déshydratation) et *PRODH2* (*PRODH2*; At5g38710) (Liang et al., 2013). *PRODH1* est largement exprimée dans les plantes et est considérée comme l'isoforme prédominante. L'expression de la *PRODH2* est significativement inférieure à *PRODH1*, elle est principalement exprimée dans le système vasculaire (Liang et al., 2013; Sharma and Verslues, 2010). Les gènes *PRODH1* et *PRODH2* sont positivement régulés par la proline exogène mais étonnamment ils réagissent différemment à la sécheresse et au stress salin (Liang et al., 2013). Chez *Arabidopsis*, il a été démontré que le stress salin induisait spécialement l'expression *PRODH2*, tandis que l'expression de la *PRODH1* est significativement réduite (Funck et al., 2010; Liang et al., 2013). Le gène *PRODH1* est activé après réhydratation accompagnée d'une diminution de la proline intracellulaire (Kiyosue et al., 1996). Une régulation différentielle des deux isoformes de *PRODH* a également été rapportée chez le tabac. Ainsi, il semble que *PRODH1* et *PRODH2* ont des rôles physiologiques distincts (Liang et al., 2013). Bien que la *PRODH1* ait fait l'objet de nombreuses études, en particulier sous stress abiotique, *PRODH2* n'a commencé à être analysée que ces dernières années. La *PRODH* a été principalement étudiée au niveau de l'expression génique, cependant peu d'informations fonctionnelles et biochimiques sont disponibles.

d. Pyrroline 5 Carboxylate Dehydrogenase (P5CDH)

Comme décrit ci-dessus, *P5CDH* (*P5CDH*; At5g62530), catalyse la seconde étape de l'oxydation de la proline (Deuschle et al., 2004; Liang et al., 2013; Miller et al., 2009). Une fois la pyrroline-5-carboxylate (P5C) est spontanément convertie en glutamate-semialdéhyde (GSA), ce dernier est oxydé en L-glutamate par l'enzyme *P5CDH* en utilisant le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) comme récepteur d'électrons (Liang et al., 2013). Un seul gène *P5CDH* a été identifié chez *Arabidopsis* et chez le tabac (Deuschle et al., 2001; Hayat et al.,

2012). Chez les eucaryotes, les *PRODH* et *P5CDH* sont localisées dans la matrice mitochondriale avec *PRODH* associé à la membrane interne de la mitochondrie (Liang et al., 2013). D'un point de vue transcriptionnel, *P5CDH* est régulé à la fois par des signaux environnementaux et des facteurs de développement. Il est exprimé à un niveau basal dans tous les tissus sauf chez les fleurs où il a une expression plus élevée (Deuschle et al., 2001). La régulation de *P5CDH* par le stress est très variée. Il est fortement régulé par un faible potentiel hydrique et négativement régulé par le stress salin. Cette répression par le sel résulterait de petits ARN interférents (siRNA small interfering RNA) qui sont générés par le chevauchement des transcrits de *P5CDH* et *SRO5* (une protéine mitochondriale potentiellement importante dans la régulation des ROS) (Sharma and Verslues, 2010). Ces siARN sont avérés réguler négativement la *P5CDH* par le clivage de l'ARNm de *P5CDH* après un traitement avec du sel conduisant ainsi à une accumulation de l'osmoprotectant proline et à une augmentation de la tolérance au stress salin (Borsani et al., 2005). La production des siRNA ciblant le *P5CDH* est spécifique au stress salin et n'a pas été observée sous stress osmotique (Sharma and Verslues, 2010). Les données sur le rôle physiologique de l'enzyme *P5CDH* proviennent principalement de l'étude de ses mutants chez *Arabidopsis*.

Lors du stress salin, le niveau de proline est légèrement plus élevé chez le mutant que chez le sauvage voire inchangé (Borsani et al., 2005; Deuschle et al., 2004). Par contre, après le stress les mutants de *P5CDH* ont maintenu une teneur en proline plus élevée, ce qui signifie que la présence de *p5cdh* est nécessaire pour le catabolisme de la proline (Sharma and Verslues, 2010). L'expression de la *P5CDH* est également régulée par l'application de la proline exogène (Sharma and Verslues, 2010), bien que son induction chez *Arabidopsis* soit beaucoup plus lente que celle de *Prodh* (Liang et al., 2013). Il a été rapporté que la surexpression de la *P5CDH* diminuait la sensibilité à la proline exogène alors que le mutant *p5cdh* était hypersensible à la proline (Deuschle et al., 2004; Verbruggen and Hermans, 2008a). Une petite séquence similaire au motif PRE (proline-response-element) a été identifiée au niveau du promoteur de gène *P5CDH* chez *Arabidopsis* et les céréales (Szabados and Savoure, 2010). De plus, il a été démontré que l'application de la proline exogène chez les mutants *p5cdh* (*Arabidopsis*) a entraîné une augmentation des ROS dans la mitochondrie, *P5CDH* a été donc proposé comme régulateur important de la production des espèces réactives d'oxygènes dans les plantes en contrôlant le cycle proline-P5C afin d'éviter la surproduction des ROS mitochondriaux (Miller et al., 2009).

III.6.2. Régulation du métabolisme de la proline durant le stress

L'accumulation de la proline est l'une des stratégies adaptatives fréquemment observée chez un grand nombre d'espèces en réponse au stress salin. Une corrélation positive entre cette accumulation et la tolérance à la contrainte saline a été rapportée dans de nombreuses espèces végétales (Hare et al., 1998; Kumar et al., 2015; Szabados and Savoure, 2010) : le tabac (Kishor et al., 1995), pomme de terre (Hmida-Sayari et al., 2005), le sorgho (Reddy et al., 2015), *Pancreaticum* sp. (Khedr et al., 2003)...etc. Bien que la régulation du métabolisme de la proline soit encore mal caractérisée, il est clair que la teneur de la proline dans les tissus dépend de la régulation de sa biosynthèse et de son catabolisme (Sharma and Verslues, 2010; Szabados and Savoure, 2010; Verslues et al., 2007). En effet, la forte accumulation de la proline chez les plantes (jusqu'à 80% de part des acides aminés sous stress et 5% dans les conditions normales) résulte à la fois de l'augmentation de la synthèse et la diminution de sa dégradation dans les conditions de stress hydrique et stress salin (Amini et al., 2015; Carillo et al., 2011; Shanker, 2011; Szabados and Savoure, 2010). Chez le blé dur, la proline peut contribuer à plus de 39% de l'ajustement osmotique dans les compartiments cytoplasmiques des vieilles feuilles tandis que la contribution de la glycine bêtaïne peut représenter 16% (Carillo et al., 2008). L'augmentation du niveau de la proline induite par le stress est due en partie à l'augmentation de la transcription de gène P5CS, et plus particulièrement à la réduction de la transcription de ProDH (Servet et al., 2012). Ces enzymes sont considérées comme limitantes et jouent un rôle significatif dans la régulation du niveau de la proline dans les plantes (Amini et al., 2015).

Il a été démontré que l'accumulation de la proline chez *Arabidopsis* suit fidèlement l'induction transcriptionnelle du gène P5CS en réponse à des stimuli de stress environnementaux tel que le stress salin (Strizhov et al., 1997). Parce que l'expression du gène P5CR n'est pas significativement affectée par le stress, l'accumulation de la proline induite par le stress semble être régulée par l'expression du gène P5CS chez *Arabidopsis* (Strizhov et al., 1997). La régulation positive des gènes P5CS a été décrite chez d'autres espèces y compris le riz (Hur et al., 2004) et semble être l'un des mécanismes dominants de la régulation qui contrôlent l'accumulation de la proline dans la plupart des espèces (Fichman et al., 2015). Les données acquises sur le comportement de certains mutants plaident en faveur de cette hypothèse ; Kavi (1995) et ses collaborateurs par exemple ont montré que les plantes transgéniques de tabac surexprimant le gène P5CS de l'haricot (*Vigna aconitifolia*) accumulent 10 fois plus de proline que les plantes témoins. Chez la pomme de terre, la surexpression du gène P5CS d'*Arabidopsis* a stimulé la synthèse de la proline en condition de

stress salin et a amélioré sa tolérance à la salinité (Hmida-Sayari et al., 2005). Chez *Triticum aestivum*, P5CS a été introduit dans le génome par *Agrobacterium tumefaciens*, ces plantes transgéniques de blé soumises au stress salin ont montré une teneur élevée en proline avec une amélioration de leur tolérance au stress (Sawahel and Hassan, 2002). La synthèse de la proline est étroitement régulée par des signaux environnementaux et endogènes tels que les phytohormones. Il a été rapporté que le niveau de l'acide abscisique (ABA) augmente rapidement dans les plantes dans les conditions de stress salin (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997) et peut influencer l'accumulation de la proline par la régulation de l'expression du gène P5CS (Verslues and Bray, 2006). Strizhov et al. (1997) ont démontré que ABA est une molécule signalé absolument essentielle pour l'activation des gènes AtP5CS1 et AtP5CS2 induits par le stress. L'induction de la transcription de P5CS par cette molécule a été décrite chez *A. thaliana* et le riz aussi. Chez *Arabidopsis*, la stimulation de la synthèse de la proline par le stress salin et l'ABA est en corrélation avec l'activation de l'expression du gène P5CS1 (Abrahám et al., 2003). L'activation de l'expression du AtP5CS1 sous diverses conditions peut être contrôlée par des signaux dépendants de l'ABA et indépendants de l'ABA (Amini et al., 2015; Fichman et al., 2015; Tuteja, 2007). L'accumulation des transcrits d'AtP5CS1 s'est avérée induite par la signalisation de l'ABA par le biais de l'élément ABRE (*ABA responsive element*) qui est une séquence au niveau des promoteurs de certains gènes (Abrahám et al., 2003; Saviouré et al., 1997; Strizhov et al., 1997). Ces séquences ou éléments de régulation jouent un rôle majeur dans l'induction des gènes en réponse à l'ABA et sont impliqués dans les réponses en conditions environnementales entre autres la salinité (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). Le rôle de l'ABA dans l'accumulation de la proline a été disséqué par Verslues et Bray (2006). Ces auteurs ont utilisé des mutants de biosynthèse et de la signalisation d'ABA pour démontrer la dépendance de l'accumulation de la proline à la quantité d'ABA et la sensibilité de la plante à l'ABA. D'autres résultats de Verslues et al. (2007) vont dans le sens de l'idée que H₂O₂ fait partie de la signalisation de l'ABA et des réponses régulées par l'ABA telles que l'accumulation de la proline. Le rôle du calcium dans l'induction dépendante de l'ABA du gène P5CS pendant le stress de la salinité a été aussi rapporté par Knight et al. (1997). L'interaction de l'ABA avec la voie de signalisation Ca²⁺ peut également moduler l'accumulation de la proline dans les plantes en conditions stressantes (Per et al., 2017). Chez le riz, l'application de l'ABA exogène a positivement régulé l'expression du gène sensible au stress salin OsCam1-1 et a augmenté l'accumulation de la proline par la cascade de la transduction du signal de calmoduline

(calcioprotéine) sous le stress salin (Sripinyowanich et al., 2013). De même, la surexpression du gène OsCam1-1 a joué un rôle important dans la biosynthèse de l'ABA via la régulation de deux gènes impliqués dans sa biosynthèse. En outre, ces lignées transgéniques ont manifesté une tolérance à la salinité ce qui indique la connexion mutuelle des voies de signalisation de l'ABA et du calcium des plantes soumises au stress salin pour accumuler la proline comme outil de tolérance au stress (Per et al., 2017). Le signal calcique semble activer le facteur de transcription MYBs qui est impliqué dans l'activation de la transcription de P5CS (Amini et al., 2015). L'auxine régule positivement les deux copies de P5CS maintenant ainsi la teneur des extrémités racinaires en proline (Kishor and Sreenivasulu, 2014). Le métabolisme de la proline peut aussi être régulé par plusieurs autres molécules signal endogènes tels que l'oxyde nitrique et des nutriments minéraux comme l'azote et le phosphore (Per et al., 2017). Par ailleurs, la phospholipase D agit comme un régulateur négatif de la biosynthèse de la proline (Amini et al., 2015). En plus de P5CS, l'enzyme OAT a également été signalé pour jouer un rôle dans l'augmentation de la biosynthèse de la proline et participe à la tolérance au stress salin (Khanna-Chopra et al., 2019; Per et al., 2017).

L'accumulation de la proline pendant le stress ne dépend pas que de l'activation de la transcription de P5CS (Fichman et al., 2015). Elle est également contrôlée par l'enzyme proline déshydrogénase ProDH dont l'activité est régulée par le stress salin (Sharma and Verslues, 2010). Alors que P5CS1 est régulée positivement par le stress, la proline déshydrogénase (ProDH) est régulée négativement par le stress salin chez plusieurs espèces végétales et son expression est activée lorsque le stress est levé (Kishor and Sreenivasulu, 2014). Si c'est le niveau élevé de la proline qui conduit à l'induction de la ProDH après le stress, cela impliquerait qu'il existe un mécanisme pour la bloquer pendant le stress lorsque la proline s'accumule et que l'expression de la ProDH reste faible (Sharma and Verslues, 2010). En effet, l'augmentation de l'expression de ProDH après le stress est le résultat de l'accumulation de la proline et de l'hypoosmolarité (Per et al., 2017). Ce phénomène a été expliqué par Satoh et al. (2004, 2002) par la présence d'un élément ACTCAT dans le promoteur du gène ProDH nécessaire à son expression efficace en réponse à la proline et à l'hypoosmolarité. Il a été nommé comme *Pro-* ou *Hypoosmolarity responsive element* (PRE). Plus tard, plusieurs facteurs de transcription de type bZIP (*basic leucine zipper protein*) ont été identifiés en tant que candidats pour la liaison à cet élément (Per et al., 2017). Ceux-ci contiennent un domaine de fixation à l'ADN mixte constitué d'une séquence en acides aminés basiques et d'un motif riche en leucine à intervalles réguliers. Ils sont associés à la transduction du signal via la voie indépendante de l'ABA (Kishor and Sreenivasulu, 2014).

Contrairement à la régulation de P5CS, ABA ne semble pas jouer un grand rôle dans la régulation de ProDH (Kishor and Sreenivasulu, 2014).

L'accumulation de la proline sous le stress osmotique peut être également augmentée avec l'augmentation des sucres. Ainsi, la participation des sucres et de plusieurs hormones servent à réguler la synthèse et la dégradation de la proline et à contrôler ainsi l'homéostasie de la proline (Kishor and Sreenivasulu, 2014). En général, le contrôle du métabolisme de la proline dans les végétaux est plus complexe et est multigénique (Fichman et al., 2015). Les analyses génétiques de la régulation des voies de la biosynthèse de la proline au niveau des plantes est face au problème que toutes les étapes métaboliques impliquent plusieurs isoenzymes codées par de petites familles de gènes régulés de manière différentielle.

III.6.3. Transport de la proline

Dans la plante, le transport des acides aminés est régulé par des facteurs endogènes et aussi par des signaux environnementaux (Verslues and Sharma, 2010). Le transport de la proline peut être induit par le stress salin suggérant qu'il joue un rôle dans l'ajustement osmotique (Per et al., 2017). Son transport entre les différents compartiments de son métabolisme et les connexions avec d'autres voies métaboliques sont importants pour comprendre le métabolisme de la proline en un sens fondamental et sa contribution utile dans l'amélioration de la tolérance des plantes au stress (Sharma and Verslues, 2010).

Comme le métabolisme de la proline est confiné à des compartiments cellulaires distincts, son transport intracellulaire est nécessaire. Les transports inter- et intra-cellulaires de la proline sont essentiels pour maintenir l'homéostasie cellulaire, mais son mouvement intracellulaire joue un rôle important dans l'augmentation de la résistance au stress (Funck et al., 2010; Lehmann et al., 2010; Sharma and Verslues, 2010). Des informations sur le transport de la proline dans les plastes font défaut, par ailleurs l'absorption de la proline dans les mitochondries a été démontré être assurée par deux systèmes de transport identifiés chez les mitochondries du blé dur (*Triticum durum*): un uniport de la proline qui facilite le transport de la proline dans la matrice mitochondriale et un antiport proline/glutamate qui semble jouer un rôle important dans le cycle de proline glutamate entre la matrice mitochondriale et le cytosol (Sharma and Verslues, 2010; Szabados and Savoure, 2010). Il a été montré que les transporteurs basiques d'acides aminés (BAC1 ; BAC2) sont chargés de véhiculer l'arginine et l'ornithine à travers la membrane mitochondriale (Sharma and Verslues, 2010; Szabados and Savoure, 2010). Plusieurs données soutiennent le transport intercellulaire de la proline notamment suite aux niveaux élevés de la proline enregistrés dans le phloème des plantes

soumises au stress hydrique (Verslues and Sharma, 2010). Le transport de la proline sur une longue distance peut jouer un rôle important pour les tissus photosynthétiques en tant que moyen de stabiliser le statut d'oxydoréduction cellulaire, et pour les tissus non photosynthétiques en contribuant soit dans l'adaptation osmotique ou dans le renforcement de la croissance après sa dégradation (Verslues and Sharma, 2010). Au moins trois transporteurs intercellulaires spécifiques à la proline ont été identifiés chez *Arabidopsis* ProT1, ProT2 et AAPs. Ces transporteurs appartiennent à la famille des acides aminés permease (AAP) et sont exprimés durant les conditions stressantes. Ueda et al. (2001) ont constaté que l'ARNm HvProT était fortement exprimé dans les cellules de l'extrémité racinaire de l'orge soumis au stress salin. La surexpression de ce transporteur spécifique a entraîné une augmentation de la proline dans l'apex racinaire et une augmentation de la croissance. Les trois transporteurs ProTs ont des profils d'expression différents et spécifiques au tissu (Sharma and Verslues, 2010). ProT1 s'exprime de manière omniprésente et sous stress salin, des taux élevés de ProT1 ont été trouvés dans tous les organes d'*Arabidopsis* mais les jeunes fleurs ont montré une expression plus élevée. Sous stress salin, une forte expression de ProT2 a été enregistrée alors que les transcrits d'AAP6 ont été détectés principalement dans les racines et les feuilles (Hayat et al., 2012). Sharma et Verslues (2010) rapportent que le transporteur ProT2 est plus élevé dans les racines et ProT1 dans les tiges et les fleurs. A l'heure actuelle ProT s'est avéré localisé au niveau de la membrane plasmique et impliqué dans le transport intercellulaire et dans le transport de longue distance de la proline dans la plante. Cependant le mécanisme moléculaire du transport de la proline par l'intermédiaire de ProT est toujours mal compris (Lehmann et al., 2011). D'autres transporteurs sont connus comme étant impliqués dans l'absorption de la proline dans les racines telles que LHT1 ou AAP5. Le transport de la proline doit être étudié avec plus de détails pour mieux comprendre son rôle dans la tolérance des plantes au stress.

III.6.4. Approche transgénique du métabolisme de la proline et la tolérance au sel

En raison de la multitude de rôles que la proline joue dans les conditions de stress, plusieurs essais ont été menés pour manipuler ses voies métaboliques afin d'augmenter sa production dans les plantes et donc améliorer leur tolérance au sel (Kumar et al., 2015). Les niveaux de la proline dans les plantes peuvent être augmentés par la surexpression des formes de P5CS et par l'extinction du gène ProDH (Fichman et al., 2015). La plupart des modifications sont associées aux gènes de sa biosynthèse et de sa dégradation *P5CS1*, *P5CS2*, *P5CR* et *ProDH*. Les premiers essais ont été réalisés par Kavi et son équipe (1995) pour la surexpression du

gène P5CS et la génération des plants transgéniques surproduisant la proline. Les chercheurs ont surexprimé le gène P5CS de l'haricot *Vigna aconitifolia* dans les plantes de tabac *Nicotiana tabacum*, et les plantes transgéniques obtenues ont synthétisé 10 à 18 fois plus de proline que le témoin et sont plus tolérantes au sel. Les niveaux élevés de la proline obtenus par l'over-expression du gène P5CS de *V. aconitifolia* dans le riz transgénique lui a aussi conféré la tolérance au sel (Zhu et al., 1998). Hmida-Sayari et al., (2005) ont également montré que la pomme de terre transgénique *Solanum tuberosum* possédant le gène P5CS d'*Arabidopsis* a manifesté une meilleure tolérance au stress induit par 100 mM de NaCl. De même, l'insertion du gène P5CS dans le blé *Triticum aestivum*, a conduit à l'augmentation de la production de la proline et de sa tolérance au stress salin à une concentration de NaCl élevée au delà de 200mM (Sawahel and Hassan, 2002). Il a été rapporté que la forte accumulation de la proline dans le blé transgénique réduisait la peroxydation des lipides de la membrane et contrôlait les dommages engendrés par les ROS en conditions du stress notamment le stress hydrique (Vendruscolo et al., 2007). Une forte accumulation de la proline, un niveau élevé de la photosynthèse, un ajustement osmotique et une tolérance au stress hydrique ont été aussi notés suite à l'introduction du gène P5CS de *V. aconitifolia* dans l'oranger *Citrus sinensis* (Molinari et al., 2004). L'étude de Kumar et son équipe (2010) a révélé une augmentation de la teneur du riz asiatique transgénique *Indica rice* (portant l'ADN complémentaire du gène P5CS de l'haricot (P5CSF129A) en proline et en chlorophylle accompagné d'une diminution de la peroxydation lipidique. En plus de P5CS, la manipulation génétique de l'enzyme P5CR a été aussi entreprise. Liu et al. (2014) ont observé une amélioration de la tolérance de la patate douce *Ipomoea batatas* au stress salin suite à la surexpression du gène P5CR. De même, l'enzyme OAT a été aussi rapporté pour son rôle dans l'augmentation de la biosynthèse de la proline et prend part à la tolérance au stress salin. Il a été trouvé que la surexpression du gène OAT peut augmenter la biosynthèse de la proline des plantes, la biomasse et le taux de germination sous les conditions de stress osmotique (Roosens et al., 2002). La manipulation d'autres enzymes majeurs des voies métaboliques de la proline a été également menée par certains chercheurs qui ont ciblé l'enzyme principale de sa dégradation *proline deshydrogénase* ProDH. Yang et al. (2010) ont d'une part enregistré de faibles niveaux de la proline dans les plantes de Broccoli ayant été transformées avec l'antisense de ProDH. D'autre part, la suppression d'antisens dans le tabac a montré un niveau élevé de la proline avec une tolérance aux différents stress entre autres le stress salin (Ibragimova et al., 2012). Chez *Arabidopsis thaliana*, la suppression de la dégradation de la proline en générant des plantes antisens avec le cDNA d'AtProDH a amélioré leur tolérance à

la salinité (Nanjo et al., 1999). Razavizadeh and Ehsanpour (2009) ont rapporté que la plante de tabac (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin) transformé avec le gène P5CS a montré une augmentation des activités APX et CAT conduisant à une tolérance à la salinité. Les plantes transgéniques développées par l'expression hétérologue de gènes de proline pour conférer une tolérance au sel sont listées dans le tableau suivant :

Tableau 2. Plantes transgéniques transformées avec les gènes de biosynthèse de la proline leur conférant une tolérance au stress salin (Per et al., 2017).

Gène	Source	Hôte	Référence
P5CS	<i>Vigna aconitifolia</i>	<i>Triticum aestivum</i>	(Sawahel and Hassan, 2002)
P5CS	<i>Vigna aconitifolia</i>	<i>Daucus carota</i>	(Han and Hwang, 2003)
P5CS	Not known	<i>Olea europaea</i>	(Behelgardy et al., 2012)
P5CS	<i>Arabidopsis</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	(Rastgar et al., 2011)
P5CS1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Arabidopsis</i>	(Ji-Bao et al., 2010)
P5CR	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Arabidopsis</i>	(Ma et al., 2008)
ProDH	Not known	<i>N. tabacum</i>	(Kolodyazhnaya et al., 2006)
Anti-ProDH	Antisense suppression	<i>Arabidopsis</i>	(Nanjo et al., 1999)
OsP5CS2	<i>Vigna aconitifolia</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Hur et al., 2004)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Alagarsamy et al., 2011)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>O. sativa</i>	(Kumar et al., 2010)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>Larix leptoeuropaea</i>	(Gleeson et al., 2005)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>Medicago truncatula</i>	(Verdoy et al., 2006)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>N. tabacum</i>	(Kishor et al., 1995)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>Oryza sativa</i>	(Su and Wu, 2004)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>O. sativa</i>	(Anoop and Gupta, 2003)
P5CS	<i>V. aconitifolia</i>	<i>O. sativa</i>	(Zhu et al., 1998)
P5CS	<i>Arabidopsis</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	(Hmida-Sayari et al., 2005)
P5CSF129A	<i>aconitifolia Cajanus</i>	<i>V. cajan</i>	(Surekha et al., 2014)
P5CSF129A	<i>V. aconitifolia</i>	<i>N. tabacum</i>	(Hong et al., 2000)
d-OAT	<i>Arabidopsis</i>	<i>N. plumbaginifolia</i>	(Roosens et al., 2002)
d-OAT	<i>Arabidopsis</i>	<i>O. sativa</i>	(Wu et al., 2003)
P5CSF129A	<i>Vigna aconitifolia</i>	<i>Sorghum bicolor</i>	(Surender Reddy et al., 2015)

Cependant, les niveaux élevés de la proline ne sont pas toujours corrélés avec l'osmotolérance. En effet dans quelques rapports, contrairement à ceux cités précédemment, la corrélation entre l'augmentation du niveau de la proline dans les plantes transgéniques d'*Arabidopsis* et leur tolérance au stress n'apparaît pas (Liu and Zhu, 1997; Mani et al., 2002; Nanjo et al., 1999). De plus, les mutants présentant une accumulation plus élevée de proline peuvent être hypersensibles au sel (Liu and Zhu, 1997). La surexpression du gène P5CR de soja dans le tabac transgénique n'a pas augmenté l'osmotolérance, aussi, il a été suggéré que les effets de la manipulation génétique de la synthèse de la proline peuvent être spécifiques à une espèce végétale (Szoke et al., 1992). Par ailleurs, une tolérance plus élevée au stress salin a parfois été observée dans certaines lignées antisens ProDH d'*Arabidopsis* mais pas toujours (Mani et al., 2002; Nanjo et al., 1999). Chez le tabac, le silence des gènes (genes silencing) de ProDH par interférence d'ARN (RANi) a entraîné une germination retardée des graines (Ribarits et al., 2007). Les niveaux de la proline et de l'expression génique altérés rapportés dans un certain nombre de mutants et de lignées transgéniques révèlent que la synthèse de ce métabolite est soumise à un contrôle multi-génique (Fichman et al., 2015). La complexité dans la régulation du métabolisme de la 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 (Szabados and Savoure, 2010). 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.

III.5. Approche de l'apport exogène de la proline et son effet sur la contrainte saline

Nombreux sont les résultats des études scientifiques qui ont indiqué que l'apport exogène de composés osmolytes offre une protection significative contre les dommages induits par le sel chez les plantes. Ces protectants ont augmenté la tolérance au stress salin en améliorant leur germination, croissance, développement, photosynthèse leurs capacités antioxydantes et leur rendement (Hasanuzzaman et al., 2013; Hosseinifard et al., 2022). A cet égard, l'approche de l'application exogène de la proline a gagné beaucoup d'attention suite aux exemples qui ont montré sa contribution dans l'amélioration de la tolérance des plantes à la salinité en modulant une multitude de processus physiologiques et biochimiques qui sont directement ou indirectement liés aux réponses adaptatives au stress salin et l'expression des gènes impliqués dans la réponse au sel (Ashraf and Foolad, 2007; Banu et al., 2009; Hamdia and Shaddad,

2010; Hasanuzzaman et al., 2013; Hoque et al., 2008; Hossain et al., 2011a; Nounjan et al., 2012; Shahbaz et al., 2014). Il a été rapporté que la proline protège les plantes pas uniquement par le biais de l'ajustement osmotique mais également via d'autres fonctions de régulation (figure 5).

Lone et al. (1987) ont testé l'effet de la proline sur les cultures d'embryons d'orge soumis aux conditions salines, il a été noté que leurs teneurs en ions de sodium Na^+ et de Cl^- ont diminué et que l'élongation des tiges et la croissance ont augmenté. L'effet de la proline sur la plante du désert *Panocratium maritimum* en conditions salines a été étudié par Khedr et al. (2003). L'imposition d'une forte salinité sur cette plante a entraîné une inhibition de l'activité des enzymes antioxydantes. Cependant, la présence de la proline exogène a permis la stabilisation de ces enzymes et a induit une forte expression des protéines de réponse au stress (ubiquitine, dehydrines). Il a été suggéré que la régulation positive du système antioxydant par la proline protège les plantes contre les dommages oxydatifs induits par le sel et que la proline pourrait constituer un des éléments d'adaptation au stress salin. 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. Cuin et Shabala (2005) ont rapporté que le rôle de la proline n'est pas limité à l'ajustement osmotique mais qu'elle a d'autres fonctions comme la régulation de l'homéostasie K^+ dans le cytosol en empêchant la fuite de potassium des cellules sous l'effet du NaCl , une caractéristique qui peut conférer la tolérance à plusieurs espèces. Ils ont constaté que la proline exogène a significativement réduit l'efflux du K^+ par les racines de l'orge et a maintenu l'homéostasie cytosolique du K^+ probablement par l'augmentation de l'activité d' H^+ ATPase. Ces résultats ont montré le rôle possible du soluté proline dans la régulation des flux des ions via la membrane plasmique et dans la modulation de la tolérance au sel. L'étude de Reza et al. (2006) sur deux variétés d'orge (*Hordeum vulgare* L. var. Sahand and var. Makoui) a montré que la présence de 5 mM de proline dans le milieu de culture entraîne une hausse de 15% à 20% de la biomasse fraîche aérienne des deux variétés soumises à 200mM de chlorure de sodium. Plus tard, une équipe japonaise (Hoque et al., 2008, 2007a, 2007b) ont trouvé que l'addition de la proline dans le milieu de culture des cellules de Tabac (*Nicotiana tabacum*) a amélioré leur croissance, a réduit l'oxydation des protéines et a contrecarré l'effet négatif du sel sur les enzymes antioxydantes (SOD, CAT, APX, MDHAR, DHAR, GR, GPX, GsT et glyoxalase I) en augmentant leurs activités. Il a été conclu que la proline agit en réduisant les dommages oxydatifs provoqués par le stress salin en activant le système

antioxydant et le système glyoxalase. Dans une autre étude, (Sobahan et al., 2009) ont montré que l'ajout de la proline aux plantules de riz dans les conditions de la salinité a inhibé l'absorption du sodium et a augmenté l'accumulation du potassium et donc un rapport K^+/Na^+ élevé, suggérant que la voie apoplastique de l'absorption du Na^+ a été supprimée.

Les mécanismes biochimiques de la tolérance au stress salin induit par la proline ont été étudiés par Ahmed et al. (2010), ils ont observé que l'ajout de la proline (25mM et 50mM) semble améliorer la tolérance de l'olivier en régulant l'activité de quelques enzymes antioxydantes, l'activité photosynthétique et en maintenant un statut hydrique et une meilleure croissance. En 2011, Yan et ses collaborateurs se sont intéressés à l'effet de 0.2 mM de proline sur la biomasse, la teneur en chlorophylle, les paramètres photosynthétiques, le système oxydatif et antioxydant de deux variétés de melon. Il a été noté que la proline a augmenté la biomasse fraîche et sèche en conditions salines. La quantité de chlorophylle, le taux de la photosynthèse nette, l'efficacité du photosystème II, l'activité enzymatique des antioxydants (SOD, POD, CAT, APX, DHAR, GR) a été également améliorée accompagnée d'une diminution des niveaux du sous produit de peroxydation lipidique malondialdéhyde (MDA) et celle du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) traduisant ainsi l'augmentation de la tolérance à la salinité des deux variétés étudiées. Deivanai et al. (2011) ont démontré que les graines de riz préalablement traitées avec de la proline (1, 5 et 10mM) et soumises à différentes concentrations de NaCl allant de 100 à 400 mM ont atténué l'effet du sel et le meilleur résultat a été enregistré avec 1mM de proline qui a stimulé les activités cellulaires. Avec une concentration de 15 et 30mM, la proline avait aussi contrecarré l'effet négatif du sel (100mM NaCl) sur la germination des graines de riz après le 3^{ème} et le 7^{ème} jour de traitement des semences, en influençant le métabolisme des glucides alpha- et beta-amylase (Hua-long et al., 2014). Nounjan et al., (2012) ont également montré que l'ajout de 10mM de proline en conditions de stress salin induit par 100mM pendant 6 jours a influencé la croissance et le métabolisme d'une variété du riz *Oryza sativa* sensible au sel par l'augmentation de la matière fraîche et sèche des plantes, l'augmentation de leur teneur en proline endogène et des niveaux de transcrits P5CS et P5CR. A cela s'ajoute la forte régulation de la transcription des gènes codant plusieurs enzymes antioxydantes et la réduction du rapport Na^+/K^+ . La pulvérisation foliaire de ce soluté sur la tomate, le colza le maïs et le blé a également contrecarré l'inhibition de la croissance induite par NaCl (Athar et al., 2009). L'effet positif de la proline sur les plantes en conditions de stress salin et stress hydrique ne sont pas limités aux paramètres physiologiques mais elle peut aussi améliorer le rendement et la qualité de grain (Ali et al., 2013). L'application de la proline a été aussi testé au stade floraison sur la tomate en situation

de salinité et il a été enregistré que 10 mM de proline a amélioré la surface foliaire et le rendement en fruits chez les deux variétés étudiées (Kahlaoui et al., 2013).

Donc, la proline allège les effets dépressifs du sel par son action en tant qu'osmolyte et aussi par sa capacité à contribuer directement ou indirectement dans le système antioxydatif contre les ROS. Le tableau suivant résume les études menées sur le rôle de la proline exogène dans la protection des plantes dans les conditions salines :

Tableau 3. Études représentatives portant sur le rôle de la proline exogène dans la régulation des principaux processus métaboliques et leurs conséquences sur les plantes soumises au stress salin.

Durée du stress	plante	Proline appliquée	Processus/ métabolisme influencé	Conséquences	Référence
100 mM de NaCl, 3 et 5 jours	<i>Cucumis melo</i>	0.2 mM	Métabolisme antioxydant	Augmentation de la croissance de la plante, de la teneur des chlorophylles, taux de la photosynthèse	Yan et al., (2013)
100 mM NaCl, 8 jours	<i>C.sativus</i>	10 mM	Métabolisme antioxydant (SOD, POD, CAT et APX activités).	Atténuation de l'inhibition de la croissance végétale	(Huang et al., 2009)
0,23 ; 3,13 et 6,25 ds/m, 45 jours	<i>Helianthus annuus</i>	2.5, 5.0 et 7.5 mM	Pigments photosynthétiques et croissance	Amélioration de la croissance	(Sadak and Mostafa, 2015)
200mM NaCl, 11 jours	<i>Nicotiana tabacum</i>	20mM	Système antioxydant (CAT, POX)	Protection contre la mort cellulaire induite par le NaCl.	(Banu et al., 2009)
100 et 200mM NaCl	<i>Olea europaea</i>	25mM	Homéostasie ionique (Na ⁺ , K ⁺ et Ca ²⁺).	Amélioration de la croissance.	(Ahmed et al., 2011)
150 et 300 mM NaCl/48h	<i>Oryza sativa</i>	5mM	Métabolisme antioxydant (AsA, GSH et GSH/GSSG, APX, MDHAR, DHAR, GR, GPX, CAT	Augmentation de la tolérance au stress oxydant par l'augmentation du système antioxydant.	(Hasanuzzaman et al., 2013)
100mM NaCl, 3 ^{ème} jour et 7 ^{ème} jour après trempage des graines	<i>O. sativa</i>	15 et 30 mM	Métabolisme des glucides alpha-amylase, beta-amylase	Atténuation de l'effet inhibiteur sur la germination	(Hua-long et al., 2014)

150 mM NaCl, 30 jours	<i>O.sativa</i>	5 mM	Poids, et longueur des racines	Augmentation de la croissance	(Teh et al., 2014)
200mM NaCl, 6 jours	<i>O.sativa</i>	10mM	Métabolisme antioxydant (SOD, CAT, APX, POX)	Atténuation de l'inhibition de la croissance	(Nounjan and Theerakulpisut, 2012)
100 mM NaCl 6 jours	<i>O.sativa</i>	10mM	Proline (gènes P5CS et P5CR) et métabolisme antioxydant	Pourcentage de croissance plus élevé	(Nounjan et al., 2012)
100 mM NaCl, 7 jours	<i>O.sativa</i>	1 mM	Homéostasie ionique (ratio K ⁺ /Na ⁺)	Induction de la tolérance au sel	(Sobahan et al., 2012)
100 mM NaCl 7jours	<i>O.sativa</i>	1 mM	Equilibre osmotique	Atténuation de l'effet négatif sur la croissance et la photosynthèse	(Deivanai et al., 2011)
100, 200, 300 et 400 mM NaCl	<i>O.sativa</i>	1 mM	Equilibre osmotique	Amélioration de la croissance	(Deivanai et al., 2011)
75, 150, 225 ou 300 mM NaCl, 10 jours	<i>Pancreatium maritimum</i>	5 mM	Osmorégulation (ubiquitine, déhydrines)	Amélioration de la tolérance au sel par l'augmentation des protéines de stress	(Khedr et al., 2003)
6.57 dS/m, 4 mois	<i>Solanum lycopersicum</i>	10 et 20 mg/L	Photosynthèse (paramètres de fluorescence de la chlorophylle)	Augmentation de la croissance et de la chlorophylle	(Kahlaoui et al., 2013)
150 mM NaCl, 15 jours	<i>S. melongena</i>	10 et 20 mM	Efficacité d'utilisation de l'eau	Atténuation de l'effet négatif sur la croissance	(Shahbaz et al., 2014)
100 mM NaCl, 1 mois	<i>Saccharum officinatum</i>	20mM	Métabolisme Antioxydant (SOD, GR, APX, GPX, CAT)	Augmentation du taux de croissance	(Patade et al., 2014)
300mM NaCl, 24 et 48 h	<i>Vigna radiata</i>	15mM	Métabolisme Antioxydant (GSH, GPX t GR)	Réduction du stress oxydatif	(Hossain and Fujita, 2010)

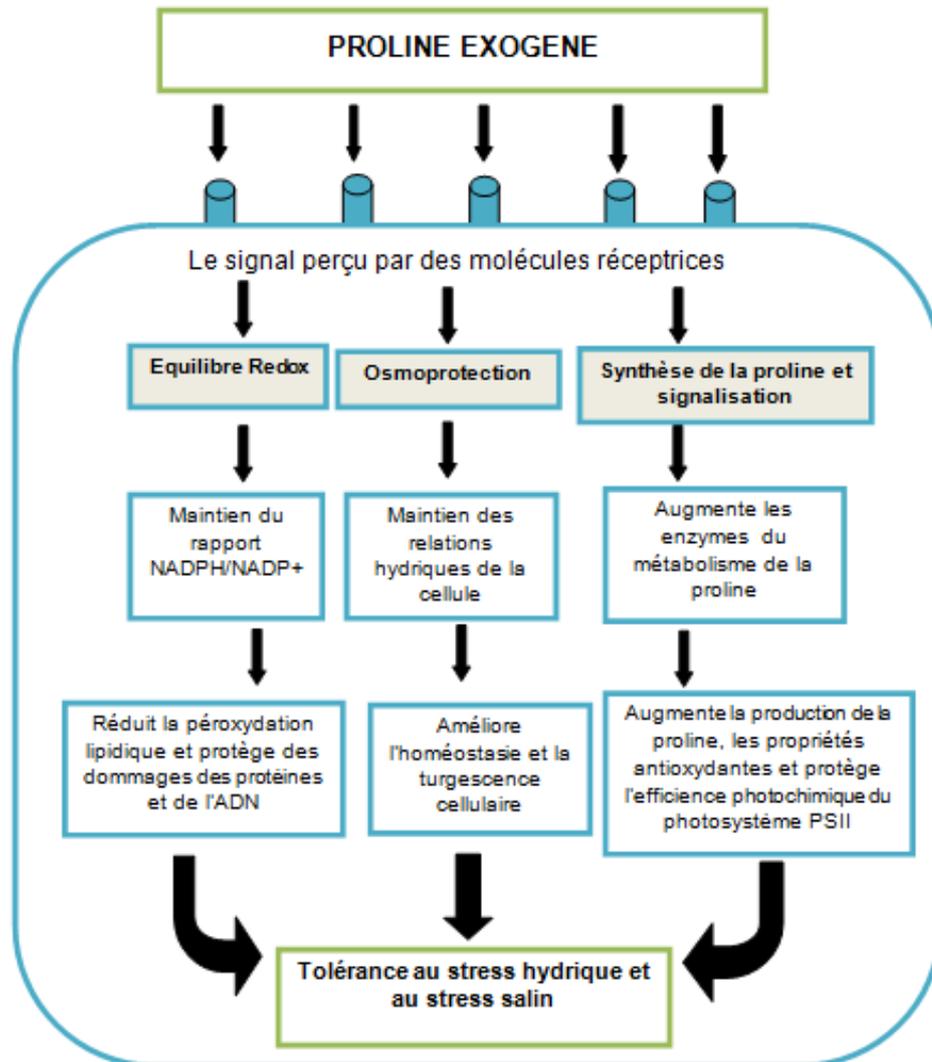


Figure 5. Représentation schématique du mécanisme potentiel impliqué dans la tolérance au stress salin et au stress hydrique après l'application de la proline exogène (Per et al., 2017).

Cependant malgré ses fonctions protectrices contre les stress environnementaux, la toxicité de la proline pour la croissance des plantes a été rapportée. Un débat est engagé pour savoir si cette toxicité provient de la proline ou bien du produit de sa dégradation (P5C) (Nanjo et al., 2003) (Ayliffe et al., 2002; Deuschle et al., 2001; Hellmann et al., 2000; Mani et al., 2002; Verbruggen and Hermans, 2008a). Les données de Deuschle et al. (2004) soutiennent l'hypothèse de la toxicité issue de l'accumulation du GSA/P5C (Glutamate semialdehyde/Pyrroline-5-carboxylate) (Verbruggen and Hermans, 2008b). Selon Szabados et Savoure (2010), la toxicité de la proline est souvent observée chez les plantes traitées avec de fortes concentrations de la proline.

Matériels et Méthodes

I. Matériel végétal

Deux variétés de blé dur cultivé (*Triticum durum* Desf.) ont été utilisées (tableau 1 annexe1). Elles sont gracieusement fournies par l'institut technique des grandes cultures (ITGC) de Tiaret, Algérie. Ces variétés locales traditionnelles sont très connues par les agriculteurs et largement utilisées dans les régions semi arides. Elles ont été choisies sur la base de leur origine locale, leur importance dans les zones de production céréalière et leur disponibilité.

- **Hedba 3** abrégé en HD3 est très estimé par la semoulerie. Variété de fonds des emblavures algériennes de blé dur par ses bons rendements moyens en grains très semouliers (Miège, 1950).
- **Mohammed ben bachir** abrégé en MBB est une variété locale issue de la sélection généalogique faite à l'intérieur d'une population native de la région de Sétif (Mekhlouf et al., 2006).

II. Méthodes d'étude

II.1. Test de l'effet de la proline exogène sur la germination

a. Conditions de germination

Parce que la germination est un stade crucial pour la croissance des plantes et souvent limité par la salinité du sol, nous avons jugé intéressant d'estimer la réponse des semences à la proline en conditions stressantes à minima leur capacité de germination.

Pour ce faire, les semences stérilisées des variétés étudiées (HD3 et MBB) sont mises en germination à raison de 20 graines dans des boîtes de pétri (9 cm de diamètre) contenant 20ml du milieu MS semi-solide autoclavé (pH 5.7 ; 20g.l⁻¹ sucrose ; 3.5g.l⁻¹ d'agar) (tableau 2 annexe 1) avant d'être incubées dans des conditions contrôlées pendant 7 jours (photopériode 8h/16h, 25°C). 7 boîtes de pétri préparées par traitement et les quatre traitements appliqués sont précédemment décrits (*Témoin ; NaCl ; proline ; NaCl+proline*). Ce test a été conduit dans des conditions contrôlées au laboratoire des ressources génétiques et biotechnologies (LRGB) à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'Alger.

II.2. Test de l'effet de la proline exogène sur les paramètres morpho-physiologiques et biochimiques de deux variétés de blé dur HD3 et MBB en stress salin

II.2.1. Conditions de culture

Pour répondre à notre objectif, l'essai a été conduit dans des conditions contrôlées *in vitro* au laboratoire des ressources génétiques et biotechnologies (LRGB) à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) d'Alger et au laboratoire d'adaptation des plantes aux contraintes environnementales (APCE) aux Sorbonnes universités ex. UPMC (France) en collaboration avec l'équipe de physiologie végétale de l'université des sciences et technologie Houari Boumediene USTHB à Alger.

Après désinfection (comme décrit précédemment), les semences ont été mises en germination dans des boîtes de pétri carrées (12x12 cm) contenant 50 ml du milieu MS (*Murashig et Skoog, 1962; Duchefa Biochimie M0221*, tableau 2 annexe 1) semi solide (0.35% agar; 20g.l⁻¹ saccharose) dans des conditions stériles à raison de 50 graines par boîte pendant trois à quatre jours.

Les pousses homogènes ont été par la suite sélectionnées pour le repiquage dans des tubes en verre répartis en quatre lots : ① **Témoin** milieu MS standard; ② **NaCl milieu** MS + 10g.l⁻¹ NaCl; ③ **Proline** MS + 20mM L-proline; ④ **NaCl + proline** MS + 10g.l⁻¹ NaCl + 20mM L-proline. Chaque lot contient 24 tubes. La durée du traitement est majoritairement de 10 jours pour l'ensemble des analyses :

a. Application du stress et de la proline exogène

La contrainte saline induite par le chlorure de sodium (10g NaCl.l⁻¹ soit 171mM) et la proline exogène (20mM L-proline) ont été appliqués dès le 1^{er} jour du repiquage (traitement continu) et les prélèvements sont effectués pour chaque culture après 10 jours de repiquage correspondant au stade 2 feuilles-début de la 3^{ème} feuille.

La mise en culture a été réalisée en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Les lots ont été placés à chaque fois en chambre de culture sous une photopériode de 16/8h et à une température de 23°C.

❖ Pour tester la régulation de l'expression génique, nous avons également préparé quelques cultures pour un traitement de quelques heures (traitement court). La contrainte saline induite par le chlorure de sodium (10 g NaCl.l⁻¹) et la proline exogène (20mM L-proline) ont été

appliqués pendant 4 ou 8 heures pour des plantules non traitées et âgées de 10 jours sur le milieu MS liquide additionné ou pas du NaCl et/ou de la proline selon les différentes conditions précédemment décrites.

II.2.2. Prélèvements

Après 10 jours de culture, (4 ou 8 heures pour les cultures du traitement court), les plantules prélevées des deux variétés et de chaque lot ont été lavées et séparées en deux parties, partie aérienne et partie racinaire et conservées par la suite à -20 °C pour les différents tests (3 prélèvements par lot) . Le sectionnement est effectué au niveau du collet.

II.2.3. Techniques analytiques

II.2.3.1. Pourcentage de germination

Le pourcentage de germination (PG) des semences a été déterminé comme étant le rapport entre le nombre total des semences germées (Nt) et la totalité de graines ensemencées initialement (N): $PG = \left(\frac{Nt}{N}\right) \times 100$. Le critère de germination retenu correspond au moment où la radicule a percé les enveloppes (téguments) selon la définition de Côme (1970). Une moyenne est déterminée à partir de sept boîtes de pétri utilisées pour chaque traitement.

II.2.3.2. Analyses physiologiques et biochimiques

Afin d'estimer le comportement d'ordre physiologique et biochimique du blé en réponse à la proline exogène et au sel, nous avons quantifié quelques paramètres d'ordres morpho-physiologiques et biochimiques dans les feuilles et les racines des deux variétés.

II.2.3.2.1. Croissance en longueur et croissance pondérale

La mesure en centimètres de la longueur des feuilles et des racines de 20 plantules a été soigneusement faite à l'aide d'une règle graduée dans les quatre conditions. Par la suite, les tissus foliaires et racinaires ont fait objet de pesées avant et après étuvage à 65°C/72h pour obtenir la biomasse fraîche et racinaire en milligramme respectueusement. Les mesures obtenues nous fournissent une information sur la réponse morphologique des plantules à l'application de la proline et du sel.

Nous avons calculé l'indice de sensibilité (IS, %) qui nous permet d'estimer l'effet de la salinité sur la croissance des deux variétés. Il a été déterminé sur la base du poids de matière végétale sèche (PS) des feuilles et des racines entre les plantules traitées et les plantules non traitées selon les rapports suivants :

$$IS = 100 \times ((PS_{NaCl} - PS_{témoin}) \div PS_{témoin})$$

$$IS = 100 \times ((PS_{proline} - PS_{témoin}) \div PS_{témoin})$$

$$IS = 100 \times ((PS_{proline\ et\ NaCl} - PS_{NaCl}) \div PS_{NaCl})$$

II.2.3.2.2. Observation microscopique des racines

Afin d'avoir un aperçu sur l'effet de la proline sur les racines, nous avons observé à l'échelle microscopique les extrémités racinaires de nos plantules dans les différentes conditions. Pour ce faire, nous avons préparé la solution Hoyer's dans une plaque à décomptage (H₂O pure, glycérol 100 %, hydrate chloral, gomme arabique 12/1/20/1.3 v/v/p/p). Puis, les extrémités racinaires de plusieurs plantules issues de chaque traitement sont soigneusement coupées à main levée (1 cm de long maximum) au moyen d'une lame en petits fragments. Ces derniers sont directement incubés sous froid dans la solution Hoyer's pendant quelques jours pour l'éclaircissement. Les préparations microscopiques sont étalées avec soin entre la lame et la lamelle et l'observation au microscope à fluorescence (*ApoTome, Zeiss Axioskop*) au grossissement (10x) est effectuée après décoloration des tissus.

II.2.3.2.3. Teneur relative en eau TRE

Le statut hydrique des plantules est évalué par la teneur relative en eau. La teneur en eau des feuilles est calculée en pourcentage sur des fragments foliaires selon la relation suivante de Clark et Mac-Caig (1982) :

$TRE (\%) = [(PF - PS) \div (PT - PS)] \times 100$ avec **PF** le poids frais initial ; **PS** le poids sec à 80°C/48h ; **PT** le poids en pleine turgescence.

II.2.3.2.4. Teneur en pigments photosynthétiques

Il est admis que le sel affecte les teneurs en chlorophylles, la quantification des pigments chlorophylliens permet d'avoir une information sur l'effet de la proline sur la capacité photosynthétique des plantules stressées.

L'extraction des pigments photosynthétiques est réalisée sur environ 100 mg de la poudre végétale des tissus foliaires frais dans 1ml d'acétone 92% en présence de carbonate de

magnésium pour éviter la dégradation acide des chlorophylles. Après centrifugation à 10 000 tours/min à 4°C pendant 10 minutes, 2ml du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ pur sont ajoutés au surnageant pour accélérer la libération de chlorophylle. Afin de déterminer la concentration de ces pigments, la lecture des densités optiques des solutions est réalisée, à l'aide d'un spectrophotomètre visible (*Biochrom*), à trois différentes longueurs d'ondes selon les équations de Lichtenthaler (1987) :

$$Chl\ a\ (\mu g.\ ml^{-1}) = (12.7 \times DO663) - (2.63 \times DO645)$$

$$Chl\ b\ (\mu g.\ ml^{-1}) = (22.9 \times DO645) - (4.68 \times DO663)$$

$$Chl\ a + Chl\ b\ (Chl\ totale)\ (\mu g.\ ml^{-1}) = (20.2\ DO645) + (8.02 \times DO663)$$

$$Car\ (\mu g.\ ml^{-1}) = 5 \times DO460 - ((3.19 \times Chl\ a) + (130.3 \times Chl\ b \div 200))$$

II.2.3.2.5. Protéines hydrosolubles

Le dosage des protéines hydrosolubles a été effectué selon la méthode Bradford (1976). Environ 100 mg de la matière végétale congelée (feuilles et racines) sont broyés dans l'azote liquide puis homogénéisés dans 1ml de l'eau milliQ. Les solutions sont par la suite centrifugées à 5000 tours/minute (rpm) à 4°C pendant 15 minutes.

Un volume de 200 µl de réactif Bio-Rad (*Protein Assay kit*) a été ajouté à 200 µl des extraits et la teneur des protéines hydrosolubles est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm. Cette teneur est quantifiée à l'aide d'une courbe d'étalonnage préparée à partir de concentrations croissantes d'albumine bovine serum (*BSA, Sigma*) de 0 à 15 mg/ml à partir d'une solution mère BSA 1 mg/ml (figure 4 annexe 1).

II.2.3.2.6. Teneur en sucres solubles

Le rôle de l'accumulation des sucres dans les réponses au stress salin a été largement rapporté dans la littérature. Le dosage des sucres solubles a été effectué selon la méthode Mc Cready (1950). 150 mg de la poudre végétale congelée des feuilles et racines des deux variétés étudiées sont vortexés dans 2ml d'éthanol 80% bouillant. Après incubation au bain marie à 60°C pendant 40 minutes, le broyat est refroidi suivi par une centrifugation à 3000 tours/minute pendant 20 minutes.

Le culot résultant de l'extraction des sucres a servi à l'extraction de l'amidon après incubation dans le froid pendant 24h et en présence de 5 ml d'H₂O milliQ et 6,5 ml d'acide perchlorique à 65%. Suivi d'une centrifugation à 5000 tours/minute pendant 20 minutes, les surnageants sont ajustés à 50 ml avec l'eau milliQ.

Un volume de 2ml de réactif d'anthrone (0.2 g de l'anthrone + 100ml d'acide sulfurique 95%) est ajouté à 1ml d'extraits glucidiques et d'extraits d'amidon. Après agitation, les tubes sont maintenus dans le bain-marie 95°C pendant 15 minutes, et les mesures spectrophotométriques sont effectuées à 630 nm. Le calcul de la concentration des sucres a été déduit par la courbe d'étalonnage établie à l'aide d'une série de dilutions de glucose (0 à 100 µg/ml) préparées à partir d'une solution mère de 100µg/ml (figure 5 annexe 1). Pour l'amidon, la quantité finale est obtenue par l'utilisation d'un facteur de correction 0,9.

II.2.3.2.7. Teneur en proline libre

Le contenu en proline libre est déterminé selon la méthode de Bates et al. (1973). Un aliquote de 50mg de la poudre végétale congelée préalablement broyée dans l'azote liquide est mise en suspension dans 1.5ml de l'acide sulfosalicylique 3% (m/v). Après homogénéisation, les tubes sont centrifugés à 14 000 rpm à 4°C pendant 10 minutes.

Pour un volume de 1 ml de surnageant, 1ml de tampon ninhydrine (2.5% ninhydrine (m/v) dans 60% acide acétique 100% et 40% d'acide orthophosphorique 6 M) et 1ml d'acide acétique 100% sont ajoutés. L'homogénat est porté à ébullition au bain-marie à 100°C pendant 1h et la coloration est extraite par la suite avec 2ml de toluène. L'ensemble est agité pendant une minute avant d'effectuer des mesures spectrophotométriques sur la phase supérieure organique à 520 nm. Les valeurs des densités optiques sont rapportées sur la courbe étalon (figure 3 annexe 1) obtenue à partir d'une gamme de 0 à 20 µg.ml⁻¹ réalisée à partir de la solution 1mg.ml⁻¹ L-proline/acide sulfosalicylique 3% (m/v).

II.2.3.2.8. Teneur en cations Na⁺ et K⁺

Une des conséquences du stress salin sur les plantes est le déséquilibre ionique causé par une insuffisance en certains éléments nutritifs comme le potassium et une accumulation des ions toxiques le cas du sodium. Le dosage des ions de sodium et de potassium s'est effectué selon le protocole de Munns et al. (2010) par photométrie à flamme (*Model 410 Sherwood Scientific Flame Photometer*, figure 6 annexe 1). Le principe repose sur la mesure de l'intensité d'émission caractéristique de l'élément à doser lors de son passage de l'état excité à l'état fondamental. La lumière émise est proportionnelle au nombre d'atomes retournés à l'état initial et donc à la concentration de l'échantillon.

Après dessiccation, le matériel végétal sous forme de poudre (environ 20 mg) a été attaqué avec 5 ml d'acide nitrique HNO₃ à une concentration de 0.5 M. Les homogénats sont directement mis en incubation dans le bain-marie à 80°C et après une heure ils sont

centrifugés à 3000 rcf (g) pendant 10 minutes. Ensuite, les surnageants sont dilués 50 fois dans le cas des traitements avec le sel (*NaCl* et *NaCl + proline*) pour les deux ions analysés et 100 fois dans les traitements sans NaCl (*témoin* et *proline*) uniquement pour le dosage du potassium. Ces dilutions sont nécessaires pour fournir des échantillons avec des concentrations du Na⁺ et K⁺ correspondant à nos gammes étalon.

A partir des solutions mères 50 µg.ml⁻¹ (NaCl pour le sodium et KCL pour le potassium), des gammes standards sont préparées pour des valeurs allant de 0 à 25 µg.ml⁻¹ (figure 7 annexe1). Les concentrations en sodium et en potassium en µg/ml ainsi obtenues sont converties en micromoles par gramme selon l'équation suivante :

$$[cation \mu mol/gMVS] = (C \times fd \times Vol) \div (MVS \times MM)$$

Avec **MM** masse molaire 39.098 g.mol⁻¹ pour le K⁺ et 22.99 g.mol⁻¹ pour Na⁺; **C** concentrations en µg.ml⁻¹; **MVS** poids de la poudre végétale utilisée pour l'extraction (g), **Vol** volume de l'acide nitrique HNO₃ (ml) et **fd** facteur de dilution.

Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

II.2.3.2.9. Estimation de l'intégrité membranaire

a. Teneur en malondialdéhyde

La peroxydation lipidique est habituellement estimée par la quantification du malondialdéhyde (MDA) qui est le produit final des dommages oxydatifs interférant avec la fonction des membranes cellulaires. Le dosage est réalisé selon la méthode décrite par Health et Packer (1968) dont le principe est basé sur la réaction du MDA avec deux molécules d'acide thiobarbiturique, le complexe ainsi formé est suivi en lumière.

Les extraits ont été préparés à partir de 100 mg de feuilles qui sont bien broyées dans un mortier en présence de 2ml d'acide trichloroacétique TCA 20% (v/v). Les broyats sont homogénéisés et centrifugés par la suite à 15 000 tours/minute pendant 15 minutes à 4°C. Un volume de 500µl des surnageants récupérés est mélangé avec 0.5ml du milieu réactionnel TCA 20% et TBA 0.5% (p/v) puis incubé dans un bain marie à 95°C pendant 30 minutes. Refroidis, les extraits sont par la suite centrifugés à 10 000 tours/minute pendant 10 minutes. Les densités optiques ont été mesurées au spectrophotomètre à deux longueurs d'ondes 600 et 532nm. La première est mesurée pour estimer les substances libérées par l'acide thiobarbiturique TBA d'une manière non spécifique et qui absorbent également à 532 nm. La concentration en MDA est donnée en µmoles/g de poids sec selon la formule suivante :

$$MDA (\mu\text{moles. g}^{-1}) = (DO_{532} - DO_{600}) \times 1000 \times V \div 155 \times PF$$

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

b. Fuite d'électrolytes

La quantification du lessivage d'électrolytes dans les tissus foliaires permet d'estimer le degré d'intégrité ou d'altération des structures membranaires dans les différentes conditions. Elle est obtenue par mesure de la conductivité électrique selon la méthode de Dionisio-Sese et Tobita (1998). Pour ce faire, des fragments foliaires (longueur 1cm) sont placés dans 20ml de l'eau distillée et leur conductivité électrique **CE1** ($\mu\text{S/cm}$) est mesurée après 60 minutes. Ensuite, les échantillons sont mis à bouillir dans le bain-marie pendant 5 minutes et une deuxième mesure de conductivité est réalisée **CE2** ($\mu\text{S/cm}$) après refroidissement. Le pourcentage de la fuite d'ions est calculé par le rapport entre EC1 et EC2. Une moyenne de trois mesures a été établie pour chaque traitement et chaque variété.

II.2.3.2.10. Mesure de l'activité antioxydante superoxyde dismutase

Les superoxydes dismutases SOD font partie des protéines enzymatiques qui constituent l'essentiel du système de défense antioxydant des plantes contre les radicaux libres. Leur activité assure l'élimination des anions superoxydes $\text{O}_2^{\bullet-}$ en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et en oxygène par une réaction de catalyse dite dismutation.

L'extraction des protéines est réalisée à partir de 500mg de poudre végétale issue des tissus foliaires dans 1ml de tampon K-phosphate 50mM (pH7) contenant 1% de polyvinylpolypyrrolidone PVP. Les homogénats sont centrifugés à 16 000 g à 4°C pendant 30 minutes. Un volume de 2.5ml de l'extrait est purifié par passage sur des colonnes de Sephadex G25-PD10 (*GE Healthcare*) pour éliminer les composés de faible poids moléculaire capables d'interférer avec l'activité enzymatique. Les extraits sont élués par l'ajout de 3.5ml de tampon d'éluion (100 mM phosphate de potassium pH7.8) et les éluats récupérés dans des tubes propres sont conservés à - 80°C pour les mesures de l'activité superoxyde dismutase.

La concentration des protéines des différents extraits est déterminée avec le réactif de Biorad (*Biorad Laboratories*) à 595 nm selon la méthode colorimétrique de Bradford (1976) tel que décrit précédemment.

a. L'activité de la superoxyde dismutase

L'activité superoxyde dismutase SOD est mesurée par spectrophotométrie à 560 nm. Son principe est basé sur sa capacité d'inhiber la formation du bleu de Formazan issu de la réduction photochimique du nitrobleu de tétrazolium NBT par l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Ce dernier est le produit de la photoréaction de la riboflavine. Plus l'activité SOD est forte moins le NBT est réduit. Une unité d'activité SOD est donc définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50% de la réduction du NBT.

Un volume de 20 μ l de l'extrait enzymatique est ajouté à un milieu réactionnel composé du tampon phosphate de potassium (50 mM pH 7.8), l'EDTA (1 mM), du NBT (2.25 mM), de la méthionine (13 mM) et de la riboflavine (2 mM). La réaction est initiée par l'ajout de la riboflavine en dernier et le mélange est incubé sous une intensité lumineuse de 37 watts à 25°C pendant 13 minutes. Un contrôle est parallèlement placé à l'obscurité. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin sans extrait enzymatique qui représente le 100% de l'inhibition :

$$\% \text{ inhibition} = [(Abs \text{ témoin} - Abs \text{ échantillon}) \div Abs \text{ témoin}] \times 100$$

$$UA = \% \text{ inhibition} \div (n \times 50)$$

UA (unité d'activité de la SOD) ; n (mg de protéines présents dans le volume de l'extrait utilisé).

Tous les dosages décrits ont été effectués en triplicata et à l'abri de la lumière puisque la riboflavine et le NBT sont photosensibles.

II.2.3.3. Analyse moléculaire

II.2.3.3.1. Test de l'expression génique de quelques gènes d'intérêt

1. Choix des amorces

En vue de tester la régulation de l'expression génique dans nos conditions expérimentales, une amplification *in vitro* de certains gènes associés à des mécanismes directement ou indirectement impliqués dans la tolérance au stress salin a été réalisée. Les gènes ciblés sont :

- Un gène codant le marqueur du stress : *Déhydrine DHN* ;
- Trois gènes codant le métabolisme de la proline : **P5CS** (*Pyrraline-5-carboxylate synthase, Pyrraline-5-carboxylate*) ; **P5CR** (*Pyrraline-5-carboxylate reductase*) ; **PDH** (ou ProDH *proline dehydrogenase*) ;

- Trois gènes codant les transporteurs du sodium : *High-affinity K⁺ transporter* **HKT 1;4-1**, **HKT1;4-2** et **HKT1;5 (HKT8)** ;
- Pour normaliser les données d'expression, un gène de ménage *Tubuline* **TUB** qui n'est pas affecté par les traitements appliqués est utilisé.

Le succès et l'efficacité d'une réaction d'amplification par PCR dépend fortement du choix de bonnes amorces nucléotidiques qui initient le travail de l'amplification. Dans un premier temps, les séquences des gènes spécifiques au blé dur ont été donc trouvées sur la banque des séquences nucléotidiques Genbank du NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) (annexe 2). Le cas échéant, un alignement d'espèces apparentées au blé dur avec le logiciel online BLAST (*Basic Local Alignment*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nous a permis de définir la séquence la plus proche de notre espèce. Afin de bien cibler les séquences à amplifier, un alignement multiple a été réalisé pour certains gènes à l'aide de l'outil d'interface de l'INRA Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Pour chaque zone d'intérêt de ces séquences, un couple d'amorces a été ensuite choisi sur Primer3 Input (version 0.4.0) (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) avec 57°C de température optimale de fusion. La compatibilité de chaque paire d'oligos avec les zones d'ADN ciblées a été théoriquement vérifiée à l'aide des outils disponibles en ligne.

Pour le gène PDH, sa séquence génomique chez le blé dur n'est pas disponible sur la base NCBI. Grâce à un alignement sur BLAST des séquences d'espèces proches du blé tendre (*Triticum aestivum*), de fortes identités ont été trouvées avec la PDH de l'orge (95%, [AK37694.1](#)), du *Brachypodium* sp. (87%, [XM003574255.3](#)) et du riz (85%, [XM015757226.1](#)). Ces similitudes nous ont permis de confirmer l'identification de la protéine prédite de la proline déshydrogénase du blé tendre ([AK332189.1](#)). Cette dernière a servi pour le choix d'oligonucléotides de la protéine de notre plante. Quant au gène HKT1;5 ses oligos sont définis à partir de la séquence génomique conservatrice (consensus) des deux séquences homologues (B1 et B2) de ce gène chez le blé dur (annexe 2).

Les solutions stock de ces amorces ont été commercialement synthétisées et reçues par le laboratoire Eurogentec (*Eurogentec experience true partnership*) à une concentration de 100µM et conservées à - 20°C en vue d'analyses moléculaires.

2. Extraction des ARNs totaux et dosage

Les ARN totaux sont extraits à partir des feuilles et des racines selon la méthode du phénol-chloroforme et celle de *RNeasy Plant Mini kit de Qiagen*.

a. Méthode phénol chloroforme

L'extraction est faite selon la méthode phénol-chloroforme suivant le protocole de Baechtel (1988) en usage au laboratoire d'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. 100 mg de la poudre végétale congelée (feuilles ; racines) sont immédiatement homogénéisés, au moyen d'un vortex, dans 750 µl du tampon d'extraction et 750 µl du phénol/chloroforme pendant une minute. Les extraits sont centrifugés à 10 000 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants récupérés sont centrifugés à nouveau à 10 000 rpm pendant 5 minutes dans des tubes propres contenant 500 µl de phénol/chloroforme. La même opération est répétée avec 500 µl de phénol/chloroforme pour nettoyer la phase contenant les ARNs. La phase supérieure aqueuse est précipitée dans un volume de 1/3 de chlorure de Lithium qui précipite sélectivement l'ARN (*150 µl de LiCl 8M pour 450 µl du surnageant*) et incubée dans la glace à 4°C pendant la nuit. Le lendemain, après une centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C les culots sont lavés avec 300 µl d'eau ultrapure stérile. Un volume de 100 µl de LiCl est ajouté pour une deuxième précipitation en conditions froides pendant 5h30 à 6h. Après incubation, les surnageants sont éliminés avec précaution et les culots sont lavés avec 300 µl de l'éthanol 70° puis centrifugés à 12 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. L'éthanol est complètement éliminé et les culots sont ensuite laissés sécher sous hotte chimique pendant environ 10 minutes. Enfin les culots sont repris et resuspendus dans 60 µl d'eau milliQ stérile et conservés à - 20°C.

b. Méthode d'extraction avec le kit Qiagen

Les ARNs de certains échantillons tissulaires (feuilles ; racines) sont extraits à l'aide du kit *RNeasy Plant Mini de Qiagen*. 100mg de la poudre végétale congelée sont extemporanément vortexés pendant une minute avec 450 µl du tampon d'extraction RTL additionné de β-mercaptoéthanol 1%. Les broyats sont transférés dans des colonnes (*QIAshredder spin*) pour éliminer les débris cellulaires suivis d'une centrifugation à 13 000 rpm pendant 2 minutes à température ambiante. Les filtrats sont délicatement transférés dans de nouveaux tubes avant d'ajouter 1/2 volume d'éthanol absolu. Les mélanges sont transvasés dans de nouvelles colonnes *RNeasy spin* et centrifugés à 13 000 rpm pendant 15 secondes. Les ARNs fixés à la membrane silice des colonnes sont lavés avec 350 µl de tampon RW1 (*wash buffer RW1*) et

centrifugés à 13 000 rpm pendant 15 secondes. Les colonnes sont lavées deux fois avec le tampon RPE (contenant de l'éthanol) suivi d'une centrifugation après chaque lavage (15 secondes à 13 000 rpm, puis pendant 2 minutes). Une centrifugation supplémentaire des colonnes est réalisée (1 minute à 13 000 rpm) pour éliminer la trace du tampon RPE (*wash buffer RPE*). Pour éluer les ARNs, 30 µl d'eau (*RNase-free water*) sont ajoutés aux colonnes et centrifugées pendant une minute à 13 000 rpm avant de les conserver à - 20 °C.

3. Analyse quantitative et qualitative des ARNs extraits

Les ARNs extraits ont été quantifiés par spectrophotométrie à l'aide d'un Nanodrop (*NanoDrop 1000 Thermo Scientific*). Comme la dégradation et la contamination des ARNs est très possible, leur pureté a été donc vérifiée à l'aide d'une migration sur gel d'agarose. Pour un volume équivalent de 1,5 µg d'ARN, 2 µl de tampon de bleu de charge (6x) (*DNA Gel Loading Dye, ThermoFisher Scientific*) sont ajoutés au volume total de 12 µl. L'homogénat est mis en migration sur le gel d'agarose à 2% (p/v) dans du Tris Acétate EDTA (TAE 0.5x) à 100 volts pendant 20 minutes. La visualisation sous UV a été réalisée à l'aide du système d'imagerie E-BOX (*Gel Imaging System, Vilber Lourmat E-Box*) grâce à la présence d'un intercalant ADN dans le gel d'agarose (*SYBR Green, Thermo Scientific (2x)*).

TAE (0.5x): 10 ml TAE (50x) + 990 ml H₂O.

4. Traitement DNase

Afin d'éliminer d'éventuelles traces d'ADN dans nos échantillons, les ARN totaux extraits (2µg) sont traités à l'enzyme DNase (1µl *DNaseI RNase Free 50mM, Thermo Scientific*) en présence d'un tampon contenant MgCl₂ pour activer l'enzyme (1µl *reaction buffer with MgCl₂ for DNase I (10x), Thermo Scientific*). Les ARN sont incubés à 37°C pendant 30 minutes et refroidis dans la glace avant d'inactiver l'enzyme ADNase en ajoutant 1µl d'EDTA (50mM). Une incubation des échantillons à 65°C pendant 10 minutes a été effectuée, servant ensuite à la synthèse des brins complémentaires d'ADN.

5. RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction* ou réaction en chaîne par polymérase après transcription inverse

La rétrotranscription abrégée en RT-PCR consiste à convertir l'ARN extrait en ADN. Son objectif est l'évaluation du niveau d'expression de nos gènes d'intérêt par rapport aux conditions témoin en fonction de différences d'intensité.

Elle se fait en deux étapes (i) la synthèse du brin complémentaire d'ARN (ADNc) qui consiste à retranscrire l'ARN, utilisé comme matrice, en ADNc à partir des amorces d'oligonucléotides grâce à une enzyme à activité ADN polymérase appelée la transcriptase inverse (*reverse Transcriptase* ou RT) qui catalyse la réaction inverse de la transcription ; (ii) l'amplification par la réaction de polymérisation PCR qui a pour but d'amplifier les ADNc résultants de la première étape.

En raison de la sensibilité des ARN à la dégradation, il est nécessaire de mener cette expérience sous froid en utilisant de la glace.

a. Synthèse d'ADNc (rétrotranscription)

Les ADN complémentaires sont obtenus, à l'aide de l'enzyme transcriptase inverse, à partir des ARN précédemment extraits. Pour une quantité de 1.5 µg d'ARNs, on a ajouté 2 µl d'oligonucléotides-dT (10µM) et complété le volume à 13 µl avec l'eau milliQ. Le mélange est incubé au bain marie sec à 70°C pendant 10 minutes pour l'hybridation des oligos aux ARN. Après refroidissement, un volume de 7 µl du mix réactionnel (**4µl du buffer RT (5x) + 1µl de l'enzyme *Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase* (200unités) + 2µl de déoxyribonucléotides dNTPs 10mM**) est ensuite ajouté à chaque échantillon. Afin de déclencher la réaction, les tubes sont incubés à nouveau à 42°C pendant une heure. A la fin de la réaction, les ADN sont resuspendus dans 60µl d'eau milliQ avant de les conserver à - 20°C.

b. L'amplification *in vitro* par PCR

L'amplification des ADNc par PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur (*Techne PCR Thermal Cycler*). Elle est obtenue grâce à des cycles multiples de la réplication d'ADN en présence d'amorces des oligonucléotides complémentaires aux deux extrémités de la séquence génomique à amplifier qui vont s'hybrider avec les brins d'ADN.

Chaque échantillon passe par une dénaturation initiale pour séparer les doubles-brins d'ADN à 95°C pendant 5 minutes suivi d'un nombre de cycles d'amplification. Les conditions de l'amplification d'un seul cycle se caractérisent par une phase de dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, suivie d'une hybridation des amorces aux simple-brins pendant 30 secondes et d'une élongation des amplicons à 72°C pendant 30 secondes.

La réaction PCR est faite dans un volume total de 23 μ l du mix contenant :

ADNc (échantillon)	2 μ l
Tampon PCR (Dream Taq Green buffer 10x)	2,5 μ l
Mix dNTPs (10mM)	0.5 μ l
Amorce Forward (10μM)	2 μ l
Amorce Reverse (10μM)	2 μ l
Dream Taq Green DNA polymerase (5unités/μl)	0.2 μ l
H₂O Q.s.p	15.8 μ l

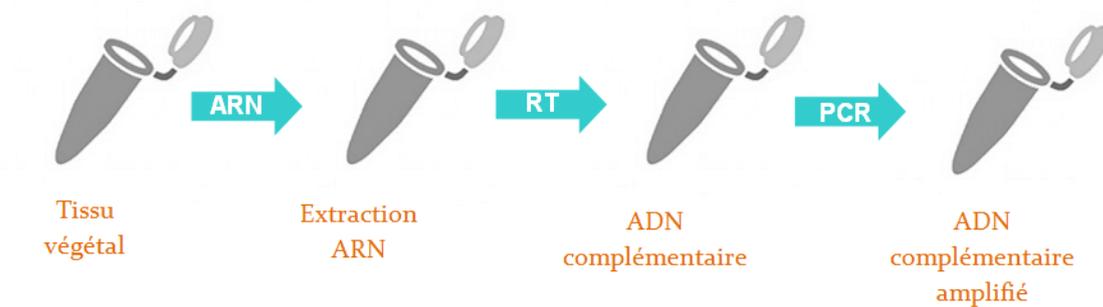


Figure 5. Récapitulation des étapes de la reverse-transcription.

La température d'hybridation T_m et le nombre des cycles varient selon le gène ciblé, voir le tableau ci-dessous :

Tableau 4. Séquences des primers utilisés et conditions de l'amplification *in vitro*.

Gène	Référence Genebank	Séquence des primers (5'- 3')	Taille d'amplicon	Nombre de cycles PCR	Température d'amplification PCR
<i>TaTUBa</i>	U76558.1	F: TGAAGAAGTTGGTGCTGAGT R: ACCACAAAGCAAACGTTCAA	162	27	55°C
<i>TdHKT1 ; 4- 2</i>	KF443079	F: CCATCTTTGTCATCGCCATC R: GAATGAGGATGAGTTTGCCG	228	33	55°C
<i>TdHKT1 ; 4-1</i>	KF443078	F: TGACTGTCCTCATGTTGTCGTC R: CGAAGGTCCACATGTTTCAAG	402	33	55°C
<i>TdHKT1;5 (TdHKT8)</i>	Consensus DQ646333/ DQ646334	F: CTCTTCCCTGTCTTCCCTCAG R: GAGTTGACCGACATGAACAG	257	33	59°C
<i>TaP5CR</i>	AY880317.1	F: GATTTCAGGATTGGTCTGG R: TACCACTCAAGCCAGTAACC	208	27	55°C
<i>TdP5CS1</i>	FK827071.1	F: GGGTATGAGAGTGCTTTGGT R: CCATTACCACTTCGAATGGC	248	28	55°C
<i>TaProDHI</i>	AK332189.1	F: TCGACTACTTCACCTTCGTG R: TTGTAGCAGTCGTGGGGTG	259	30	55°C
<i>TdDHN15.3</i>	AM180931.1	F: GAGTACCAGGGACAGCAG R: ATGCCATCATCCTCAGACG	200	28	55°C

6. Visualisation des amplifiats

A la fin de la réaction, 10 µl de chaque produit d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans le TAE (0.5x) à 100 volts pendant 20 minutes en présence de 5µl du marqueur 100 paires de bases 0.1 µg/µl (*GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, Fermentas Life Sciences*, figure 8 annexe 1). La visualisation a été réalisée sous UV à l'aide du système d'imagerie E-BOX (*Gel Imaging System, Vilber Lourmat E-Box*).

Des répliquats biologiques et techniques ont été réalisés pour chaque gène sur chaque échantillon tissulaire et dans les différentes conditions expérimentales.

II.2.3.4. Tentative de la détection de l'enzyme clé du catabolisme de proline (PDH) dans les mitochondries du blé

L'estimation de l'activité respiratoire dans les mitochondries brutes de blé dur est un essai supplémentaire mené pour tenter de trouver une éventuelle relation entre la proline exogène et l'activité respiratoire de ces organites. L'intérêt est particulièrement porté sur la relation entre le rôle de l'enzyme *proline déshydrogénase* (PDH) et la consommation d'oxygène (la respiration) en conditions *in vitro*. En effet, les mitochondries végétales sont impliquées dans l'accumulation de la proline par la présence dans ces organites de la première enzyme responsable de sa dégradation (PDH). En 2016, Cabassa-Hourton et ses collaborateurs de notre équipe (2016II) ont été démontré que chez *Arabidopsis*, la PDH lors du processus de catabolisme de la proline serait impliquée dans l'activité respiratoire mitochondriale. Elle catalyse l'oxydation de la proline en *pyrroline-5-carboxylate* P5C, les électrons libérés sont directement transférés à un accepteur d'électrons de type ubiquinone (ou indirectement à un accepteur de type Cytochrome C) de la chaîne respiratoire de la membrane interne mitochondriale, où finalement ils réduisent l'oxygène en molécules d'eau.

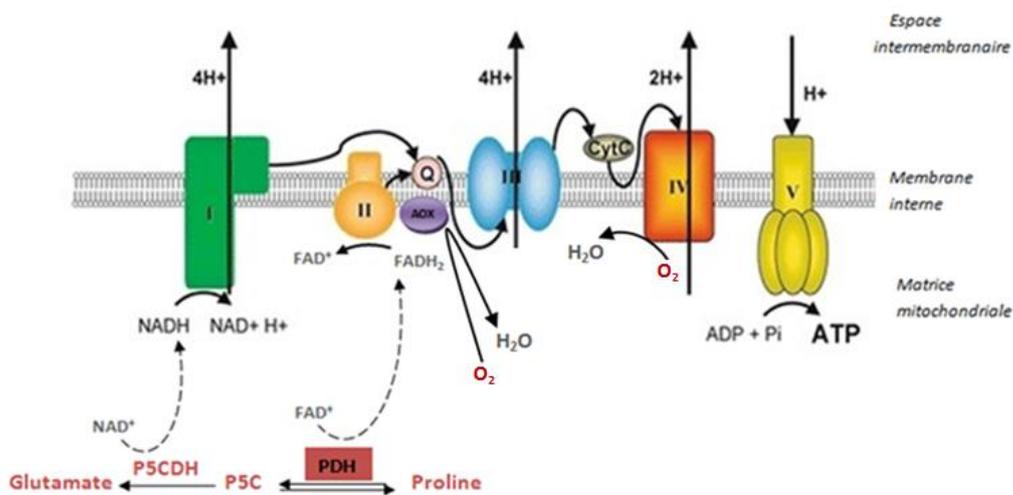


Figure 6. Représentation schématique du principe de la relation du catabolisme de la proline et la respiration mitochondriale.

Afin de détecter la protéine PDH et de tester l'hypothèse de l'implication du catabolisme de la proline dans la respiration mitochondriale, on a procédé donc à la mesure de la consommation d'oxygène au niveau des mitochondries comme indicateur de l'activité PDH et de son efficacité à oxyder son substrat la proline en se basant sur le protocole de Cabassa-Hourton et al. (2016) mis au point sur l'*Arabidopsis*. Pour induire la protéine PDH, son substrat L-proline a été injecté dans les extraits des suspensions mitochondriales.

II.2.3.4.1. Extraction des mitochondries brutes

L'extraction des mitochondries repose sur le principe de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle. Le protocole appliqué sur les tissus de blé est dérivé de celui d'*Arabidopsis*. Toutes les étapes sont réalisées à 4°C.

Les plantules âgées de 10 jours sont prélevées le jour même de l'extraction et leurs racines sont bien rincées à l'eau distillée. Après séparation, les feuilles et les racines sont directement broyées dans un volume de 80 ml de **tampon d'extraction pH 7.5** (à l'aide d'une centrifugeuse de jus Moulinex pour les feuilles et d'un mortier pour les racines). Une pincée de sable (de la Fontainebleau) est ajoutée pour faciliter le broyage des tissus effectué dans la glace. Les broyats sont filtrés à travers de la toile à bluter et du miracloth superposés respectivement sur un entonnoir. Les filtrats récupérés dans une fiole en verre sont transvasés dans des tubes de centrifugation SS34. Après équilibration avec le tampon d'extraction, ils sont soumis ensuite à deux centrifugations différentielles, à basse vitesse 2500g (rcf, *rotor JA20, Beckmann*) pendant 5 minutes (pour faire tomber les débris pariétaux, les noyaux et les chloroplastes) et à haute vitesse 15 000g pendant 20 minutes (pour faire tomber les mitochondries). A l'aide des pinceaux fins, les premiers culots de mitochondries brutes obtenus sont resuspendus dans un volume du **tampon de lavage pH7.5** contenant la BSA (*Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich*) et sont soigneusement pottérisés dans des potters lâches dans de la glace. Les suspensions sont diluées dans des tubes SS34 avec un volume maximal de tampon de lavage et centrifugés à basse vitesse 2500g. Après 5 minutes, les surnageants sont transférés dans des tubes propres et centrifugés à haute vitesse pour culotter les mitochondries. Les culots sont repris à nouveau dans le tampon pour le lavage après pottérisation et centrifugés à deux cycles (à basse vitesse et à haute vitesse). Les culots de cette centrifugation sont pottérisés dans du **tampon de reprise** avant d'être centrifugés à 15 000g pendant 20 minutes, suivis de deux centrifugations à haute vitesse.

Les culots obtenus, enrichis en mitochondries brutes, sont repris dans un petit volume de tampon de reprise et aliquotés par la suite pour le dosage des protéines mitochondriales, la mesure de l'activité respiratoire et l'immunodétection.

Tampon d'extraction pH 7.5 : 0.3M saccharose, 25mM Na₂ pyrophosphate, 10mM KH₂PO₄, 20mM acide ascorbique, 2mM Na₄ EDTA, 1% BSA, 1% PVP40, PMSF

Tampon de lavage pH 7.5 : 0,3 M saccharose, 10mM TES, 0.1% BSA-FFA, PMSF

Tampon de reprise : tampon de lavage sans BSA, PMSF.

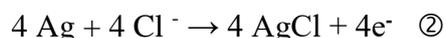
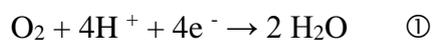
II.2.3.4.2. Mesure de la consommation d'oxygène des mitochondries extraites

a. Principe

Le principe est basé sur une mesure cinétique de l'oxygène moléculaire en milieu liquide (l'oxygraphie) grâce un système composé d'une électrode sensible à l'oxygène (électrode Clark) relié à un ordinateur pour enregistrer les tracés, en fonction du temps (secondes), de la cinétique de l'oxygène consommé en nmoles/s. La consommation d'oxygène mitochondriale est déterminée en utilisant des substrats et des inhibiteurs de la chaîne respiratoire.

b. Description de l'oxymètre (l'électrode Clark)

En résumé, l'électrode Clark (sonde à oxygène, *Hansatech instruments*) comporte un bain thermostaté (25°C), une cathode en platine et une anode en argent qui sont séparées de la cuve de l'expérimentation (cuve de mesure), contenant la suspension mitochondriale, par une membrane de téflon imperméable à l'eau et aux ions mais perméable à l'O₂. Les molécules d'oxygène présentes dans la cuve de mesure diffusent à travers cette membrane et sont réduites en eau par les électrons de la cathode ①. Simultanément, une réaction d'oxydation se produit au niveau de l'anode ②. Le courant électrique ainsi généré est amplifié, enregistré et il est proportionnel à la concentration d'oxygène dans nos échantillons qui se réduit en fonction du temps:



Techniquement, la calibration de l'électrode est indispensable avant chaque série de mesures pour étalonner l'appareil et pour vérifier la fiabilité des mesures oxygraphiques mitochondriales dans les conditions expérimentales.

Après la mise en marche du dispositif sous une pression d'O₂ en équilibre avec l'air (0.6 à 0.7 mvolt), un volume de 1000 µl du tampon d'électrode est ajouté dans la cuve de mesure. Sous une agitation constante, l'enregistrement de la tension est lancé, le signal est stabilisé et son seuil correspond à une saturation en oxygène équivalent à 250 moles d'O₂. Quelques secondes après, 10 µl de la solution d'hydrosulfite de sodium un piègeur de dioxygène est directement injecté dans la chambre de mesure (un petit aliquote d'hydrosulfite de sodium Na₂S₂O₄ dans environ 300 µl du tampon). Une injection supplémentaire est effectuée pour obtenir une déplétion totale en O₂. La solution est ensuite éliminée et la cuve est abondamment rincée avec de l'eau propre. La différence de tension Δ mvolt (v₂ - v₁) entre l'état de la saturation et

celui d'épuisement d'O₂ dans le milieu est rapportée à la quantité d'O₂/mV et prise en compte pour l'étalonnage de l'appareil (figure 8 ; figure annexe 2,).

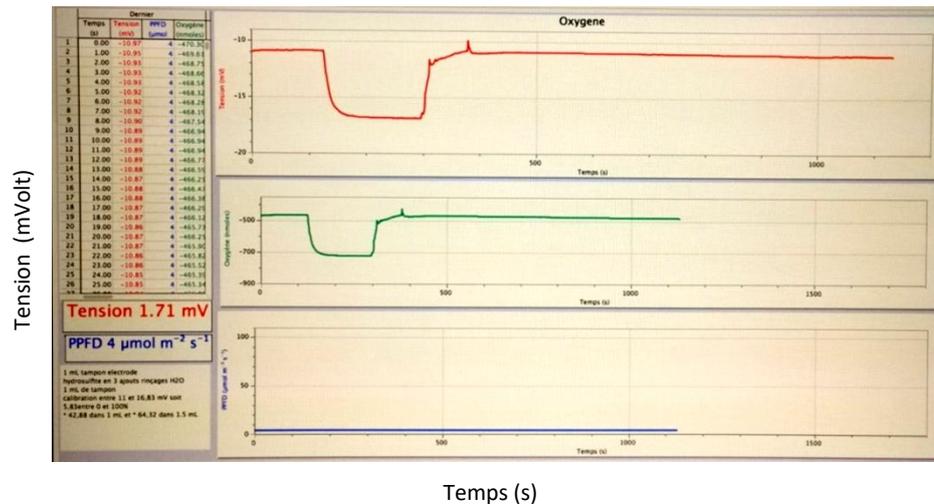


Figure 7. Exemple de la calibration de l'électrode Clark avant d'effectuer des mesures de la respiration mitochondriale des plantules de blé.

c. Mesure de la consommation d'oxygène

La chaîne respiratoire mitochondriale des plantes comprend deux voies de transfert d'électrons : la voie cytochromique qui comprend le cytochrome C oxydase (complexe IV de la membrane) et la voie alternative qui comprend l'oxydase Alternative (AOX). Afin d'aboutir à une consommation d'oxygène significative, nous avons optimisé les conditions du milieu de mesure par l'ajout des substrats nécessaires pour le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire tels que le *succinate* + *NADH* ; et sa vitesse s'accélère avec l'addition d'ADP. Avant l'épuisement total de l'ADP, une nouvelle injection est ajoutée pour accélérer le transport d'électrons. Pour répondre à notre objectif principal de cette expérimentation, *L-proline* est utilisé comme substrat à la place du succinate.

Des inhibiteurs spécifiques de ces composantes de la chaîne respiratoire mitochondriale (*le cyanure KCN pour le complexe IV; l'acide salicyl-hydroxamique SHAM et le pyrogallol PG pour l'AOX*) sont aussi ajoutés dans la cuve de mesure au fur et à mesure du suivi de l'évolution de la consommation d'oxygène. Ceci va dans le sens de révéler la capacité de chaque voie dans nos conditions. Pour un même substrat, la consommation d'oxygène mitochondriale est enregistrée à différents états respiratoires avec l'électrode :

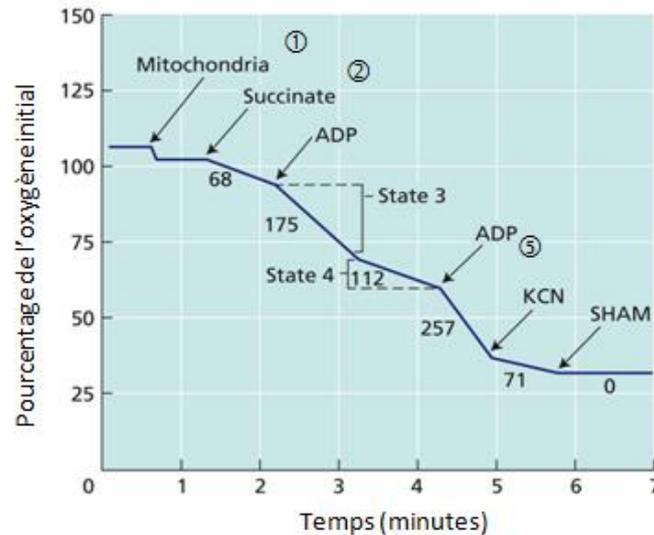


Figure 8. Schéma illustrant l'enregistrement de la consommation d'oxygène dans les mitochondries de l'haricot (*Vigna radiata*) et les différents états (Moller et Rasmusson *dans Plant Physiology*, 2003). Selon une nomenclature technique définie par Chance et Williams (1956), la consommation d'oxygène mitochondriale est enregistrée à différents états respiratoires pour un même substrat : état ① mitochondries seules ; état ② ajout des substrats ; état ③ ajout d'ADP en quantité limitée ; état ④ la totalité de l'ADP a été convertie en ATP ; état ⑤ anoxie.

L'intégrité des mitochondries et leur capacité à oxyder les substrats sont testés selon le protocole appliqué sur *Arabidopsis* sp. (Cabassa-Hourton, 2014). Les mesures sont indépendamment faites sur des mitochondries extraites à partir des feuilles et des racines des variétés étudiées. Pour les différents échantillons, un volume de la suspension mitochondriale de blé (20 µl) est soigneusement ajouté à la chambre de mesure contenant déjà le tampon de respiration sous agitation constante. Une série de deux mesures sont effectuées sur un même échantillon en présence des deux substrats *Succinate* + *NADH* et la *proline* dans l'ordre suivant :

- 900 µl tampon d'électrode
- 20 µl de mitochondries brutes issues de l'une des 4 différents traitements (témoin, stressé, proline ou bien stressé + proline);
- 3 µl d'ADP 20mM ;
- **30 µl de Succinate 0.4 M + 10 µl de NADH 0.1 M** ou bien **30 µl de L-proline 0.2 M**
- 3 µl d'ADP 20 mM
- 25 µl de KCN 0.1M
- 5 µl de KCN 0.1M
- 1 µl de DTT 0.25M + 10 µl de Pyruvate 0.5M
- 5 µl de SHAM 0.3M
- 1 µl de PG 0.1M

Tous ces substrats et inhibiteurs ne sont ajoutés qu'après obtention d'une pente suffisante et constante.

II.2.3.5. Tentative de la révélation de la protéine PDH par immunodétection

II.2.3.5.1. Détection de la présence de l'enzyme PDH dans les mitochondries

Afin de détecter la présence ou non de la protéine PDH caractérisée par son poids moléculaire (~57kDa) dans nos échantillons, une hybridation Western-blotting a été réalisée après une électrophorèse SDS-PAGE. Les protocoles d'analyses sont décrits ci-dessous.

II.2.3.5.2. Electrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes

L'électrophorèse SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) permet de séparer une protéine d'intérêt dans un échantillon protéique sur un gel d'acrylamide selon son poids moléculaire en présence d'un détergeant anionique SDS. Les échantillons à analyser sont préalablement préparés avant de les charger sur le gel. Ils sont donc soumis à un prétraitement dénaturant en ajoutant un volume du tampon Lämmli (4X) contenant 1 μ l β -mercaptoéthanol (1/4 du volume final des extraits) avant de les chauffer à 95°C pendant 5 minutes.

Le dosage colorimétrique des protéines a été effectué sur les mitochondries brutes extraites selon la méthode décrite par Lowry et al. (1951) par rapport à une gamme étalon réalisée à l'aide de la BSA (*Bovine Serum Albumin*) à une concentration de 0.5 mg/ml. Pour une concentration de 30 μ g. μ l⁻¹ de protéines, un aliquote d'extrait protéique mitochondriale est déposé (20 μ l) sur le gel d'acrylamide. Lors de la migration, les protéines sont d'abord concentrées sur le gel de concentration (*resolving gel 8%, 80 Volts, 30 minutes*) puis séparées sur le gel de séparation (*stacking gel 4 %, 120 Volts, 2 heures*). La migration est effectuée à l'aide d'une cuve d'électrophorèse contenant du tampon de migration (1x) (100 ml Tris-glycine (10x), 10 ml SDS 10%, 900 ml H₂O) et en présence d'un marqueur à protéines (5 μ l, *PageRuler Prestained Protein Ladder*) et d'un control positif (5 μ l de mitochondries brutes d'*Arabidopsis thaliana* écotype *Columbia*).

Tris glycine 10x (1l) : 30.2g Tris-base 250mM, 144g glycine 1.92M et H₂O.

Tampon Lämmli (4x) 10 ml: 4ml Tris-HCL 0.5M pH 6.8 ; 4ml glycérol 100% ; 0.8 g SDS.

II.2.3.5.3. Transfert sur membrane (Western-blot)

Une fois séparées sur gel, les bandes protéiques sont transférées sur une membrane nitrocellulose (*Amersham Hybond-ECL GE Healthcare*) à l'aide d'un montage en cassettes

(système de sandwich) composé du gel, de la membrane, de deux mèches et de huit papiers Whatman ayant tous la même taille que le gel. L'ensemble ou le sandwich est imbibé avec du tampon de transfert (*100ml Tris-glycine (10x), 200ml d'éthanol 96%, 3.75ml SDS 10%, complété à 1l avec H₂O*). Le montage est placé dans une cuve contenant le tampon de transfert dans laquelle le transfert est lancé à 120 volts sous agitation et refroidissement constants. Après 60 minutes d'incubation, la membrane est soigneusement récupérée et directement colorée dans une solution de marquage au rouge ponceau 0.1% pendant 5 minutes. La décoloration est faite avec un rinçage à l'eau pure puis avec du TBS-Tween (1x) pendant 5 et 10 minutes (*100ml TBS (10x), 1ml Tween20, complété à 1l avec H₂O*).

II.2.3.5.4. Révélation immunologique

Dans un premier temps, la membrane récupérée est saturée dans le tampon TBS-Tween contenant du lait écrémé à 5% pour bloquer les sites qui ne contiennent pas les protéines (50ml TBS-T (1x) + 2.5g du lait) pendant une heure sous agitation constante (25rpm, température ambiante). Plusieurs rinçages avec du TBS-T ont été brièvement effectués.

Puis elle est incubée dans l'obscurité toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine PDH1 dilué au 1/2500^{ème} dans du TBS-T (1x) contenant du lait écrémé 5% (*10ml du tampon de blocage + 8µl d'anticorps prédilué au 1/2^{ème} dans du glycérol*). La membrane est ensuite lavée dans le TBS-T (1x) pendant 15 minutes et trois fois successivement pendant 5 minutes. L'anticorps secondaire dilué au 1/8000^{ème} a été mis en incubation avec la membrane pendant 1 heure (*10µl d'Ac anti-IgG de lapin prédilué au 1/8^{ème} dans 10ml du TBS-T (1x)*). Quatre lavages de la membrane avec le TBS-T (1x) (15 minutes et deux fois 5 minutes) ont précédé le dernier lavage avec du TBS sans Tween.

La révélation est basée sur la détection de la réaction de l'anticorps avec la peroxyde de raifort (*horseradish peroxidase HRP*) grâce un substrat chimiluminescent composé de deux réactifs peroxyde d'hydrogène et luminol (1:1 v/v ; *kit ECL prime GE Healthcare Amersham-Biosciences, peroxide solution + luminol enhancer solution*). Le contact de la face protéique de la membrane, à l'obscurité et à température ambiante, avec ce substrat réactionnel pendant 5 minutes est suffisant pour la révélation chimiluminescence dans une chambre noire sous rayons UV (*Syngene G:BOX Fluorescence Imaging System, logiciel GeneSys*). Le temps d'exposition varie de 30 secondes à une minute jusqu'à apparition d'un bon signal. Les bandes sont enfin repérées et les images enregistrées.

II.3. Analyse des données

Les valeurs moyennes des données obtenues sont calculées et représentées graphiquement sous Excel 2007 avec leurs barres d'erreurs. L'analyse de variances des résultats ANOVA au seuil 5% a été réalisée (*logiciel statistique R, version 3.3.3* <http://cran.r-project.org/>), suivi d'une comparaison des moyennes avec le test Tukey. Les lettres représentées dans les graphes indiquent les différences significatives entre les différents traitements.

Résultats et discussion

Résultats

1. Effet de la proline exogène sur la germination

La figure 8 représente les pourcentages de germination des deux variétés de blé dur après 7 jours de mise en germination dans les différentes conditions. En absence de stress (témoin), une tendance similaire a été observée dans le pourcentage final de germination des deux variétés et qui est de l'ordre de 97,14 %. Ces observations reflètent la bonne qualité des semences utilisées et indiquent que les variétés MBB et HD3 présentent une bonne capacité de germination.

Cependant, un effet hautement significatif ($p < 0,001$) du stress salin à 10g/l de NaCl a été enregistré sur le pourcentage de germination des graines. En effet, les données montrent que le stress salin a réduit le pourcentage de germination d'environ 19,29 % pour la variété MBB et 15,71 % pour la variété HD3 par rapport au témoin. En revanche, l'application exogène de proline a augmenté de manière significative le pourcentage de germination des graines soumises aux conditions de stress salin atteignant 88,57 % et 89,29 % de germination pour les variétés MBB et HD3 respectivement (figure 11).

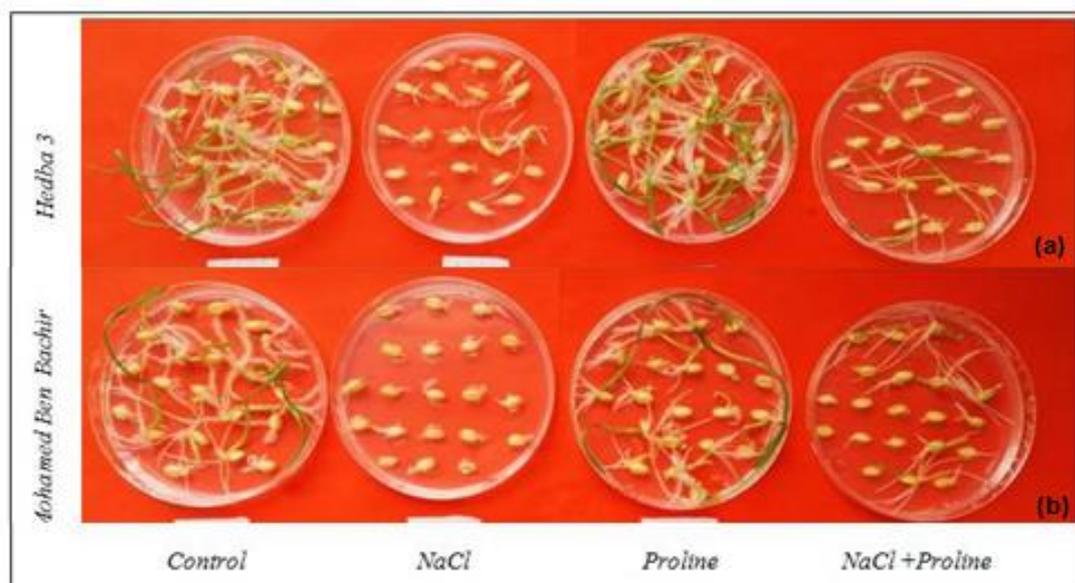


Figure 9. Effet de la proline exogène sur la germination des graines de deux variétés de blé dur sous stress salin. a) *Hedba3* et b) *Mohamed Ben Bachir*.

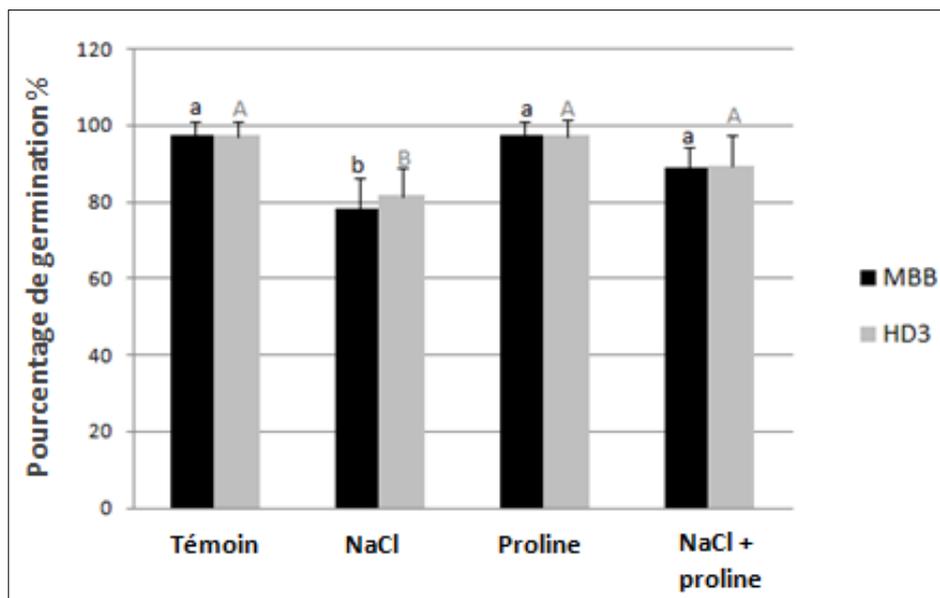


Figure 10. Effet de l'application exogène de proline sur le pourcentage de germination de deux variétés de blé dur MBB et HD3 sous stress salin.

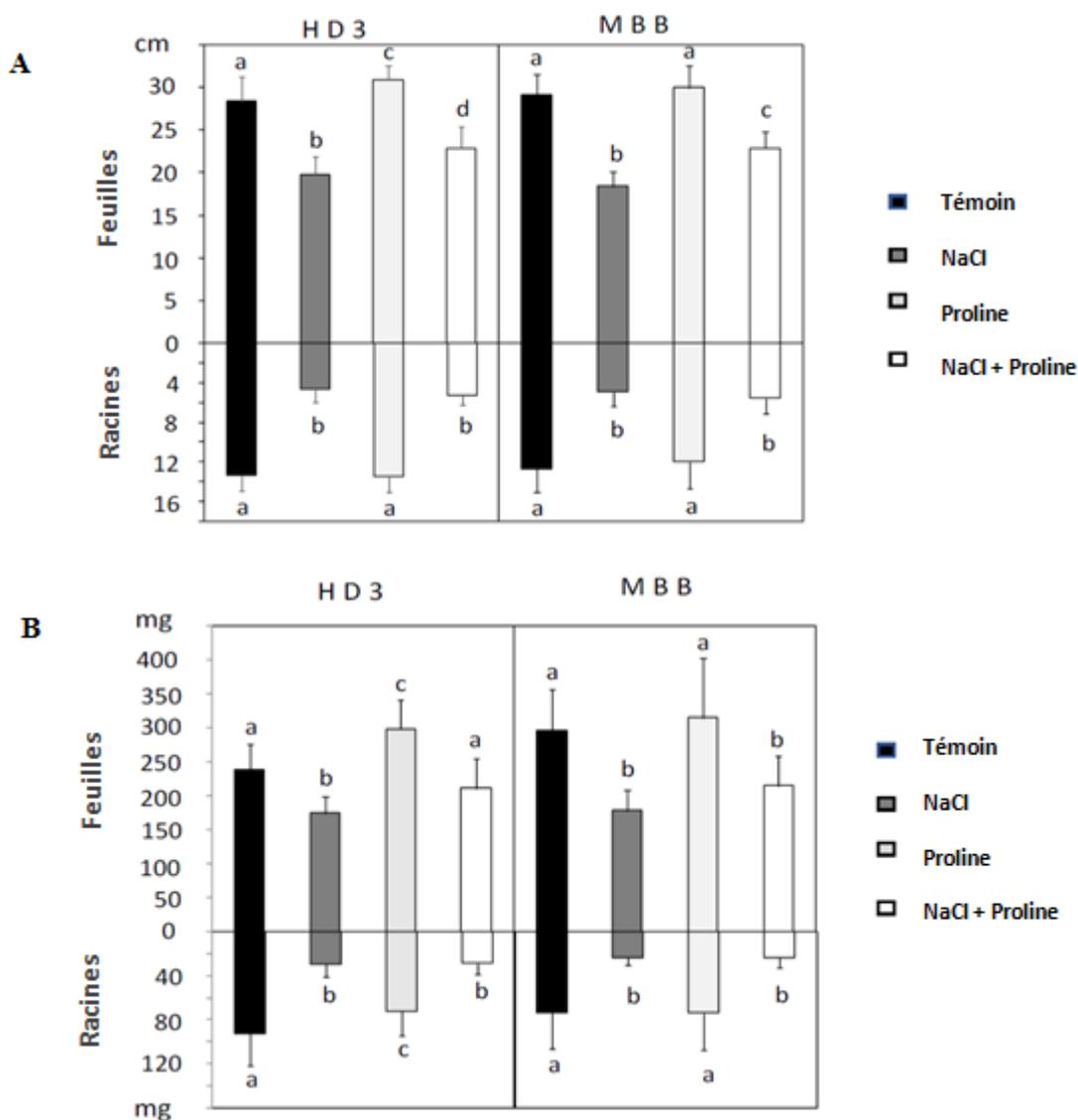
2. Effet de la proline sur les réponses morphologiques

La croissance des plantes a été évaluée en mesurant la longueur des feuilles et des racines ainsi que le poids de matière fraîche et le poids de matière sèche de jeunes plantes entières (Figure 12. 4A-C ; figure 2 annxe 1).

En l'absence de stress salin, la proline a stimulé la croissance de la variété HD3 avec une augmentation du poids de matière sèche de 24% dans les feuilles et de 14% dans les racines (Figure 12. 4A-C). La stimulation de la croissance par la proline est négligeable chez MBB.

Chez les deux variétés, les résultats obtenus ont montré que le NaCl a eu un impact négatif sur la croissance des feuilles et des racines par rapport aux témoins non traités (Figure 12. 4A-C). L'observation de la morphologie externe des extrémités racinaires a révélé que cette morphologie chez les racines stressées par le sel est altérée près de la zone du méristème et de l'extrémité de la racine (Figure 13). La croissance des organes est différemment inhibée en conditions du stress salin, les racines des deux variétés ont été sensibles de façon similaire au stress avec des diminutions du poids de matière sèche de 53% pour MBB et 57% pour HD3. Cependant, les feuilles du MBB sont plus sensibles au NaCl avec une réduction de 32 % de leur poids de matière sèche contre 21% pour les feuilles de la variété HD3 (Tableau 5).

La présence de la proline en conditions du stress salin a un effet bénéfique sur la croissance qui est partiellement restaurée chez les deux variétés de blé dur étudiées (Figure 12. 4a-c). Toutefois les variétés ont réagi différemment. En effet, la proline a réduit les effets inhibiteurs du stress salin sur la croissance racinaire de 39 % chez HD3 et de 9 % chez MBB, et sur la croissance des feuilles de 5 % chez HD3 et de 16 % chez MBB. Alors que la proline peut partiellement atténuer les effets négatifs du stress salin chez le blé dur, les feuilles et les racines de chaque cultivar ont des sensibilités différentes vis-à-vis du sel et de la proline.



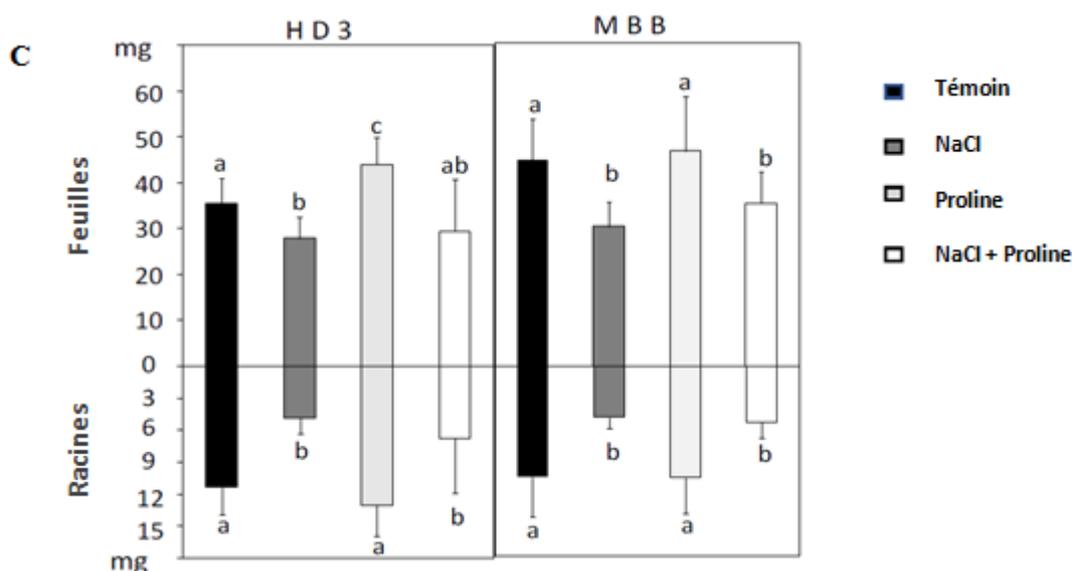


Figure 11. Effet du sel et de la proline sur la croissance des plantules de blé dur (variété HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

A. la croissance en longueur, **B.** le poids de matière fraîche, **C.** le poids de matière sèche. Les données sont des moyennes de $n = 12$ plantes, les barres d'erreur indiquent les erreurs standard. Les barres marquées de lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$) dans le test de Tukey de l'ANOVA.

Tableau 5. Pourcentage de l'indice de sensibilité chez les deux variétés

NaCl / Témoin	Indice de sensibilité (%)	
	Feuilles	Racines
HD3	-21.26	-57.57
MBB	-32.04	-53.87

Proline/ Témoin	Indice de sensibilité (%)	
	Feuilles	Racines
HD3	24.12	14.42
MBB	4.59	0.71

NaCl + Proline / NaCl	Indice de sensibilité (%)	
	Feuilles	Racines
HD3	5.61	39.27
MBB	16.49	9.30

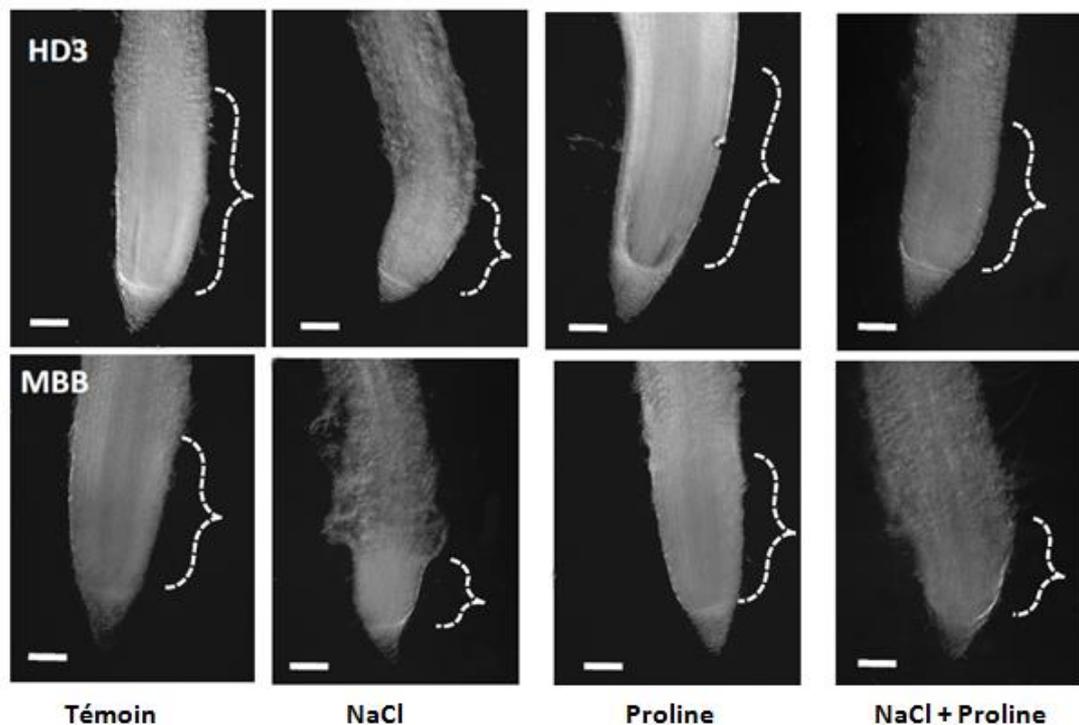


Figure 12. Effet du sel et de la proline sur les extrémités racinaires des plantules de blé dur (variété *HD3* et *MBB*) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline. (accolade représente la zone de division cellulaire ; barre = 200 μ m; photo prise par Mme Anne Guivarc'h membre de l'équipe APCE)

3. Effet de la proline sur la teneur relative hydrique

La teneur relative des feuilles en eau (TRE) est similaire chez les deux variétés en conditions témoins. Sous le stress salin, cette TRE des feuilles est significativement plus faible (81%) chez le variété MBB par comparaison au témoin (figure 12), ce qui indique que les plantules sont soumises à un stress hyperosmotique. En présence de la proline, les plantules de MBB ont maintenu leur teneur relative en eau à son niveau basal enregistré en conditions non stressantes. Ce résultat traduit l'effet améliorateur de la proline pour le statut hydrique des plantules stressées. Le pourcentage moyen de la TRE enregistré dans les feuilles des plantules cultivées en présence de NaCl + proline est de 90% contre 81% dans les plantules stressées. La TRE dans les conditions témoin est de l'ordre de 91% (figure 14). En revanche, la proline exogène n'a pas d'effet sur la TRE des plantules stressées de variété HD3. La TRE moyenne enregistrée dans les deux conditions (NaCl et NaCl + proline) est similaire et elle est de 86%. Il est à noter que le sel n'a pas impacté le statut hydrique d'HD3 par comparaison au témoin. L'effet d'atténuation de la proline sur le RWC est donc spécifique à la variété.

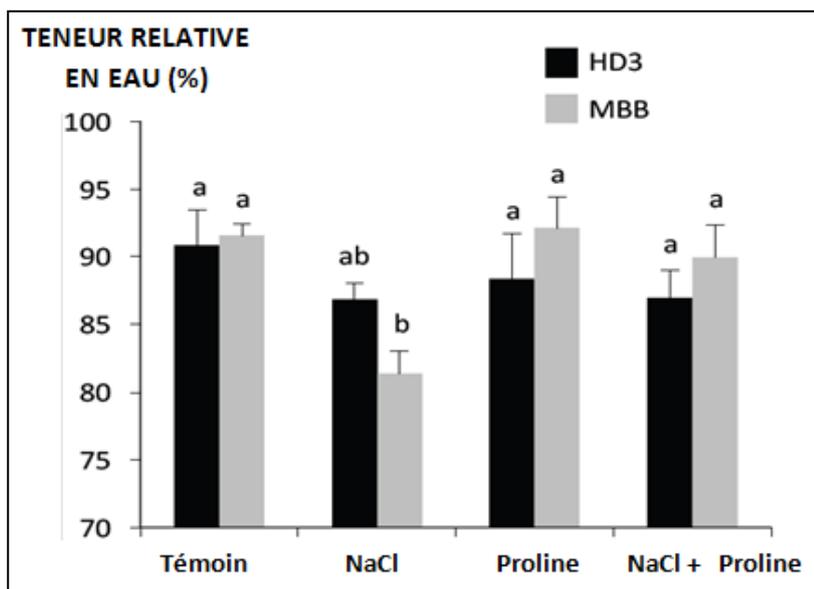


Figure 13. Effet du sel et de la proline sur la teneur relative en eau (TRE) des feuilles des plantules de blé dur (*variété HD3 et MBB*) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

4. Effet de la proline sur la teneur en pigments photosynthétiques

Les résultats montrent que le stress salin provoque une dégradation significative des chlorophylles totales dans les plantes, les valeurs moyennes dans les deux variétés HD3 et MBB, passent de 5,67 et 6,29 mg.g⁻¹ PS dans les plantules non stressées à 3,61 et 3,92 mg.g⁻¹ PS dans les plantules stressées respectivement (Figure 15). Cette diminution est liée à la réduction de la chlorophylle a et de la chlorophylle b mais en grande partie à la baisse de la chlorophylle b qui est relativement la plus affectée par le sel chez les deux variétés (figure 14). Le taux de réduction de la chlorophylle b est de l'ordre de 60,75 % chez HD3 et 55,41% chez MBB contre 30,82 % chez HD3 et 33,58 % chez MBB pour la chlorophylle a comparativement au témoin.

Par ailleurs, les plantules cultivées dans un milieu contenant du sel avec de la proline se caractérisent par des teneurs en chlorophylle a, chlorophylle b et chlorophylles totales plus élevées que celles des plantules stressées, ce qui signifie que la présence de la proline pourrait limiter l'effet réducteur du sel sur les pigments chlorophylliens des plantules exposées au stress salin. Les valeurs moyennes enregistrées en chlorophylles totales sont 4,50 mg.g⁻¹ PS chez HD3 et 4,88 mg.g⁻¹ PS chez MBB soit une augmentation de 24,65 % et 24,49 % par rapport aux plantules stressées respectivement (figure 15).

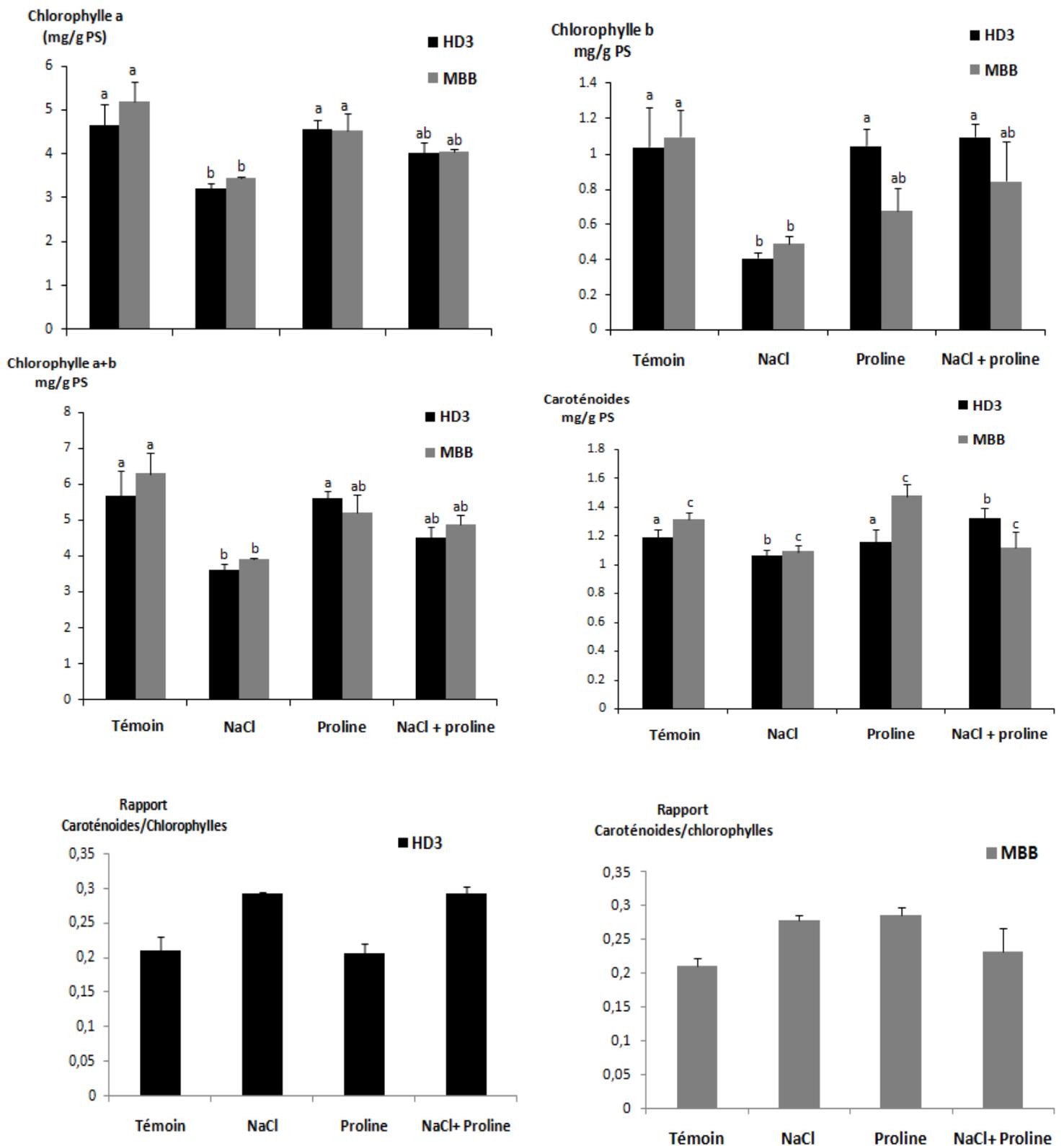


Figure 14. Effet du sel et de la proline sur la teneur en chlorophylles et caroténoïdes des plantules de blé dur (*variété HD3 et MBB*) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

Les résultats des caroténoïdes ont montré que le sel a un effet négatif sur la teneur de la variété HD3 en caroténoïdes par rapport au témoin (-10,63 %). Par ailleurs, nous constatons que l'apport en proline n'entraîne une augmentation par rapport aux plantules stressées que chez la variété HD3, l'augmentation enregistrée est de 24,55 %.

L'augmentation du rapport caroténoïdes/chlorophylles totales dans les plantules stressées explique bien l'effet négatif du sel sur la teneur en chlorophylles totales chez les deux variétés. A contrario, ce rapport diminue chez les plantules stressées en présence de la proline exogène ce qui signifie l'augmentation de la teneur des chlorophylles totales (figure 15).

5. Effet de la proline sur la teneur en protéines hydrosolubles

En se basant sur les résultats obtenus, nous constatons que la teneur des deux variétés en protéines varie négativement sous l'effet du sel par rapport au témoin. L'effet du stress salin est significatif dans les racines de la variété HD3 avec un pourcentage de diminution de 51,63%. Chez MBB, nous avons enregistré une diminution de 19,43 % de protéines dans ses feuilles. Les résultats révèlent aussi que l'apport de la proline dans les conditions salines entraîne davantage une réduction de la quantité des protéines dans les plantules stressées exception pour les racines de la variété HD3 avec une légère augmentation par comparaison aux conditions du stress. Nos résultats indiquent que l'apport de la proline dans les conditions *in vitro* du stress salin n'exerce pas d'effet bénéfique sur l'amélioration de la teneur des variétés de blé dur étudiées en protéines.

Dans les feuilles, la teneur en protéines chez HD3 passe de 24,89 à 17,09 mg.g⁻¹ PS et chez MBB elle passe de 24,59 à 20,12 mg.g⁻¹ PS alors que celle des racines passe de 15,37 à 9,03 mg.g⁻¹ PS (figure 16).

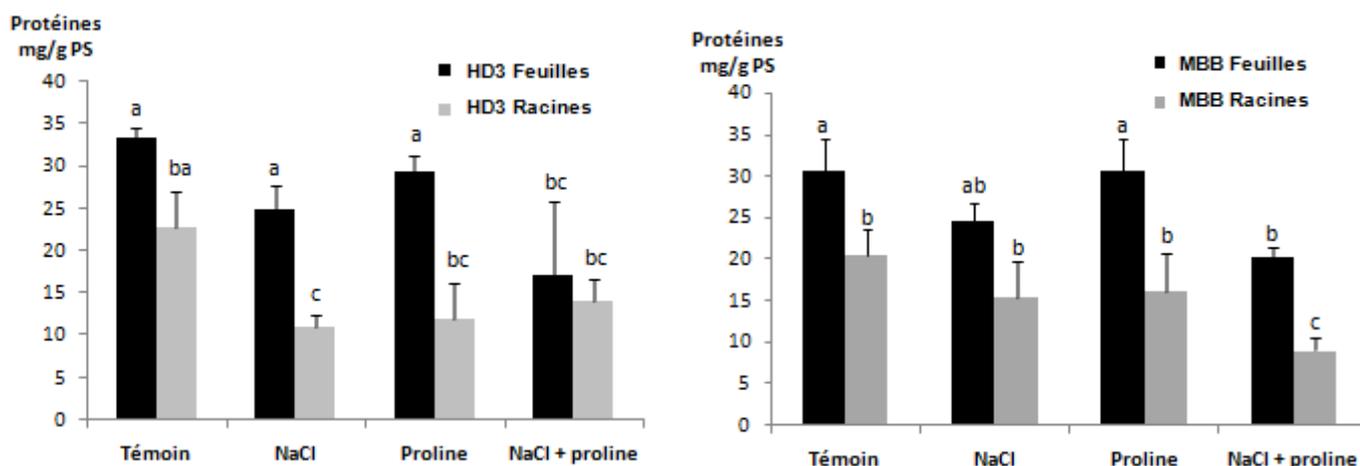


Figure 15. Effet du sel et de la proline sur la teneur en protéines des plantules de blé dur (variété HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

6. Effet de la proline sur la teneur en sucres solubles et amidon

L'analyse des résultats obtenus (figure 17) ont montré que la quantité des sucres est perturbée dans les plantules de blé dur sous l'effet du stress avec ou sans proline, et les deux variétés sont affectées différemment. Le stress NaCl a entraîné une augmentation significative des sucres solubles dans les racines de variété HD3 (+ 26,75 %) et dans les feuilles de MBB (+18,60 %) par rapport au témoin. Cette augmentation des sucres dans les feuilles de MBB dans les conditions du stress est accompagnée par une diminution de leurs teneurs en amidon. Par ailleurs, nous avons constaté une diminution de la teneur en sucres dans les racines de MBB sous la contrainte saline (- 28,95 %) et une augmentation de la teneur en amidon (figure 17). Ce qui suggère que les sucres accumulés dans les feuilles pourraient résulter de l'hydrolyse de l'amidon.

La présence de la proline dans les conditions du stress a exercé un effet réducteur sur la teneur des plantules stressées des deux variétés en sucres. Chez HD3, la proline exogène a réduit de manière significative la quantité des sucres dans les racines contrairement à la variété MBB ayant enregistré une réduction au niveau de ses feuilles par comparaison aux plantules stressées. Cette réduction de la teneur des feuilles de variété HD3 en sucres est accompagnée de l'augmentation de la concentration en amidon, suggérant que la proline exogène pourrait limiter l'utilisation des sucres dans les conditions du stress. Il est à noter que dans ces conditions (*NaCl + proline*) la quantité des sucres des deux variétés cultivés est comparable. Les valeurs de l'effet moyen de la proline sont de l'ordre de $0,716 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PS}$ dans les racines d'HD3 soit une baisse de 39,27 % comparativement aux plantules stressées. Chez MBB, elles sont de $0,668 \text{ mg.g}^{-1} \text{ PS}$ dans les feuilles soit une réduction de 10,34 % (figure 17).

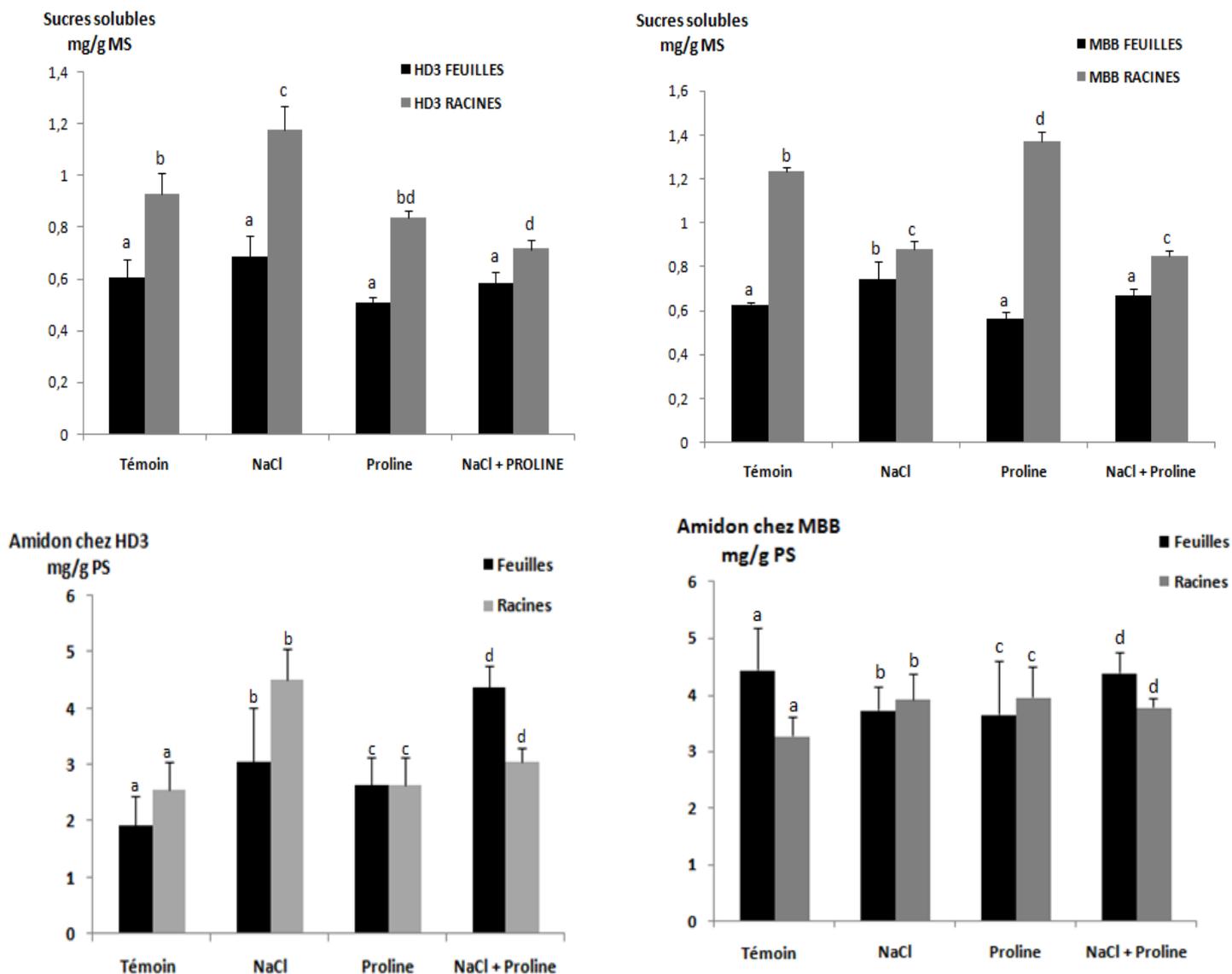


Figure 16. Effet du sel et de la proline sur la teneur en sucres et en amidon des plantules de blé dur (*variété HD3 et MBB*) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

7. Effet de la proline exogène sur la teneur du blé en proline

Dans les conditions témoins, la teneur des racines et des feuilles des deux variétés de blé dur en proline libre est semblable et allant de 33 à 36 $\mu\text{mol/g}$ poids sec (Figure 18). En réponse au stress salin, cette teneur en proline a principalement augmenté dans les feuilles, cette augmentation a triplé chez HD3 et a quadruplé chez MBB par comparaison au témoin, ce qui indique que la proline s'accumule préférentiellement dans les feuilles de blé dur sous l'effet du stress NaCl *in vitro*. Par ailleurs, l'application de la proline exogène a entraîné une accumulation de la proline à la fois dans les feuilles et les racines. La proline accumulée dans les racines de variété MBB est plus élevée que celle des racines de HD3 (244 $\mu\text{mol/g}$ PS contre 150 $\mu\text{mol/g}$ PS (Figure 18).

L'apport de la proline en conditions du stress salin a entraîné une forte augmentation de la teneur des deux variétés en proline particulièrement dans les feuilles qui ont accumulé 10 fois plus de proline que le témoin. Dans ces conditions, la proline s'est accumulée davantage dans les racines MBB (237 $\mu\text{mol/g PS}$) que dans les racines HD3 (183 $\mu\text{mol/g PS}$).

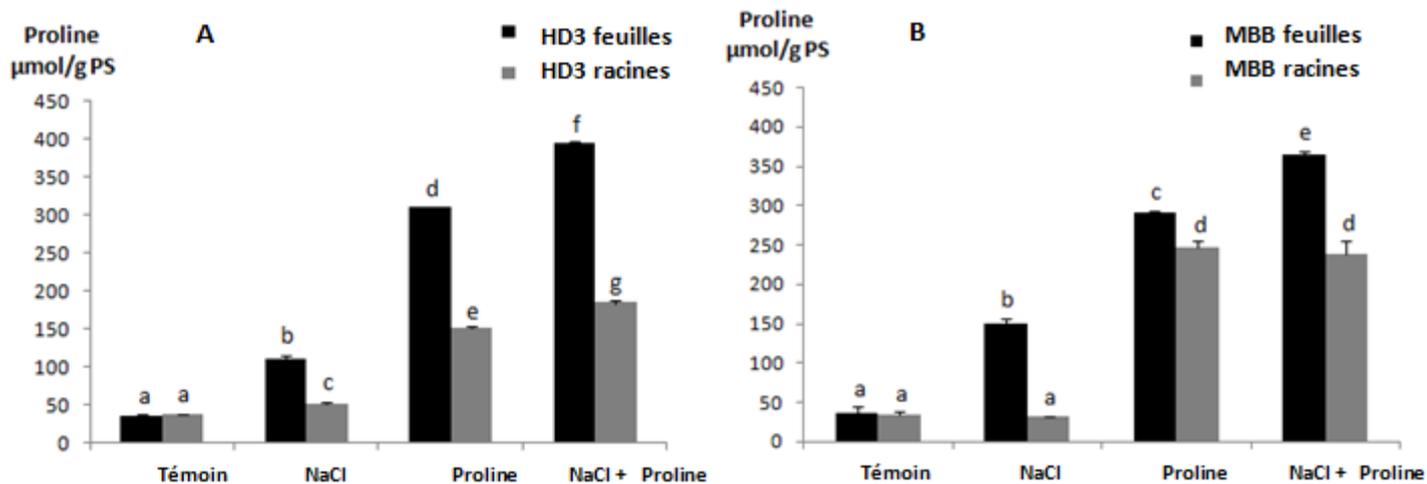


Figure 17. Effet du sel et de la proline sur l'accumulation de la proline dans les plantules de blé dur (variété HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline. A. *accumulation de la proline dans les feuilles et racines de variété HD3*, B. *Accumulation de la proline dans les feuilles et racines de variété MBB*. Les données sont des moyennes de $n = 12$ plantes, les barres d'erreur indiquent les erreurs standard. Les barres marquées de lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes ($p < 0,05$) dans le test de Tukey de l'ANOVA.

8. Effet de la proline sur la teneur du blé en sodium et potassium

Les résultats du dosage ionique ont révélé que la teneur des plantules de blé dur témoins en sodium avec ou sans proline exogène est très faible et elle ne dépasse pas 15 $\mu\text{mol/g PS}$. Par ailleurs, l'effet du stress NaCl est considérable. En effet, une forte accumulation des ions sodium a été enregistrée dans les feuilles des plantules stressées comparativement aux témoins qui est 100 fois plus élevée que chez les plantules témoins (plus de 1100 $\mu\text{mol/g PS}$) ; cependant, le sodium est distribué différemment dans les deux variétés de blé. Chez HD3, la teneur en sodium dans ses feuilles est relativement comparable avec celle des racines alors que chez le variété MBB le sodium accumulé dans les feuilles est plus élevé (1181 $\mu\text{mol/g PS}$ contre 594 $\mu\text{mol/g Ps}$) (figure 19). En revanche, l'apport de la proline en conditions du stress a entraîné une diminution de 50 % du sodium dans les feuilles de la variété MBB

contrairement aux racines qui ont enregistré une augmentation de 30% du sodium par comparaison aux plantules stressées non traitées (figure 19). Ces résultats suggèrent que l'accumulation du sodium chez la variété MBB est sensible à la proline mais pas chez la variété HD3.

Pour le potassium, les résultats du dosage ont montré que les variétés HD3 et MBB témoins contiennent 712 et 987 $\mu\text{mol/g}$ PS de potassium respectivement. La présence de la proline dans les conditions témoins a entraîné une importante augmentation dans la teneur des feuilles des plantules HD3 et MBB en cations potassium et qui est de l'ordre de 976 et 1887 $\mu\text{mol/g}$ PS respectivement (Figure 20).

Toutefois, le niveau du potassium enregistré sous l'effet du stress salin est différent selon l'organe et la variété. Chez MBB, le stress salin a provoqué une réduction de 37% de la teneur des feuilles en potassium contrairement la variété HD3 chez laquelle aucun changement n'a été observé. Quant aux racines, les niveaux du potassium enregistrés sont plus affectés par le stress salin, elles contiennent 55 - 69% moins de potassium que les témoins. L'apport de la proline a légèrement modulé la teneur des racines en potassium (Figure 20).

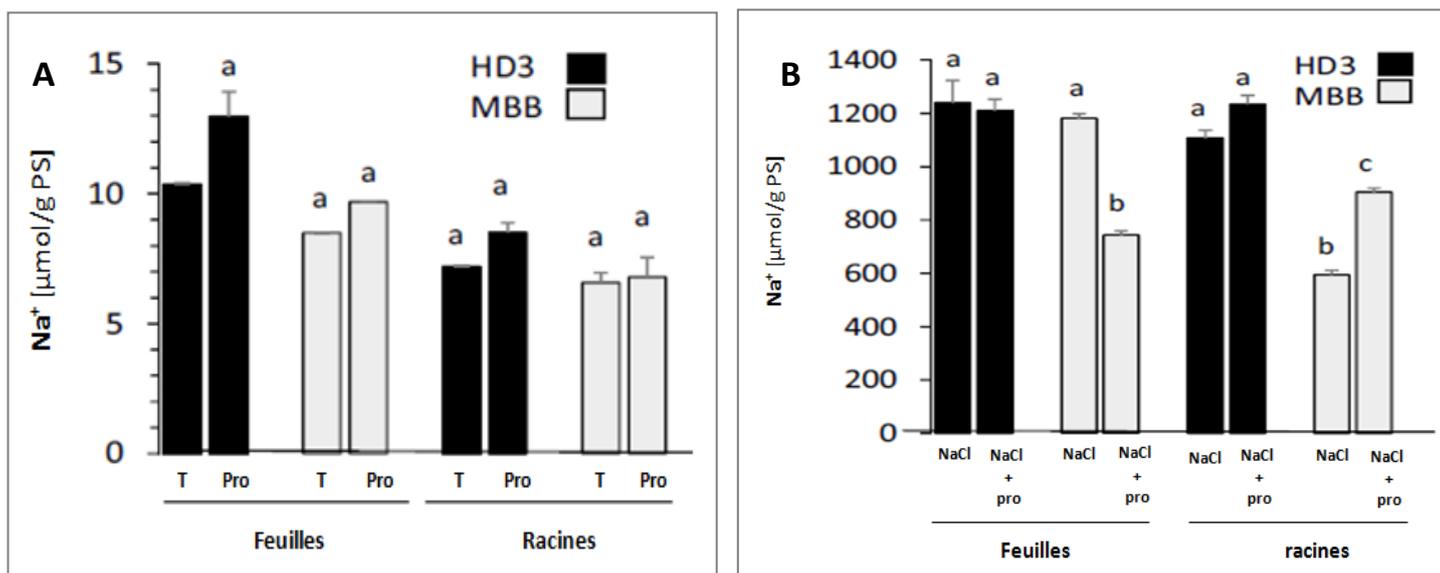


Figure 18. Effet du sel et de la proline sur la teneur en sodium des plantules de blé dur (variétés HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

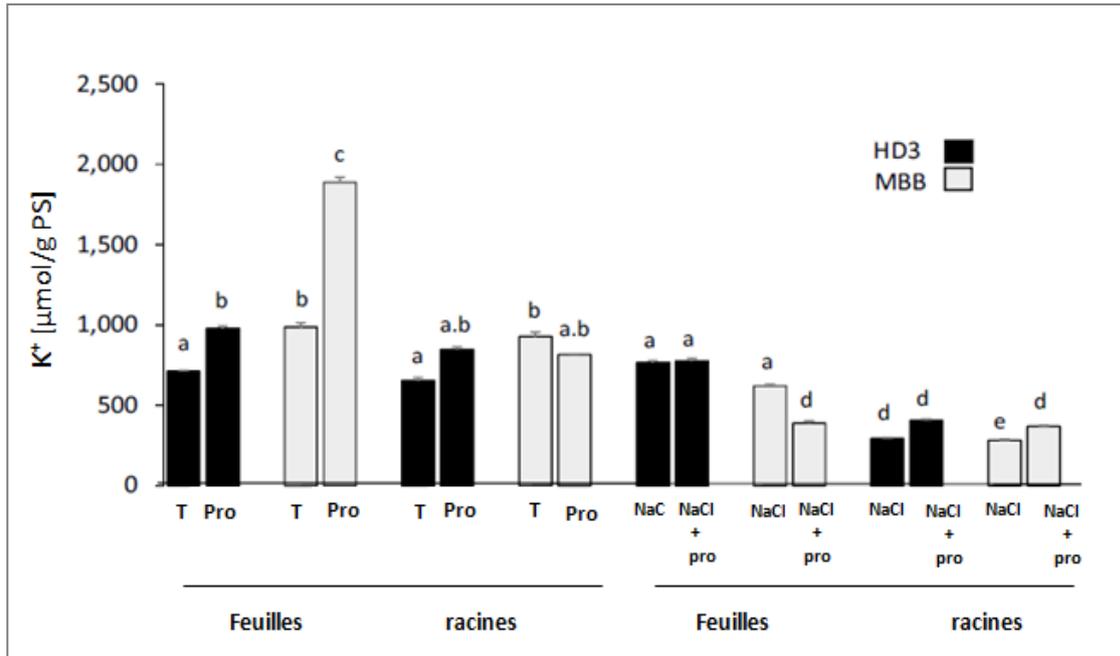


Figure 19. Effet du sel et de la proline sur la teneur en potassium des plantules de blé dur (variétés *HD3* et *MBB*) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

Le ratio K^+/Na^+ est un indicateur de la tolérance des variétés de blé dur à la salinité. Nous avons constaté que les ratios K^+/Na^+ des deux variétés du blé sont différents dans les plantules témoins, ce ratio est plus faible dans les racines et les feuilles de la variété *HD3* que *MBB*. En conditions du stress, ces ratios sont 100 plus faibles dans les plantules stressées par comparaison au témoin. L'application de la proline en conditions salines n'a pas amélioré de manière significative le ratio K^+/Na^+ (figure 21).

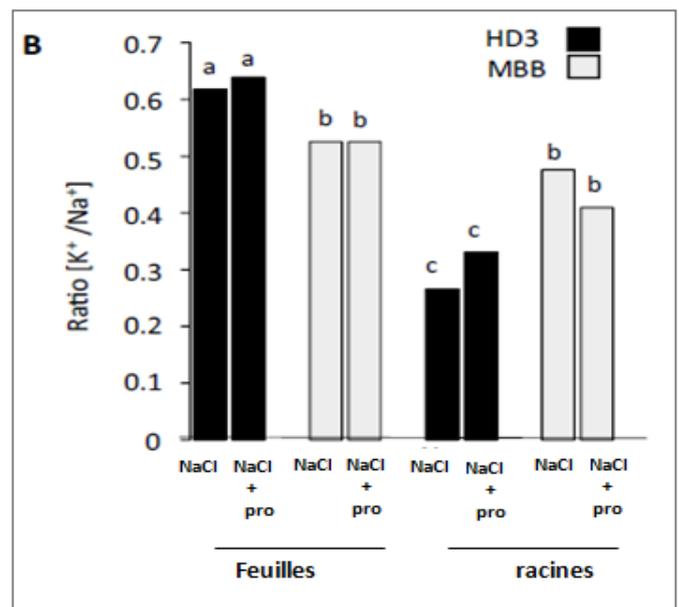
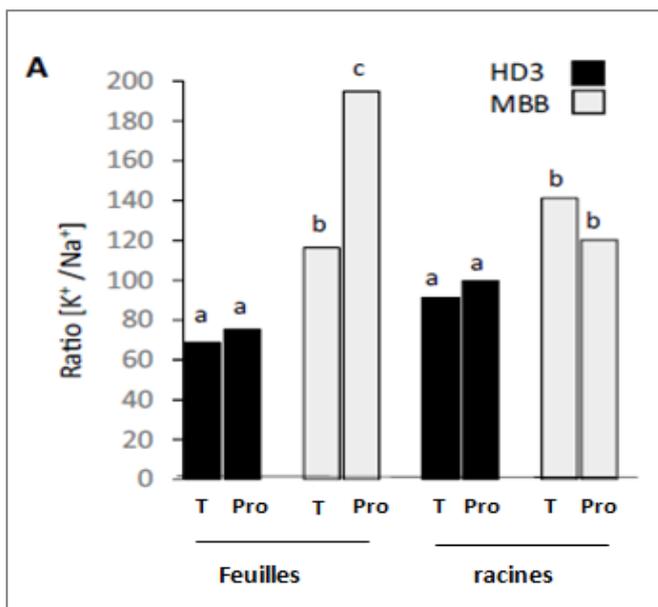


Figure 20. Le ratio K^+/Na^+ des plantules deux variétés blé dur cultivées in vitro pendant 10 jours dans sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline. A. conditions témoin et proline ; B. conditions NaCl et NaCl + proline

9. Effet de la proline sur le degré de la peroxydation lipidique

La teneur des plantules stressées en malondialdéhyde (MDA) a augmenté dans la variété MBB mais pas dans la variété HD3 comparativement aux plantules témoins (figure 22).

Cette augmentation de MDA indique la peroxydation des lipides membranaires provoquée par 10 g.l^{-1} du NaCl. La présence de la proline dans les conditions du stress a maintenu le niveau de MDA qui est égal à celui des plantules témoins des deux variétés (figure 22). La fuite d'ions des tissus foliaires est une mesure de l'intégrité de la membrane qui est affectée par les stress oxydatifs et la peroxydation des lipides. Les analyses des résultats ont montré que le stress salin a provoqué l'augmentation de la fuite d'ions chez les deux variétés. Les pourcentages des fuites membranaires ont augmenté de 110% chez HD3 et 97% MBB par rapport au témoin (figure 23) traduisant ainsi l'augmentation du degré de la peroxydation des lipides membranaires. Par ailleurs, la proline exogène a un effet réducteur sur la fuite relative d'électrolytes dans les feuilles des 2 variétés en conditions du stress salin.

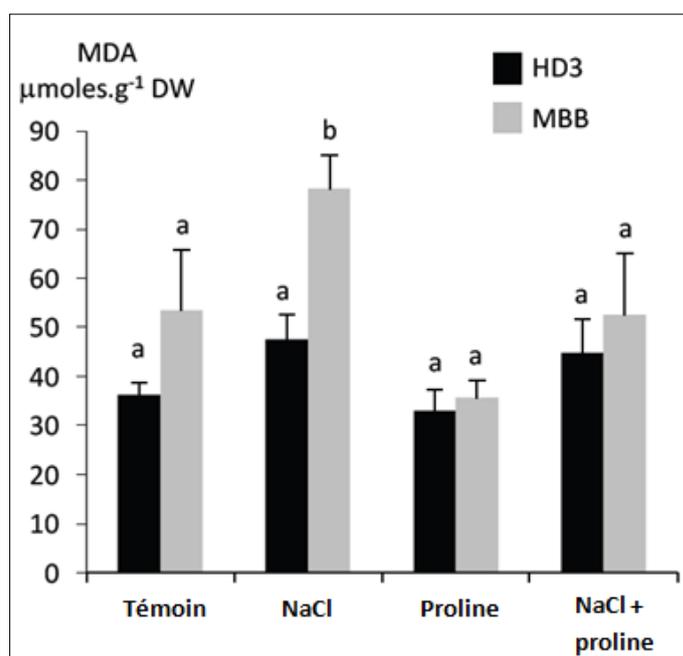


Figure 21. Effet du sel et de la proline sur la teneur en malondyaldéhyde des plantules de blé dur (variétés HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline

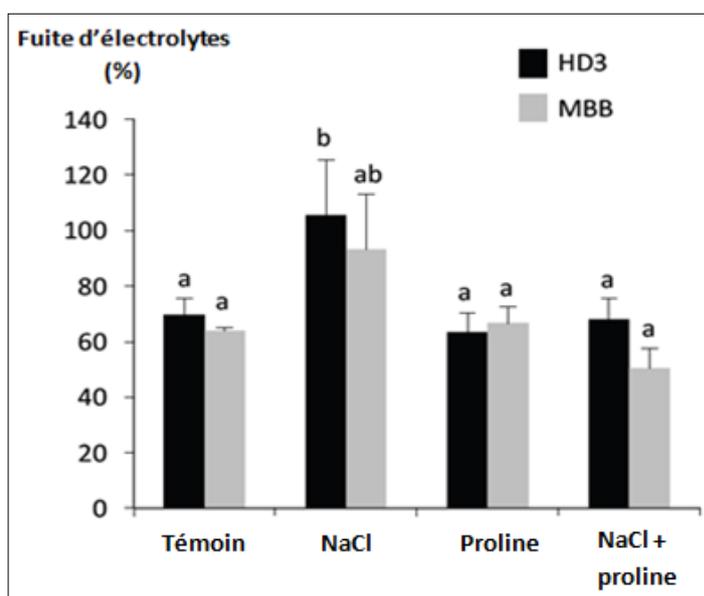


Figure 22. Effet du sel et de la proline sur la fuite d'ions des plantules de blé dur (*variétés HD3 et MBB*) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline

10. Effet de la proline sur l'activité antioxydante superoxyde dismutase

D'après les résultats obtenus, nous constatons que le stress salin a induit une augmentation de l'activité enzymatique dismutase (SOD) chez le blé dur mais différemment chez les deux variétés étudiées. Chez la variété HD3, l'activité enzymatique SOD des plantules stressées est plus élevée que celle de la variété MBB, dépassant les 40 UA contre 20 UA chez MBB. Par comparaison aux plantules HD3 témoins, cette activité est multipliée par trois en conditions du stress salin. La présence de la proline dans les conditions du stress a considérablement augmenté l'activité SOD chez la variété HD3 jusqu'à atteindre 60 UA soit une augmentation de 4 fois plus que le témoin.

Chez la variété MBB, l'activité basique de la SOD est plus faible que celle enregistrée dans les plantules HD3, elle a doublé sous l'effet du stress salin. En revanche en présence de la proline exogène dans les conditions du stress, cette activité SOD est maintenue à son niveau basique par comparaison aux plantules témoins (20 unité d'activité de la SOD) (figure 24). La proline a donc des effets différents sur l'activité antioxydante de MBB et HD3 sous le stress salin.

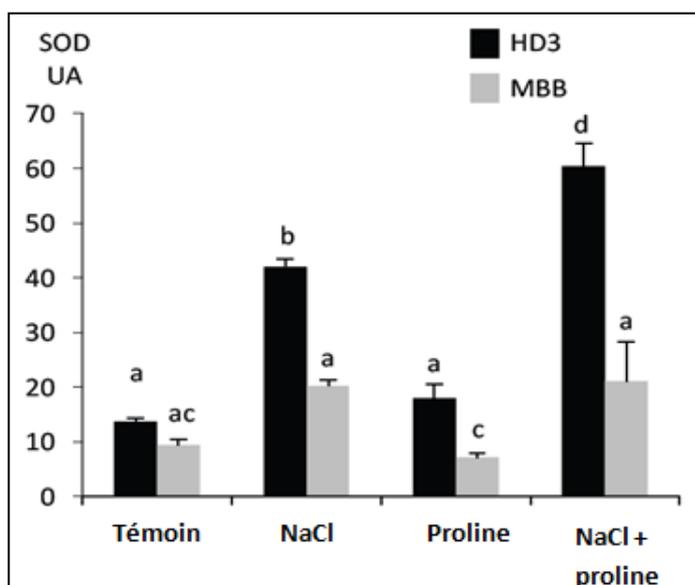


Figure 23. Effet du sel et de la proline sur l'activité superoxyde dismutase (SOD) des plantules de blé dur (variétés HD3 et MBB) cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline.

11. Effet de la proline sur l'expression génique

11.1. Expression du marqueur du stress

L'analyse par RT-PCR de l'expression du gène de blé dur déhydrine TdDHN15.3 (*abrégié ici en DHN*), un gène connu pour sa sensibilité au stress hydrique et au stress salin, nous a permis d'évaluer l'effet de la proline et du stress salin sur son expression dans les feuilles et les racines des deux variétés HD3 et MBB. Les résultats obtenus ont montré l'augmentation des transcrits du gène DHN dans les feuilles et les racines des deux variétés HD3 et MBB exposées à un stress salin de 4 heures et de 8 heures et la transcription est plus élevée jusqu'à 10 jours du stress comparativement au témoin (figure 25). En présence de la proline dans les conditions du stress salin, l'accumulation des transcrits de DHN est stimulée dans les racines notamment chez la variété MBB mais dans les feuilles les transcrits augmentent moins. En absence du stress, la proline n'a pas d'effet sur l'expression de la déhydrine dans les racines (figure 25). Pour les plantules exposées au stress NaCl pendant 10 jours, nous avons observé une accumulation des transcrits de DHN. L'effet de la proline exogène sur l'effet négatif du sel vis-à-vis de l'accumulation de la déhydrine est observé après 10 jours dans les feuilles de la variété MBB et HD3. Chez MBB, la proline seule a légèrement modifié l'accumulation des transcrits de la déhydrine dans les feuilles après 10 jours.

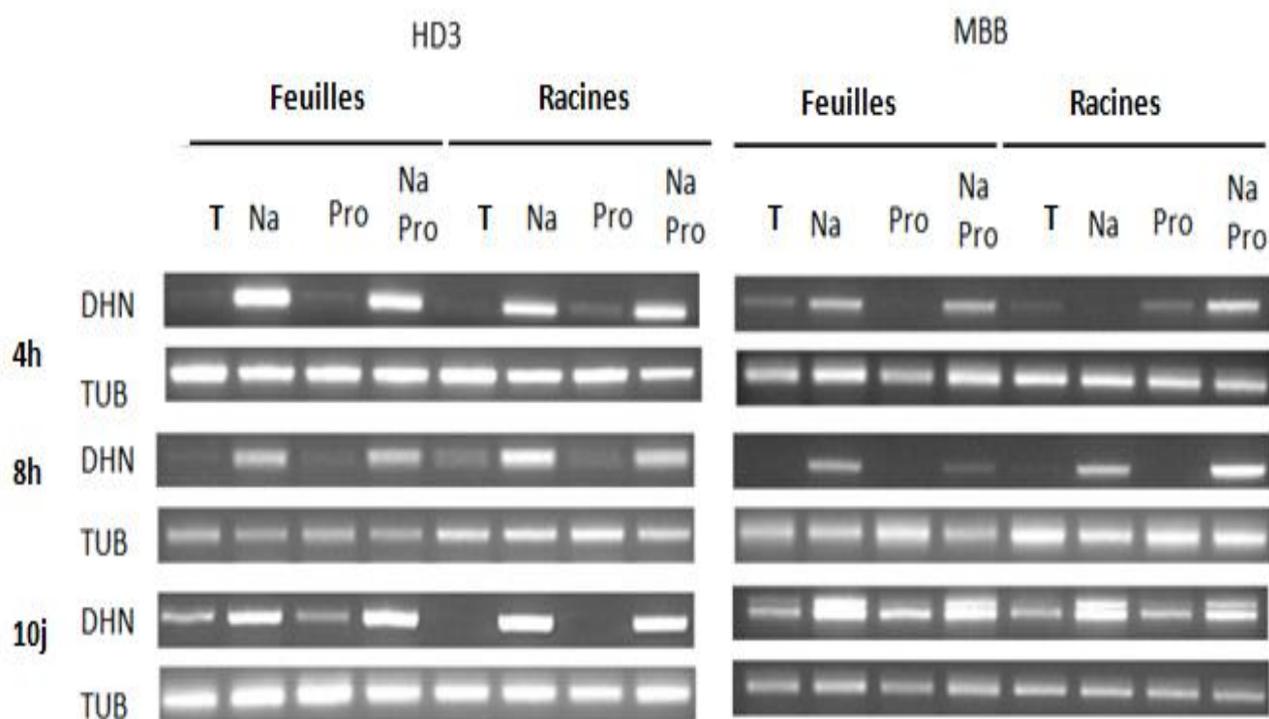


Figure 24. Effet du sel et de la proline sur l'expression du gène du stress déhydrine (DHN) des plantules de blé dur (variétés HD3 et MBB) cultivées sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline. (*T* = témoin, *Na* = NaCl, *Pro* = proline, *Na+Pro* = NaCl + proline).

11.2. Effet du stress salin et de la proline sur l'expression des gènes candidats de la biosynthèse de la proline

Il a été démontré antérieurement que la proline s'accumule dans les conditions stressantes et que les gènes impliqués dans sa biosynthèse et son catabolisme sont régulés dans les plantes exposées au stress salin. Dans la présente étude, l'analyse par RT-PCR a montré que l'expression du premier gène responsable de la biosynthèse de la proline P5CS est positivement régulée par le stress après 8 heures dans les feuilles des deux variétés. Dans les racines, l'expression du gène P5CS est moins modulée par le stress mais le niveau basal de l'expression est plus élevé dans les racines que dans les feuilles. Sous l'effet du stress NaCl et de la proline, l'accumulation des transcrits de P5CS est plus faible dans les feuilles HD3 et les racines MBB. Après 10 jours de stress salin, l'expression de P5CS diminue jusqu'à son niveau enregistré dans les plantules témoin, exception pour les racines MBB où elle augmente sous l'effet du sel et diminue sous l'effet du sel et de la proline (Figure 26).

Par ailleurs, le gène codant pour la P5CR deuxième enzyme impliquée dans la biosynthèse de la proline montre une expression plus élevée dans les conditions normales ; cette expression n'est pas régulée par le stress salin dans les deux variétés. Quant au catabolisme, les niveaux des transcrits du gène PDH sont diminués dans les racines par le stress salin d'une courte période mais cet effet n'a pas été observé en présence de la proline notamment chez la variété MBB. L'expression du gène PDH est légèrement régulée à la hausse en présence de la proline seule plus particulièrement dans les feuilles HD3 après 10 jours de culture en présence de la proline (figure 26). Dans l'ensemble, nous constatons que le stress salin peut augmenter transitoirement l'expression du gène de biosynthèse de la proline P5CS et réprimer l'expression de son gène de dégradation PRODH. Cependant les variétés de blé dur étudiées régulent différemment ces gènes (figure 26).

De manière intéressante, les résultats de western blotting à partir d'extraits de protéines totales en utilisant les anticorps anti-ProDH ont clairement révélé une bande distincte vers 57kDa dans l'extrait protéique mitochondriale des feuilles et des racines des deux variétés qui pourrait correspondre à la protéine PDH (figure 27) ; ce qui confirme que le gène PDH a été exprimé et qu'il y a eu la synthèse de la protéine correspondante dans nos plantules. La présence de cette protéine est détectée dans les 4 conditions de culture. Nous notons toutefois la différence d'intensité du signal entre les différents traitements et les organes. Les bandes sont relativement plus intenses dans les conditions témoins des deux variétés, exception pour les racines MBB. La bande suggérée comme étant la PDH voit son intensité faiblement modifiée chez les plantes exposées au stress appliqué seule ou en présence de la proline. Par ailleurs, l'analyse de l'expression génique a montré que la PDH est régulée à la hausse par la proline. Chez MBB, nous remarquons un meilleur contraste de la bande à 57kD dans les racines notamment en présence de la proline exogène en conditions salines (NaCl + Proline) (figure 27). Cette observation est en corrélation avec le résultat de l'expression génique qui montre la régulation positive de la PRODH par la proline exogène dans les racines en conditions de stress. En dessus, une bande très rapprochée qui apparaît au poids moléculaire attendu dans les feuilles et les racines de blé correspond probablement à l'isoforme de la protéine.

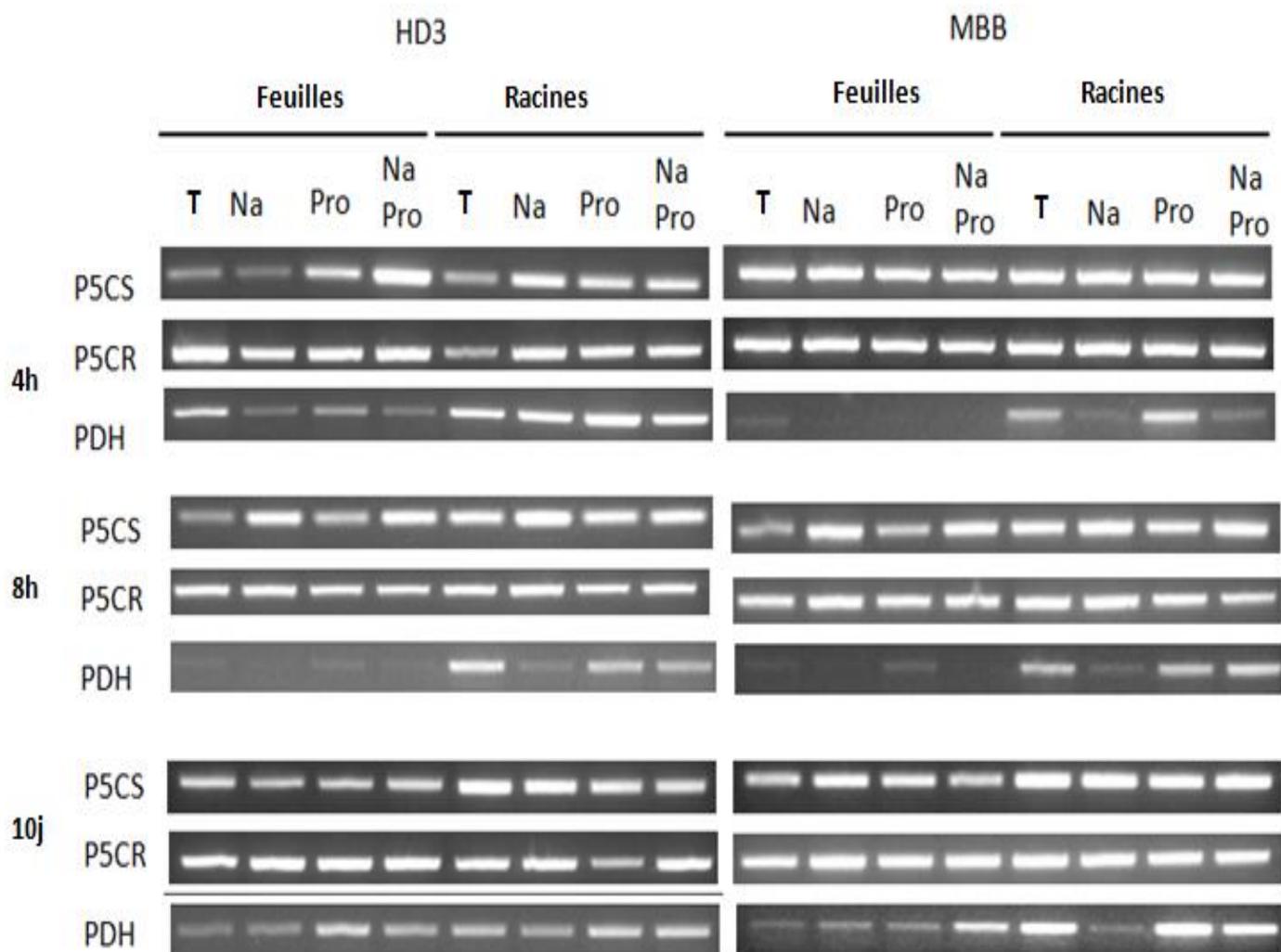


Figure 25. Effet du sel et de la proline sur l'expression des gènes de biosynthèse et du catabolisme de la proline (PCS et PDH) des plantules de blé dur (variétés HD3 et MBB) cultivées sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline. (*T*= témoin, *Na* = NaCl, *Pro* = proline, *Na+Pro* = NaCl + proline).

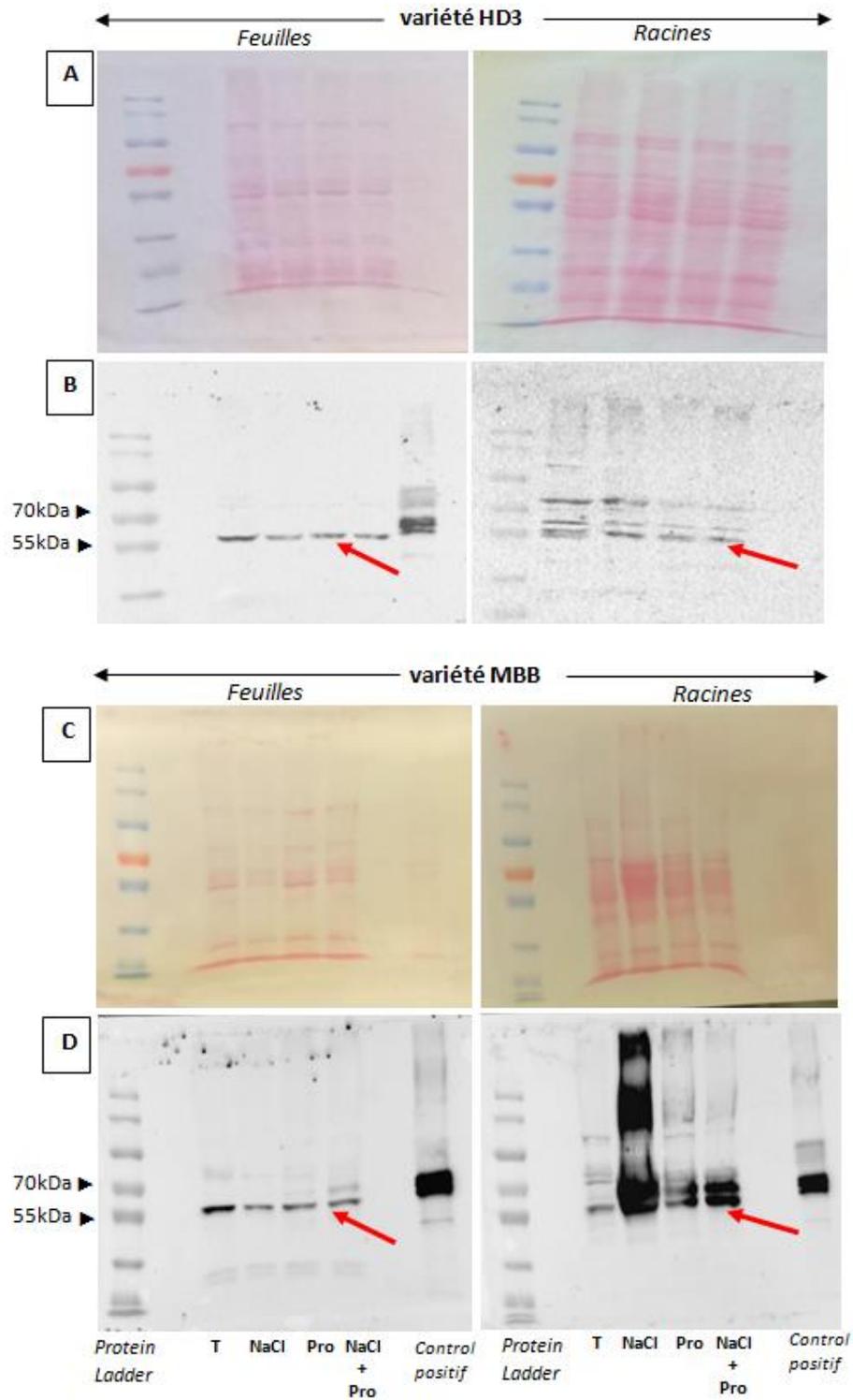


Figure 26. Détection immunologique par Western blotting de la protéine Prodh dans les plantules de blé HD3 et MBB dans nos conditions. (A) et (C) coloration au rouge ponceau; (B) et (D) hybridation western blotting.

Les résultats d'oxygraphie enregistrés à l'aide de l'électrode à oxygène ont révélé une consommation d'oxygène par les mitochondries brutes des feuilles et des racines de nos plantules de blé dur (figure 28), ce qui signifie que les mitochondries brutes de blé dur extraites pour la première fois dans notre laboratoire sont intactes et fonctionnelles et qu'une respiration mitochondriale a eu lieu dans nos conditions en présence des substrats respiratoires utilisés (succinate + NADH et de la proline) avec l'ajout des inhibiteurs. La figure suivante est un exemple d'enregistrement de la consommation d'oxygène (nmoles/s) dans les mitochondries extraites des racines de variété HD3 traitées à la proline en fonction du temps (secondes). Nous avons observé que la consommation d'oxygène dans les suspensions mitochondriales a accéléré en ajoutant le substrat succinate/NADH et l'ADP (état 3) qui sont nécessaires au bon fonctionnement de l'activité respiratoire totale notamment par la voie cytochrome C. Cette consommation d'oxygène a été ralentie en raison de l'épuisement de l'ADP dans le milieu réactionnel suite à sa conversion en ATP (état 4). De plus, elle a été arrêtée sous l'action de l'inhibiteur de la chaîne respiratoire (SHAM) par comparaison aux racines témoins montrant une régression linéaire continue de la consommation d'O₂ même avec l'addition de l'inhibiteur (figure 28). Nous suggérons que dans les racines traitées avec la proline, les électrons libérés par la réaction d'oxydation de la proline en P5C sous l'effet de l'enzyme PDH sont transférés vers la chaîne respiratoire de la membrane mitochondriale avant la réduction des molécules d'O₂ présentes dans la cuve de mesure. Ce résultat confirme la compartimentation des voies métaboliques de la proline notamment sa dégradation qui se situe au niveau des mitochondries. Par ailleurs, les résultats obtenus représentatifs de deux répétitions n'ont pas révélé une amélioration de l'activité respiratoire des mitochondries en utilisant la proline comme substrat dans nos conditions expérimentales. Cela est expliqué par le fait que le protocole d'Arabidopsis ne permet pas d'optimiser cette activité chez le blé dur et nécessite une préalable mise au point notamment la concentration des substrats mitochondriaux.

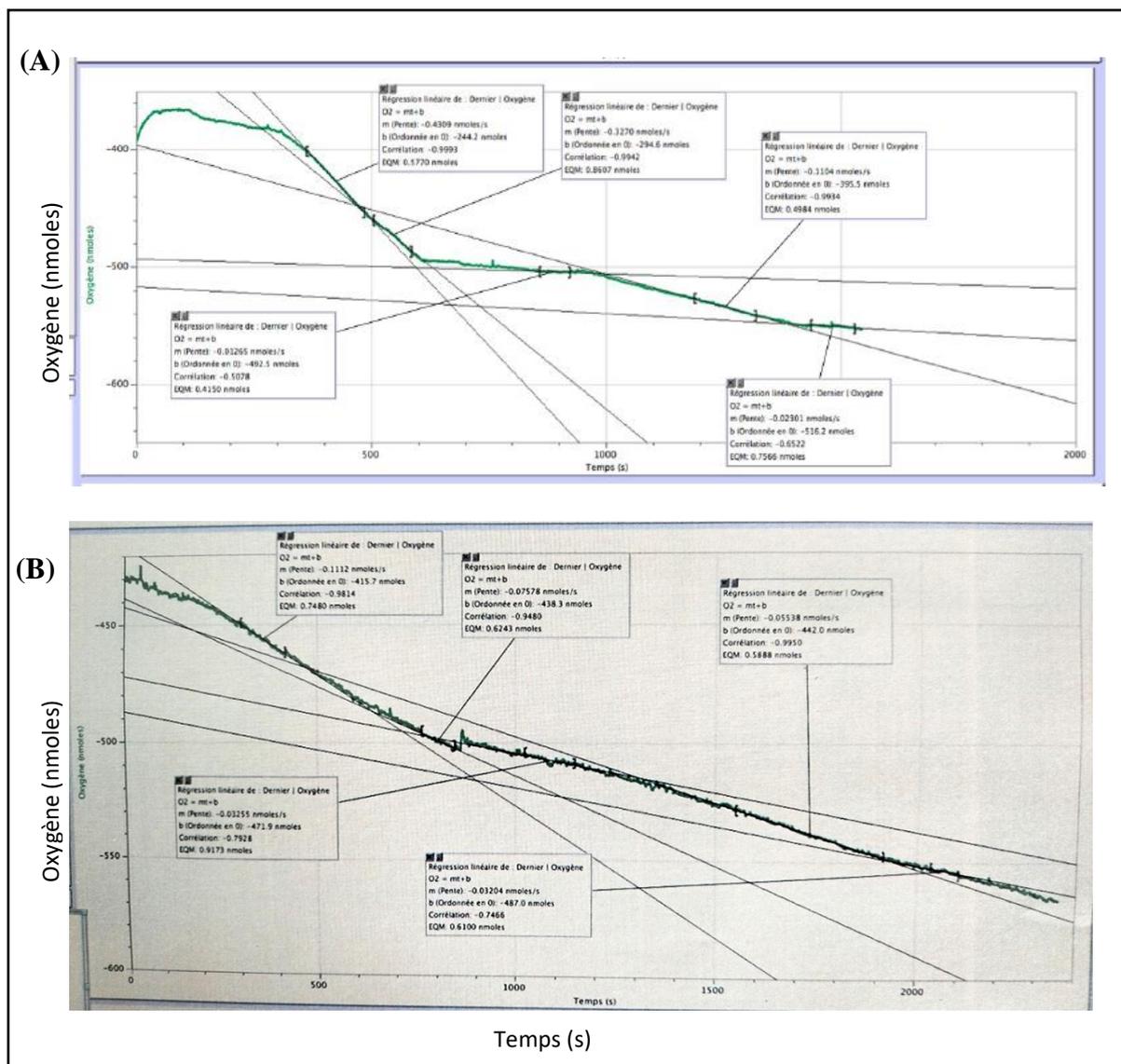


Figure 27. Exemple de la consommation d’oxygène enregistrée dans les mitochondries brutes des racines de variété HD3 à l’aide l’élèctrode Clark en présence du substrat Succinate +NADH. (A) mitochondries brutes des racines de plantules HD3 traitées avec de la proline. (B) mitochondries brutes des racines de plantules HD3 témoin.

11.3. Expression de gènes candidats des transporteurs de Na⁺ (transporteurs HKT)

Nous avons testé chez le blé dur l’expression des gènes associés aux locus candidats des transporteurs du sodium Nax1 et Nax2 qui sont impliqués dans la tolérance des plantes au sel. Nous avons comparé l’expression relative des gènes de la famille HKT (*High-K⁺-Transporters*) à savoir HKT1;4-1, HKT1;4-2 et HKT1;5 (HKT8) chez les deux variétés de blé dur. Les résultats obtenus ont montré que le gène HKT1;4-1 est faiblement exprimé dans les racines des plantules témoins et il est négativement régulé par le stress salin à partir de 4

heures de stress (Figure 29). Par ailleurs, le gène HKT1;4-2 est exprimé principalement dans les feuilles où il a été induit par le stress salin chez les deux variétés de blé dur à partir de 4 heures de traitement. Chez la variété MBB, une faible induction de l'expression du gène HKT1;4-2 est également observée dans les racines (figure 29). Cette différence d'expression entre les feuilles et les racines suggère que les transporteurs codés par les gènes HKT1;4-1 et -2 ont une régulation spécifique aux organes et donc des rôles différents. Bien que la régulation des gènes HKT1;4 a été observée après quelques heures d'application du stress salin, les feuilles et les racines exposées plus longuement au stress n'ont pas maintenu les mêmes niveaux de régulation. La proline exogène a interféré avec l'expression du gène HKT1;4-2 dans les feuilles de la variété HD3 après 8 heures en absence du stress et après 10 jours de stress salin.

En ce qui concerne le gène HKT1;5, les profils d'expression montrent qu'il est absent dans les feuilles des deux variétés mais détectable dans leurs racines. Il semble être positivement régulé par le sel et par la proline, cependant les niveaux des transcrits obtenus ne nous permettent pas de trancher sur sa régulation dans nos conditions (figure 29).

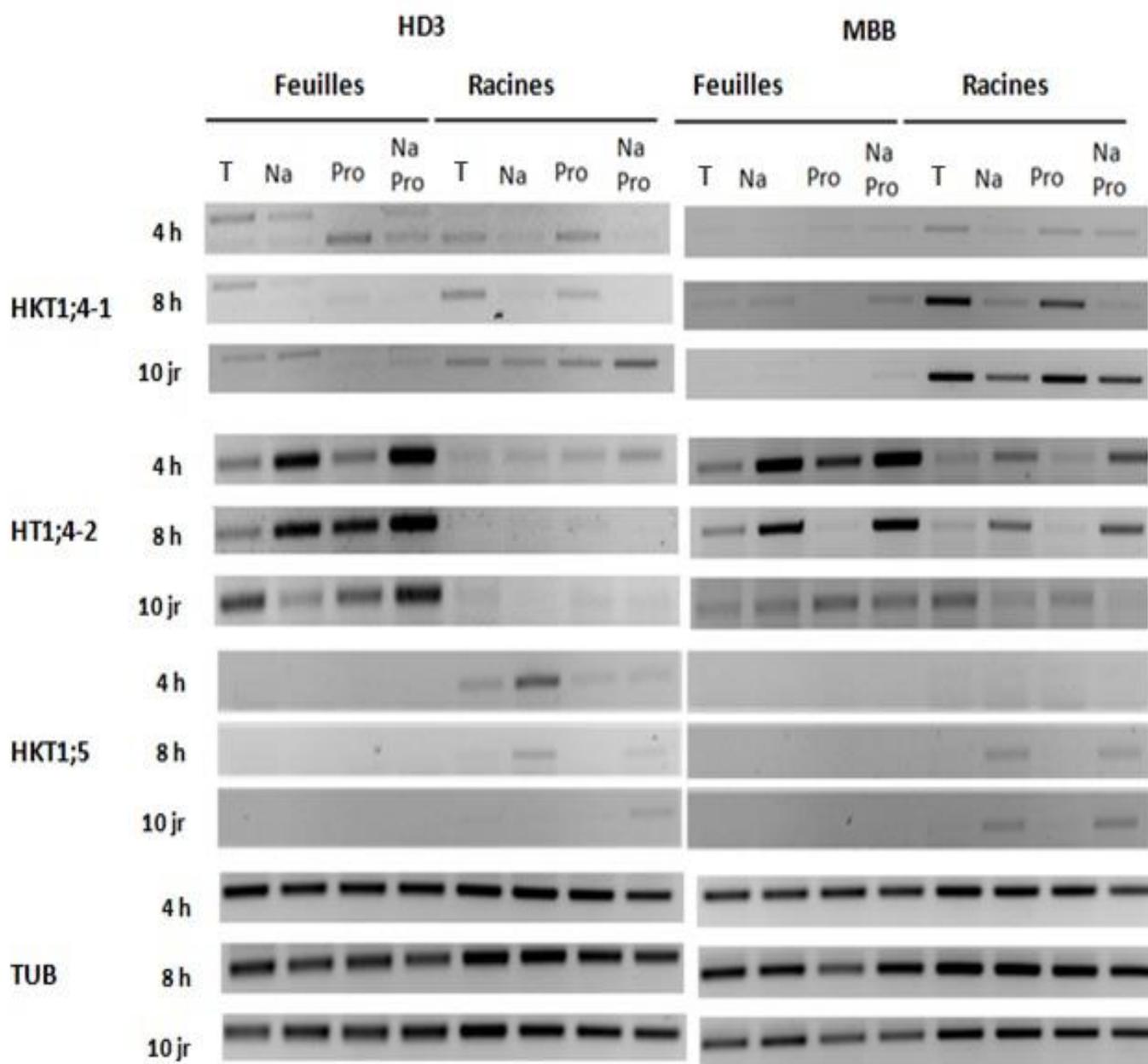


Figure 28. Effet du sel et de la proline sur l'expression des gènes candidats des transporteurs du sodium HKT (HKT1;4-1, HKT1;4-2, HKT1;5) des plantules de blé dur (variétés HD3 et MBB) cultivées sur un milieu contenant du NaCl et/ou de la proline. (*T*= témoin, *Na* = NaCl, *Pro* = proline, *Na+Pro* = NaCl + proline).

Discussion

1. L'effet améliorateur de la proline sur la germination de blé dur

La germination est l'un des critères les plus viables utilisés pour sélectionner la tolérance des plantes au sel (Jamil et al., 2006). Il est bien évident qu'une espèce ou une variété avec une meilleure germination et croissance sous stress salin seront plus tolérants au stress à des stades ultérieurs de croissance avec une meilleure productivité (Athar et al., 2009).

Sur la base du pourcentage de germination final, il a été constaté dans cet essai que le stress salin à une concentration de 10 g.l⁻¹ de NaCl affecte significativement la germination des graines de blé (figure 8 ; figure 9). Nos résultats sont en accord avec ceux de Mallek-Maalej et al. (1998), Datta et al. (2009) et Akbari et al. (2007) qui ont observé que le stress au NaCl réduisait le pourcentage de germination de *Triticum durum* et *Triticum aestivum* respectivement. Chez l'orge, Kadri et al. (2009) ont montré que le taux de germination a diminué dans la plupart des accessions cultivées *in vitro* à partir de 6 g NaCl/l. La salinité a des effets néfastes sur la croissance des plantes, ceux-ci sont associés en partie à la germination (Kahlaoui et al., 2016). Selon Rahman et al. (2008), la salinité affecte la germination de deux manières : ① il peut y avoir assez de sel dans le milieu qui entraîne la diminution du potentiel osmotique jusqu'à retardement ou empêchement de l'absorption de l'eau nécessaire à la mobilisation des nutriments requis pour la germination (*effet osmotique*), ② les constituants ou les ions du sel peuvent être toxiques pour l'embryon (*effet ionique*). Sangeetha (2013) a montré que NaCl a un effet inhibiteur sur les hydrolases particulièrement les amylases des semences du riz. Pendant la germination, l'action conjointe des deux stress se manifeste par une diminution du pourcentage et de la vitesse de germination (Delatorre-Herrera and Pinto, 2009). Cependant, l'application exogène de 20 mM de proline a contrecarré ces effets négatifs du stress salin sur la germination des deux variétés de blé dur. Ces résultats de la présente étude sont similaires à certaines études antérieures. Il a été rapporté que la proline appliquée de manière exogène a amélioré la germination des graines de blé tendre (*Triticum aestivum*) (Talat et al., 2013), de l'orge (Zeid, 2011) et du sorgho (Hussain et al., 2010). La tolérance au sel au stade de la germination est un facteur important car la salinité du sol est principalement abondante à la couche de surface (Rahman et al. 2008). Les travaux de Deivanai et ses collaborateurs (2011) ont montré que les graines de riz prétraitées avec de la proline sont une évidence significative de l'évaluation de la tolérance au sel au stade de la germination. Il est bien évident que la proline exogène améliore efficacement la tolérance au sel à différents stades de croissance d'une grande variété de plantes (Ashraf and Foolad, 2007;

Hoque et al., 2007a; Hamdia and Shaddad, 2010) mais peu d'informations sont disponibles sur son effet et son rôle sur la germination des plantes notamment sur le blé dur. En se basant sur les résultats de cette présente étude, nous pouvons suggérer que la proline exogène serait absorbée par les graines et fonctionnerait comme un stimulateur de leur tolérance au sel à travers l'accumulation de solutés organiques compatibles endogènes tels que la proline endogène, la glycine-bétaïne et les sucres (non mesurés ici) ; ces osmolytes pourraient agir à leur tour comme osmoprotecteurs. Athar et al. (2009) ont rapporté qu'en présence de la proline, les graines pourraient maintenir un meilleur état hydrique en augmentant l'influx d'eau et en réduisant son efflux dans les conditions de limitation de l'eau induites par la salinité et protégeraient les membranes contre la toxicité ionique et le stress oxydatif induit par le sel dans les graines en germination. Selon Zeid (2011), l'amélioration du pourcentage de germination est associée à l'augmentation de l'activité amylasique et protéasique dans les graines. En fait, il a été démontré que le traitement des graines d'orge avec de la proline a significativement augmenté l'activité amylase et protéase et a amélioré la croissance des coléoptiles en conditions du stress salin. De plus, l'effet du traitement de la proline est plus prononcé sur l'activité protéase. L'amylase et la protéase jouent un rôle très important pendant la germination. Pour cela, l'hydrolyse des réserves de la graine (l'amidon et les protéines) permet aux axes de l'embryon d'utiliser les hydrolysats tels que les sucres et les acides aminés nécessaires à la croissance précoce. En comparant les deux variétés, on peut observer que la variété Hedba 3 est plus tolérante au stress salin en termes de germination.

2. Le stress salin affecte la croissance des plantules de blé dur

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 des paramètres estimés de la croissance. La croissance est d'autant plus réduite que la plante est sensible à l'effet spécifique de l'ion en excès dans ses tissus (Levitt, 1980). Le blé dur est l'une des céréales les plus sensibles au sel. Il a relativement une faible capacité d'exclusion du sodium par comparaison au blé tendre ou aux autres espèces du *Triticum* (James et al., 2006; Munns et al., 2006; Rampino et al., 2006), il ne stocke pas efficacement le sodium dans les compartiments cellulaires et son méristème racinaire est moins perceptif au stress salin (Wu et al., 2018).

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que la sensibilité de la croissance des feuilles au stress salin varie selon la variété, elle est plus faible pour HD3 que pour MBB, suggérant une différence dans l'effet du stress salin vis-à-vis des deux variétés de blé dur.

Selon Wu et al. (2018), la tolérance du blé dur au sel varie fortement en fonction de la variété étudiée et du mode de culture (culture *in vitro*, hydroponie). La croissance des organes a été différemment affectée en présence de NaCl, les racines étant plus sensibles que les feuilles. Les racines des deux variétés sont pareillement sensibles au stress salin. Tammam et ses collaborateurs (2008) 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*). Abo-kassem (2007) rapporte qu'une croissance plus importante des racines dans les conditions du stress est une stratégie d'adaptation des plantes leur permettant d'aller à la recherche de l'eau. Cependant, la croissance des racines de nos variétés de blé dur est négativement affectée par le stress salin. Une désorganisation des tissus racinaires sous l'effet du sel a été constatée dans les plantules traduisant leur sensibilité à l'effet de la salinité. Les cellules de la zone de division des racines de blé ont été décrites comme étant gravement altérées par le stress salin (Annunziata et al., 2017).

3. Le stress salin affecte le statut hydrique des plantules de blé dur

Le stress salin a également provoqué une diminution de la teneur des feuilles en eau dans les plantules cultivées en présence du sel. Un même résultat a été observé par Chorfi et Taibi (2011) chez le blé dur. Cette diminution du contenu intracellulaire des plantules en eau dans nos conditions indique qu'un stress hyperosmotique s'est produit dans les tissus foliaires des plantules du blé. Cela est confirmé par l'induction de l'expression du gène déhydrine par le stress qui est associée à la déshydratation. L'accumulation des transcrits de la déhydrine a été également observée chez le riz et d'autres céréales soumises à la salinité (Masmoudi et al., 2001). Ces protéines sont connues pour leur induction dans les tissus végétatifs par les divers stress abiotiques qui provoquent la déshydratation des cellules (Hanin et al., 2011). Selon Houimli et al. (2008) et Deivanai et al. (2011), 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. Rappelons que l'eau 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 and Souer, 2004). Certaines études ont rapporté que cette diminution de la TRE chez le blé dur est plus rapide dans les variétés sensibles que les variétés résistantes (El-Bassiouny and Bekheta, 2005). La variété Hedba 3 (HD3) s'avère plus

sensible que Mohamed Ben Bachir (MBB). Des études récentes indiquent la corrélation positive entre l'accumulation des protéines déhydrines avec la tolérance des plantes au stress (Hanin et al., 2011) et suggèrent plusieurs activités pour les DHNs y compris la séquestration des ions, la stabilisation des membranes et des macromolécules, le rôle de molécule chaperonne (Masmoudi et al., 2001; Tripepi et al., 2011). Il a été suggéré que les déhydrines peuvent également jouer un rôle antioxydant pour atténuer les dommages oxydatifs dans les plantes stressées via le piégeage des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Sun and Lin, 2010). Chez le blé dur, Saibi et al. (2015) supposent la contribution de la déhydrine (DHN5) dans les mécanismes impliqués dans la tolérance au sel tels que le métabolisme de la proline et dans le système de détoxification des ROS. Cependant, nos résultats ne montrent pas que la déhydrine (DHN1) est le marqueur moléculaire de la tolérance des variétés de blé dur étudiées au stress salin. L'accumulation rapide des transcrits du gène DHN dès les premières heures du stress jusqu'à 10 jours ne semble pas contribuer dans l'atténuation des effets du stress salin sur les membranes et les protéines ainsi que la réduction quantitative des ions accumulés dans les plantules *in vitro*. Le rôle antioxydant de la déhydrine a été proposé par plusieurs études (Hanin et al., 2011; Sun and Lin, 2010), mais les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales ne sont pas suffisants pour confirmer cette hypothèse.

4. Le stress salin a provoqué le stress oxydatif dans les plantules de blé dur

Le stress salin provoque également un stress ionique qui est souvent associé au stress oxydatif. Nous avons enregistré une augmentation de la fuite d'ions et de la teneur de malondialdéhyde MDA traduisant la peroxydation lipidique et l'effet oxydatif du sel sur les plantules notamment chez la variété MBB, ce qui indique que le stress salin imposé aux plantules est élevé. Des résultats similaires sont enregistrés par Zeid (2011) qui ont démontré que le NaCl a provoqué l'augmentation des niveaux des paramètres du stress oxydatif (MDA et la fuite d'électrolytes membranaires) chez l'orge. En effet, le stress oxydatif est causé par l'excès des espèces réactives d'oxygène (ROS) (Xiong and Zhu, 2002). Ces molécules hautement actives peuvent provoquer des dommages oxydatifs au niveau des lipides membranaires, des protéines et des acides nucléiques (Jérémie Diédhiou, 2006; Pang and Wang, 2008). La peroxydation des lipides conduit à l'altération de la fluidité membranaire et à l'augmentation de sa perméabilité modifiant ainsi les homéostasies chimiques et redox cellulaires (Pourrut, 2008). Cela pourrait également expliquer la réduction de la croissance de nos plantules sous l'effet du stress salin.

5. L'apport de la proline exogène a partiellement atténué les effets négatifs du sel sur la croissance des plantules de blé

La présence de la proline a atténué l'effet négatif du stress salin sur la croissance des plantules de blé dur qui a été partiellement restaurée dans les deux variétés. Ce résultat rejoint ceux rapportés chez le blé tendre (Talat et al., 2013), le riz (Sobahan et al., 2009), l'orge (Lone et al., 1987) et d'autres espèces végétales (Khedr et al., 2003; Szabados and Savoure, 2010; Medeiros et al., 2014; Butt et al., 2016; Nessim et al., 2009). Chez le tabac *Nicotiana tabacum*, Okuma et al., (2004) ont montré 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 plants de tabac augmente davantage en présence de la proline exogène. Cette observation a été confirmée par Reza et al. (2006) qui ont démontré que la présence de la 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 rapporté 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. Il a été également démontré que l'ajout de la proline peut améliorer la croissance des plantules soumises à d'autres types de stress tel que le stress du Selenium (Aggarwal et al., 2011).

Alors que la proline peut partiellement atténuer les effets négatifs du stress salin sur la croissance de blé dur, il y a une différence de l'effet améliorateur de la proline exogène entre les deux variétés soumises au stress NaCl pendant 10 jours. Nous suggérons que les réponses des feuilles MBB et des racines HD3 à la proline exogène peuvent minimiser les effets néfastes du stress au NaCl mais ces réponses sont dépendantes de la variété telle qu'il a été relaté par Per et al. (2017). Il a été rapporté que la proline pourrait agir comme une molécule de signalisation en modulant la division cellulaire dans la racine chez *Arabidopsis thaliana* (Biancucci et al., 2015). Dans ce présent travail, l'effet de la proline sur la croissance des racines est faible. L'effet atténuateur de la proline sur le statut hydrique des plantules (la teneur relative en eau) est également différent entre les variétés étudiées, chaque variété ayant une réponse spécifique vis-à-vis de la proline. Cette spécificité pourrait être expliquée par le degré de sensibilité des variétés au stress salin. Chez MBB, l'effet favorable de la proline sur les feuilles en conditions stressantes pourrait être associé à l'augmentation de leur teneur relative en eau et à la protection des cellules contre le stress osmotique. Nombreux sont les auteurs qui ont démontré le rôle de la proline exogène dans le maintien d'une teneur relative en eau favorable sous la salinité : Chez *Hordeum vulgare* (Zeid, 2011), *Cucumis sativus*

(Huang et al., 2009), *Cucumis melo* (Kaya et al., 2007). Il a été suggéré que la proline déclenche l'accumulation de certains osmolytes organiques tels que la proline, la glycine bétaine ou les sucres solubles et inorganiques tel que le potassium qui aident les plantes à ajuster leur potentiel osmotique cellulaire et donc à maintenir une teneur en eau plus élevée (Ahmed et al., 2011; Khan et al., 2014; Zhang and Becker, 2015). Dans une analyse de l'effet bénéfique de la proline exogène dans des conditions salines, Huang et al. (2009) et Nawaz et al. (2010) ont considéré que son rôle essentiel se situe au niveau de l'amélioration du statut hydrique, le maintien de l'équilibre osmotique et la stabilisation des structures subcellulaires de la plante puisque la réduction initiale de la croissance après le stress salin résulte de son effet osmotique. Selon Ashraf (2004) et Raza (2006), 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. D'autres chercheurs ont suggéré 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 (Ali et al., 2007; Kaya et al., 2007). Cependant, Yan et ses collaborateurs (2011) ont associé ce rôle de la proline exogène à son action en tant que nutriment et à sa contribution dans la division et l'agrandissement cellulaires vis-à-vis de la croissance pondérale dans les plantules non stressées. D'autre part, en conditions salines, ils considèrent que la proline exogène peut agir en tant qu'antioxydant intervenant dans quelques mécanismes de défense dans les plantules endommagées par l'effet du stress salin tels que l'élévation de la photosynthèse, le maintien des activités enzymatiques et l'élimination ou détoxification des espèces réactives de l'oxygène. Dans ce présent travail, l'apport de la proline exogène a également protégé les plantules notamment la variété MBB contre les effets délétères du stress oxydatif causés par le sel en réduisant la concentration de malondialdéhyde et la fuite d'électrolytes. Cela signifie que la proline aide les membranes cellulaires à maintenir leur intégrité et leur stabilité en minimisant la peroxydation lipidique et la fuite des ions. Des résultats similaires sont enregistrés chez l'orge par Zeid (2011) qui a montré que les plantes stressées et traitées avec de la proline ont montré une diminution de la fuite des ions et de la teneur de malondialdéhyde. De nombreuses études ont rapporté que la proline limite significativement les dommages oxydatifs induits par le stress salin par une diminution de la teneur de malondialdéhyde et la fuite des ions : Okuma et al. (2000), Okuma et al. (2004), Reza et al. (2006), Ben Hassine et al. (2008), Banu et al. (2009), Huang et al. (2009), Yan et al. (2011), Kaya et al. (2007). Il a été suggéré qu'en conditions stressantes, la proline peut agir sur la détoxification des radicaux libres (Okuma et al., 2000, 2004; Hoque et al., 2007a; Banu et al.,

2009; Yan et al., 2011) ou améliorer le potentiel redox par un bon approvisionnement des cellules en NADP⁺ (Hassine et al., 2008). Parmi les différents solutés compatibles, la proline est le seul qui a été démontré capable de protéger les cellules végétales contre les dommages oxydatifs en piégeant directement les ROS, tels que l'oxygène singlet (1O₂) et le radical hydroxyle ·OH (Anwar Hossain et al., 2014). La proline exogène pourrait également contribuer dans l'amélioration de l'activité des enzymes antioxydantes impliquées dans la détoxification des ROS (Hoque et al., 2007a; Huang et al., 2009; Islam et al., 2009; Kumar et al., 2010; Yan et al., 2011). Chez la variété HD3, la présence de la proline dans le milieu a augmenté l'activité antioxydante de la superoxyde dismutase. Il a été démontré que l'application de la proline exogène chez l'olivier a augmenté l'activité des enzymes antioxydantes entre autres la SOD et a protégé l'appareil photosynthétique des plantes confrontées au stress salin (Ahmed et al., 2011). Chez le maïs, l'application de la proline exogène a permis la protection des plantules contre le stress des températures élevées en modulant leur peroxydation lipidique et leur activité de croissance (Ali et al., 2013). Selon Posmyk et Janas (2007) en plus d'agir comme un piègeur de radicaux libres et de stabiliser les membranes, la proline exogène peut agir comme une source d'azote et de carbone améliorant ainsi la croissance des plantules et l'efficacité de la production.

6. La modification des niveaux de métabolites par le stress du sel NaCl et l'effet variable de la proline exogène

Le dosage des pigments photosynthétiques, des protéines et des carbohydrates nous a permis d'estimer le comportement physiologique et biochimique des plantules de blé dans les conditions du stress salin en présence ou en absence de la proline exogène. Les résultats obtenus ont révélé une perturbation de ces paramètres au niveau des tissus sous l'effet du sel NaCl marquée par des réductions de leurs quantités. Nous avons enregistré une diminution très significative de la teneur des feuilles en chlorophylles totales ainsi que des caroténoïdes chez les deux variétés soumises au stress par comparaison aux plantules témoins avec une baisse importante de la chlorophylle b. Le rapport caroténoïdes/chlorophylles totales élevé est expliqué par la faible teneur des plantules en chlorophylles. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Zeid (2011) qui a attribué cette augmentation à la destruction de la chlorophylle b sous l'effet de la salinité. L'effet négatif du sel sur les pigments photosynthétiques a été également rapporté par d'autres travaux chez le blé (Raza et al., 2006), l'orge (Zeid, 2011), le maïs (Molazem et al., 2010), le riz (Chaum and Kirdmanee, 2010; Chutipaijit et al., 2011) et le melon (Kaya et al., 2007). Sobhanian et al. (2011)

associent la réduction de la teneur en chlorophylles à la perturbation de l'intégrité du chloroplaste induite par le NaCl. Sa stabilité dépend essentiellement du maintien des structures membranaires (Tahi et al., 2008) qui dans les conditions salines demeurent rarement intactes (Molazem et al., 2010). Pendant le stress salin, une quantité significative des ions de Na⁺ et de Cl⁻ absorbés peut s'accumuler dans le chloroplaste et interagir directement avec les membranes thylacoïdales (Hassine et al., 2008). Celles-ci sont alors détériorées entraînant ainsi une faible accumulation de la chlorophylle et donc une faible capacité photosynthétique comme rapporté par Datta et ses collaborateurs (2009a). Une réduction de la biomasse et de la teneur en chlorophylle en réponse au stress salin a été décrite dans plusieurs études précédentes (Munns, 2002; Roy *et al.*, 2014). Selon Yang et al.(2020), le stress salin a des effets directs et indirects sur la teneur des plantes en chlorophylle et sur l'efficacité photosynthétique. Les effets directs résident dans la modification et la régulation de l'activité et des niveaux d'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle et de la photosynthèse. Les effets indirects sont obtenus en régulant des voies spécifiques telles que les systèmes enzymatiques des antioxydants. Dans ce contexte, il a été rapporté que la diminution des teneurs en chlorophylles enregistrées dans les conditions salines résulte de la stimulation de la biosynthèse de la proline. En effet, le glutamate est le précurseur de la chlorophylle dans les plantes supérieures et en condition de la salinité une partie de ce précurseur est plus converti en proline ce qui provoque son déclin dans la voie de la biosynthèse de la chlorophylle (Alikhani et al., 2011). Dans nos plantules de blé dur, une forte accumulation de la proline endogène a été enregistrée sous l'effet du stress salin. D'autre part, le NaCl a aussi provoqué un stress oxydatif en altérant l'intégrité des membranes des feuilles. La perte de chlorophylles peut être aussi la conséquence d'une plus grande production des molécules actives d'oxygène (Fercha, 2011; Sorkheh et al., 2012). Compte tenu de nos résultats observés chez le blé, nous pensons que la diminution des chlorophylles pourrait être due à la fois à sa dégradation par le stress oxydatif et à la réduction de sa biosynthèse. Aarti et al. (2006) ont démontré que le stress oxydatif impacte la biosynthèse de la chlorophylle via l'inhibition de l'activité de ses enzymes, ce qui pourrait influencer directement le taux de photosynthèse et donc la croissance de la plante. Le stress salin a également provoqué une réduction du contenu en protéines dans les deux variétés particulièrement dans les racines. Le même résultat a été enregistré par Datta et ses collaborateurs (2009a) qui ont observé une baisse de la teneur en protéines chez plusieurs variétés de blé par les différentes concentrations du sel (25, 50, 75, 100, 125, 150 mM NaCl). Nous suggérons que cette diminution est associée à l'inhibition de la synthèse des protéines et/ou à leur dégradation par

le biais des protéases. Il a été apporté qu'en conditions de salinité les ions modifient la conformité des protéines (Botella et al., 2005). L'effet du stress salin sur les sucres est très variable entre les deux variétés et leurs organes. L'augmentation de la teneur de blé en sucres a été observée dans les feuilles de variété MBB et dans les racines d'HD3. Plusieurs études ont attribué cette accumulation des sucres solubles à leurs rôles dans l'ajustement osmotique mais aussi dans la protection contre le stress (Mohammadkhani and Heidari, 2008). Nos résultats ne permettent pas de conclure sur le rôle de ces composés dans la réponse de nos variétés de blé du vis-à-vis de la salinité mais confirment la perturbation quantitative au niveau des différents métabolites évalués dans les plantes de blé dur sous l'effet du stress salin.

En présence de la proline dans le milieu de culture, nous avons enregistré des variations quantitatives dans les paramètres biochimiques en fonction de la variété et de l'organe. L'augmentation de la teneur foliaire des chlorophylles dans les conditions stressantes peut être attribuée à la stimulation de la voie de biosynthèse de ces pigments. Le rôle améliorateur de la proline exogène pour les pigments chlorophylliens a été également observé dans d'autres travaux Kaya et al. (2007) ; Deivanai et al. (2011) ; Yan et al. (2011). Il a été démontré dans ce contexte que les plantes de melon ayant bénéficié d'un apport de 10 mM de proline exogène ont eu plus de chlorophylles et ont produit plus de biomasse. En conditions du stress hydrique, Ali et al. (2007) ont révélé l'augmentation de la photosynthèse par la proline exogène, cet effet protecteur de la proline a été associé à l'augmentation de la conductance des stomates qui entraîne une diffusion élevée de CO₂ dans la feuille favorisant ainsi le taux de la photosynthèse. En revanche, l'effet bénéfique de la proline sur les protéines et les sucres de nos plantules stressées de blé n'a pas été observé. La teneur des plantules stressées en sucres et en protéines a été réduite par rapport aux plantules stressées sans ajout de la proline exceptionnellement pour les racines de variété HD3. Nounjan et Theerakulpisut (2012) ont constaté que l'ajout de 10 mM de proline dans la solution nutritive saline (200mmol/L NaCl) ou non saline provoque la diminution de la teneur des protéines au niveau des plantes de riz comparativement au témoin. Nos résultats ne corroborent pas ceux obtenus dans la majorité des études qui ont révélé le pouvoir protecteur et améliorateur de la proline en conditions du stress (2003) ; Kishor et al., (1995) ; Hoque et al. (2007b) ; Deivanai et al. (2011). Nous suggérons que la valeur ajoutée de la proline vis-à-vis des protéines et des hydrates de carbone dépend à la fois de l'intensité du stress, de la concentration de la proline exogène et de l'espèce. Deivanai et al. (2011) ont démontré que l'application exogène de la proline améliore le contenu foliaire en protéines chez le riz et les faibles concentrations de la proline

1 mM semblent être plus efficaces. En conditions du stress hydrique, Khalil et El-Noemani (2012) ont montré que la proline exogène (1 et 5 mM) induit la diminution du taux des hydrates de carbone (sucres) dans les plantes de cresson (*Lepidium sativum*). À une concentration de proline plus élevée (10 mM), le pourcentage de ces composés est comparable à celui du témoin. Notre étude montre qu'en conditions de stress salin élevé la proline exogène offre la possibilité aux plantules de blé de limiter les dommages oxydatifs via la protection des pigments chlorophylliens. Nous pensons que la proline protège les chlorophylles contre le stress oxydatif causé par le stress salin soit par l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes notamment la superoxyde dismutase SOD ou bien par l'accumulation de la proline qui pourrait jouer le rôle d'antioxydant. Plusieurs travaux ont démontré l'efficacité de l'application de la proline dans les contraintes salines sur le système antioxydant (Banu et al., 2009; Huang et al., 2009; Islam et al., 2009; Ahmed et al., 2011; Yan et al., 2013). Certains auteurs expliquent que la proline joue 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 et al., 2005) et que ce rôle non osmotique est le plus important pour l'augmentation de la tolérance au stress (Verslues and Sharma, 2010).

7. Le stress salin et la proline exogène augmentent la teneur des plantules en proline et modulent les gènes de sa biosynthèse

La proline est un osmolyte compatible avec les propriétés de protection cellulaire. L'accumulation de la proline est l'une des réponses métaboliques les plus importantes des plantes à un stress salin (Parida et al., 2008). Son accumulation est un indicateur du stress tel que le stress hyperosmotique et ionique (Sharma and Verslues, 2010; Szabados and Savoure, 2010; Mansour and Ali, 2017). L'augmentation de la quantité de la proline endogène sous l'effet de la salinité a été rapportée chez de nombreuses espèces y compris le blé (El-Bassiouny and Bekheta, 2005; Demiral and Türkan, 2006; Datta et al., 2009b; Chutipaijit et al., 2011). Il existe chez les céréales une variation intraspécifique dans l'accumulation de la proline sous l'effet du stress salin (Sobhanian et al., 2011). Il a été démontré que la protection fournie par la proline accumulée varie en fonction du génotype et de l'intensité du stress (Płazek et al., 2013; Rana et al., 2016). D'après Plazek et ses collaborateurs (2013), la tolérance au sel chez le blé dur et le blé tendre n'est pas corrélée avec l'accumulation de la proline endogène. Cependant, des niveaux plus élevés de la proline accumulée ont été signalés dans les génotypes de blé dur plus tolérants au sel par Rana et al. (2016). Nos résultats ont

montré que l'accumulation de la proline est induite par le stress salin dans les feuilles des deux variétés HD3 et MBB avec une quantité plus élevée dans les feuilles du MBB cultivé dans les conditions du stress, suggérant que la proline accumulée est un marqueur de l'intensité du stress perçue par la plante (Almansouri et al., 1999; Munns, 2002) et n'est pas en corrélation avec la tolérance au stress (Plazek et al. 2013). En effet, la proline accumulée sous l'effet de 10g/l de NaCl ne semble pas suffisante pour contribuer à la protection des plantules contre le stress salin sévère imposé dans nos conditions et à l'atténuation des dommages induits par le stress oxydatif tel que la perte de l'intégrité membranaire.

En présence de la proline exogène dans le milieu de culture, la proline accumulée dans le blé dur est plus élevée et son accumulation est encore plus importante dans les conditions du stress salin. Cela signifie que les plantules sont capables d'absorber la proline exogène présente dans leur milieu de culture. Le même résultat a été enregistré chez d'autres espèces : le blé tendre (Mahboob et al., 2016), l'orge (Reza et al., 2006), le riz (Hur et al., 2004), le tabac (Okuma et al., 2000), le concombre (Huang et al., 2009), la tomate (Prasad and Potluri, 1996), le melon (Kaya et al., 2007) et la canne à sucre (Medeiros et al. 2015). L'effet améliorateur de la proline exogène sur la teneur de la proline libre a été également démontré par d'autres travaux dans les différentes situations du stress : hydrique (Ali et al., 2007; Lee et al., 2009), osmotique (Gerdakaneh et al., 2010), froid (Chen and Li, 2002), oxydatif (Kumar et al., 2010) et le stress induit par le cadmium (Islam et al., 2009). Les plantules ont été capables d'absorber la proline exogène présente dans leur milieu de culture d'où l'augmentation de la teneur en proline. La proline accumulée *in vivo* à partir d'un apport exogène peut compléter le faible niveau de la proline endogène pour contrebalancer les effets du stress salin. Les plantes assimilent donc et transportent facilement la proline même en conditions du stress (Barnun and Poljakoff, 1977). Chez le blé dur, la forte concentration de la proline a été observée dans les feuilles des deux variétés étudiées, ce qui signifie que la proline exogène a été transportée et accumulée dans les organes de la plante (Rentsch et al., 1996). La proline accumulée en plus grande quantité pourrait avoir fourni une protection aux plantes contre le stress salin et le stress oxydatif (Verslues et Sharma 2010 ; Szabados et Savoure 2010 ; Mansour et Ali 2017).

Nous avons constaté une corrélation entre l'accumulation de la proline et la diminution de l'effet du stress salin, comme le montre le niveau des marqueurs du stress oxydatif. Les travaux de Hossain et al. (2014) ont montré qu'un prétraitement par la proline stimule la défense antioxydante chez des plantes exposées au sel durant 7 jours. Ceci par l'induction de

l'activité des enzymes antioxydantes (la catalase, l'ascorbate peroxidase, la glutathion réductase), ainsi que par le maintien du statut redox *via* l'accumulation des molécules antioxydantes (ascorbate et glutathion). Cependant, l'apport de la proline en conditions stressantes a eu différents effets sur la détoxification des ROS, la protection de l'intégrité membranaire et la croissance selon l'organe et la variété étudiée. L'effet de la proline exogène sur le contenu en proline des plantules de blé dur en conditions du stress dépendrait donc de sa biosynthèse, de sa dégradation et de la variété. La régulation différentielle enregistrée entre les deux variétés des gènes du métabolisme de la proline pourrait être liée à la différence de la perception et de l'activité d'absorption de la proline exogène par les cellules racinaires.

L'origine de l'accumulation de la proline dans les conditions stressantes peut être associée à l'augmentation de la biosynthèse de la proline, à la réduction de sa dégradation, à l'augmentation de l'hydrolyse protéique ou bien à la diminution de sa consommation (Alikhani et al., 2011). L'expression du gène P5CS, codant l'enzyme responsable de la biosynthèse du P5C, précurseur de la proline, est corrélée avec l'accumulation de la proline dans le blé dur et éventuellement avec la synthèse de la proline (Amini et al., 2015; Annunziata et al., 2017). Il a été montré que la surexpression de P5CS dans les plantes transgéniques augmente leur niveau en proline et améliore leur tolérance vis-à-vis du stress salin (Sawahel and Hassan, 2002; Anoop and Gupta, 2003; Han and Hwang, 2003). Chez le Tabac par exemple, les plantes transgéniques surexprimant la P5CS ont synthétisé 10 à 18 fois plus de proline et étaient plus tolérantes à la salinité que les plantes témoins (Kishor et al., 1995). Dans nos plantules de blé dur, nous observons que la régulation du gène P5CS a commencé après 8 heures de stress salin se traduisant par une augmentation des transcrits du gène P5CS dans les feuilles des deux variétés. Dans les racines, l'expression du gène P5CS est manifestement moins modulée par le stress mais le niveau basal de l'expression est plus élevé que dans les feuilles. En revanche, le deuxième gène impliqué dans la biosynthèse de la proline P5CR n'a pas été modulé de manière aussi évidente que le P5CS tel qu'il a été montré par Mattioni et al. (1997) chez le blé dur et contrastant avec la modulation rapportée chez le blé tendre (Ma et al. 2008). Par ailleurs, nous avons noté que l'expression du gène clé du catabolisme de la proline PDH dans les deux variétés de blé dur HD3 et MBB est négativement régulée par le stress salin ; ce résultat a été également observé chez d'autres espèces végétales (Peng et al., 1996; Servet et al., 2012). La répression du gène PDH a été constatée dans les deux variétés après 4 heures de stress salin. Quand le stress NaCl est appliqué à long terme jusqu'à 10 jours de culture, l'expression du gène PDH est différente entre les variétés HD3 et MBB. En effet, les transcrits de ProDH est régulée par le stress salin

dans les racines de MBB mais pas dans la variété HD3. Cependant, la répression du gène PDH donc l'inhibition de la dégradation de la proline n'est pas corrélée au niveau de la proline dans les racines après 10 jours de stress par comparaison au témoin. Cela pourrait expliquer la faible régulation des enzymes de biosynthèse de la proline par le stress. Certaines données rapportées dans la littérature ont montré que l'augmentation de la synthèse de proline à partir du glutamate représente le principal facteur entraînant l'accumulation de proline dans les tissus végétaux stressés et non l'inhibition de son oxydation (Voetberg and Sharp, 1991). Mani et al. (2002) ont montré que les plantules d'*Arabidopsis* surexprimant PDH ont accumulé moins de proline pendant le stress osmotique. L'expression du gène ProDH est connue pour être régulée par la proline (Yoshida et al., 1997; Sharma and Verslues, 2010; Servet et al., 2012; Cabassa-Hourton et al., 2016). En 2022, Guo et son équipe ont montré que 10mM de la proline exogène a significativement augmenté l'expression du gène PDH chez la luzerne en conditions du stress salin. En présence de la proline exogène, les transcrits de PDH augmentent après 10 jours de croissance, suggérant la régulation du gène PDH par la proline accumulée dans les tissus. Par ailleurs, les profils protéiques obtenus par Western blotting des plantules de 10 jours ont révélé que la PDH est moins abondante dans les feuilles dans les conditions du stress en présence ou en absence de la proline par rapport au témoin. Cela signifie que le mécanisme du catabolisme de la proline est réprimé ce qui a limité la dégradation de la proline synthétisée et transportée vers les tissus foliaires. Nous suggérons que la forte accumulation apparente de la proline dans les feuilles que dans les racines des deux variétés, pourrait être le résultat combiné de la synthèse de la proline induite par le stress salin et de la longue distance parcourue du milieu de culture jusqu'aux feuilles par la proline. Il existe plusieurs transporteurs qui sont impliqués dans le transport de la proline dans les plantes (Ueda et al. 2006) et en général les mouvements de la proline sont augmentés dans les conditions du stress notamment le stress salin (Kavi et al., 2005). Le résultat de western blotting soulève la question de la régulation post-transcriptionnelle de l'enzyme PDH. De plus, son activité enzymatique pourrait jouer un rôle dans la régulation et l'accumulation de la proline dans les tissus.

Etant donné que le catabolisme de la proline par la PDH se produit au niveau des mitochondries végétales, nous avons tenté d'estimer son importance dans la régulation de l'accumulation de la proline dans nos plantules de blé dur et dans nos conditions expérimentales via l'activité respiratoire mitochondriale. De manière intéressante, les résultats ont montré que nos mitochondries brutes extraites de blé dur sont intactes et cela a été confirmé grâce à la respiration mitochondriale enregistrée via la consommation d'O₂. Les

mitochondries des plantules cultivées en présence de la proline semblent mieux respirer par comparaison aux conditions témoins, suggérant l'oxydation de la proline et l'optimisation de l'activité respiratoire des mitochondries. Une hypothèse qui pourrait être avancée serait la relation de la PDH avec la régulation de l'accumulation de la proline dans les plantes notamment le blé dur. Cependant, l'ajout du substrat mitochondriale L-proline dans le milieu de mesure ne semble pas, dans nos conditions expérimentales, de mieux mettre en évidence ce résultat. Pas d'information disponible quant aux éléments de la régulation de la PDH et de l'activité respiratoire de blé dur dans les conditions du stress abiotique. Pris dans l'ensemble, ce premier essai chez le blé dur met en lumière la régulation complexe de la PDH qui fait intervenir les processus développementaux tel que la respiration mitochondriale et confirme l'importance d'approfondir la question de cette relation avec l'accumulation de la proline afin d'améliorer la tolérance des plantes vis-à-vis du stress.

8. Le niveau du sodium et du potassium est perturbé par le stress salin

Les végétaux accumulent facilement du potassium dans leurs tissus (Ashley et al., 2006). Le ratio K^+/Na^+ peut être utilisé comme un indicateur du degré de tolérance des variétés de blé dur au sel (James et al. 2006). Dans les conditions du stress salin, les deux variétés de blé dur étudiées dans ce présent travail ont accumulé des ions Na^+ dans leurs feuilles et dans leurs racines. Par ailleurs, le K^+ a diminué dans les racines entraînant ainsi un déséquilibre ionique qui s'est traduit par un faible rapport K^+/Na^+ et par conséquent une faible croissance. Ce résultat corrobore ceux observés dans de nombreuses études sur le stress salin (Cuin et al., 2008). Le sodium accumulé dans les feuilles est plus élevé que dans les racines, ce qui indique que les cations Na^+ ont été transportés sur de longues distances depuis les tissus racinaires jusqu'aux tissus photosynthétiques. Ce résultat confirme la capacité limitée du blé dur à contrôler et à minimiser le transport du sodium vers les feuilles par comparaison aux autres Triticeae telles que le *T. aestivum* et *T. monococcum* (Tounsi et al., 2016). Les feuilles de la variété HD3 ont maintenu un taux de K^+ légèrement plus élevé, ce qui pourrait permettre une meilleure protection des cellules contre le stress du NaCl (Horie et al. 2009).

Nos résultats sont comparables avec ceux obtenus chez *T. aestivum* (Talat et al. 2013) et le riz sensible au sel, la proline exogène a conduit à une diminution de la teneur des plantules en Na^+ en réduisant l'absorption de Na^+ (Flowers and Dalmond, 1992; Nounjan et al., 2012; Sobahan et al., 2009). L'effet positif de la proline sur la concentration des ions a également été observé chez d'autres espèces monocotylédones telles que la luzerne (Guo et al., 2022), la canne à sucre (Medeiros et al. 2015) et le maïs (Nassem et al. 2007). L'apport de la proline en

conditions du stress salin a entraîné une diminution de la teneur des feuilles de la variété MBB en sodium Na^+ et dont la croissance a été la plus sensible à la proline. Par ailleurs, la concentration du sodium a augmenté dans les racines de MBB qui sont moins sensibles à la proline. Cependant, l'effet de la proline sur l'accumulation des ions de Na^+ n'a pas été observé dans la variété HD3. Selon Cuin et Shabala (2005, 2007), la proline peut aider à maintenir l'homéostasie ionique en limitant l'efflux du potassium K^+ chez plusieurs espèces. L'effet de la proline sur la sensibilité au sel dépend donc de l'espèce et du génotype (Plazek et al. 2013 ; Per et al. 2017 ; Wu et al. 2018).

9. La régulation différentielle et spécifique aux tissus des gènes HKT1,4-1 et -2 par le stress salin

La salinité du sol entraîne l'accumulation des concentrations toxiques de sodium Na^+ dans les feuilles des plantes (Munns, 2002). L'homéostasie ionique dans ces conditions salines est essentielle pour faire face au sel et pour la tolérance à la salinité, elle implique les systèmes de transport du sodium qui régule l'absorption, l'extrusion à travers la membrane plasmique, la compartimentation du sodium dans les vacuoles cellulaires et la recirculation des ions dans les organes de la plante (Horie et al., 2009; Asins et al., 2013). Les transporteurs de sodium Na^+ contribuent à abaisser les niveaux toxiques du sodium Na^+ pour contrôler l'homéostasie du Na^+ dans les tissus végétaux et les protéger contre les dommages dus à l'accumulation des ions Na^+ (Huang et al. 2006, 2008 ; James et al. 2006, 2011 ; Byrt et al. 2014 ; Wu et al. 2018 ; Pedro Almeida et al., 2013). En plus des autres transporteurs, les transporteurs K^+ spécifiques HKT (*High- K^+ -Transporters*) sont responsables de l'homéostasie des ions dans les plantes (Asins et al., 2013). Bien que faiblement présents dans les dicotylédones, la famille des transporteurs HKT comprend un plus grand nombre de membres chez les monocotylédones notamment les céréales (Kronzucker et al., 2013; Tounsi et al., 2016). La classe 1 des transporteurs à haute affinité de potassium (HKT1; x) ont également été associés à la tolérance au stress salin chez le blé dur (Horie et al. 2009 ; Byrt et al. 2014) et les gènes HKT codants ces transporteurs sont importants pour la tolérance des espèces de *Triticum* au sodium (Huang et al. 2006, 2008; James et al. 2006, 2011; Byrt et al. 2014). L'étude de l'expression des gènes HKT sous l'effet du sel est importante pour comprendre leurs mécanismes dans la réponse au stress salin. Nous avons testé l'expression des gènes HKT de la classe 1 chez nos variétés de blé dur (TdHKT1;4-1 et TdHKT1;4-2 et HKT1;5 (HKT8)) qui montrent une préférence pour le transport du Na^+ par rapport aux autres cations (Ben Amar et al., 2014). L'analyse RT-PCR a montré que le gène HKT1;4-1 est exprimé dans les conditions

normales et il est négativement régulé dans les racines par le stress salin à partir de 4 heures, ce qui suggère que TdHKT1;4-1 pourrait être important dans la régulation de l'équilibre ionique en l'absence de stress salin. En revanche, TdHKT1;4-2 est exprimé principalement dans les feuilles et il a été induit en réponse à un stress salin de courte durée (à partir de 4 heures d'exposition au sel NaCl). L'expression de ce gène TdHKT1;4-2 est similaire dans les deux variétés avec une induction à long terme (jusqu'à 10 jours de culture) observée dans les feuilles HD3. Le gène TdHKT1;4-2 pourrait être important dans la régulation du sel et l'équilibre dans les plantes au début du stress salin. Les gènes HKT1;4 de blé dur provenant d'un croisement avec le blé *Triticum monococcum* sont des potentiels candidats de locus Nax1 responsables de l'élimination du Na⁺ du xylème dans les racines et des gaines foliaires pour éviter sa suraccumulation dans les limbes des feuilles (Hanin et al., 2016 ; James et al., 2006, Byrt et al., 2014). Chez *Triticum monococcum* les gènes TmHKT1;4 A1 et A2 (homologues du TaHKT1;4-1 et TaHKT1;4-2) ont conféré une tolérance au stress salin (James et al. 2006, 2011). L'expression de TmHKT1;4 est sensible au sel dans les feuilles. Le gène TmHKT1;4-A2 est plus fortement exprimé dans les feuilles et les racines tandis que TmHKT1;4-A1 est principalement exprimé dans les feuilles (Tounsi et al. 2016) ; sa conductance du sodium est également plus élevée que celle de TmHKT1;4-A1. D'après Tounsi et ses collaborateurs, le gène TmHKT1;4-A2 peut avoir un rôle prédominant représentant peut-être la partie active du locus de tolérance au sel Nax1. Il peut contrôler le déchargement des ions sodium du xylème des racines et de la gaine foliaire chez la lignée tolérante à la salinité. Dans notre étude, l'expression du gène TdHKT1;4 est relativement faible lorsque les plantules sont exposées à un stress salin prolongé, ce qui suggère que son rôle dans l'exclusion du sodium est limité. De plus, la concentration des ions Na⁺ est hautement élevée dans les feuilles des variétés de blé dur en conditions du stress par comparaison au témoin. Les résultats obtenus pourraient expliquer la sensibilité de blé dur à la salinité par comparaison aux autres céréales notamment le *Triticum monococcum*. Sous l'effet du sel, le gène HKT1 ;5 (antérieurement nommé HKT8) est exclusivement exprimé dans les racines des deux variétés HD3 et MBB mais pas dans les feuilles. Ses transcrits, chez HD3, sont accumulés après 4 heures de traitement NaCl contrairement à la variété MBB ils sont légèrement détectables après 10 jours du stress. Le gène HKT1 ;5 de blé tendre a été exprimé dans les racines de blé tendre (Benderradji et al., 2011). Il a été démontré que les gènes TaHKT1;5-D et OsHKT1;5 de blé tendre et du riz sont impliqués dans le contrôle du transfert de Na⁺ de la racine vers la tige dans des conditions de salinité élevée (Byrt et al., 2007, 2014). Cependant, nos résultats de dosage de Na⁺ n'enregistrent pas une réduction de ces ions dans

les feuilles des variétés étudiés. Les différences dans la régulation des gènes TdHKT1;4-1 et 2 dans les feuilles et les racines par le stress salin suggèrent que les gènes HKT de classe 1 de blé dur ont des rôles physiologiques distincts. Les travaux de Ben Amar et ses collaborateurs (2014) sur la caractérisation fonctionnelle de ces deux transporteurs HKT1;4 de blé dur ont montré une grande similarité dans la sélectivité mais d'importantes différences dans les conductances pour le sodium avec une conductance plus élevée chez HKT1;4-2 par rapport à HKT1;4-1, suggérant de différents rôles physiologiques entre les transporteurs HKT de la sous-famille 1 chez les céréales. Une étude récente menée sur le blé dur cultivé en hydroponie et soumis à un stress salin avec 200mM de NaCl a suggéré que l'association de la détection du sodium, de son exclusion par les racines et son accumulation dans les vacuoles pourrait être la clé pour expliquer la différence de tolérance au sel entre le blé tendre et le blé dur (Wu et al. 2018). Le transporteur du sodium NHX1 pourrait être impliqué dans ce processus (Wu et al. 2018). Il est possible que la régulation de l'expression du gène HKT1 et de l'activité de HKT puisse également être impliquée dans la tolérance au sel.

La proline exogène apportée semble interférer avec l'expression du gène HKT1 ;4 en conditions témoins et en conditions de stress notamment le HKT1 ;4-2 dans les feuilles de la variété HD3 après plusieurs jours du stress. Ceci signifie que la proline a la capacité de moduler, dans une certaine mesure, la régulation des transporteurs de sodium de type HKT des plantules de blé dur. Toutefois, l'effet de la proline enregistré dans nos conditions n'est pas suffisant pour améliorer le rapport K^+/Na^+ des plantules et fournir une protection totale contre le stress salin. Cette étude est préliminaire et peu de données sont disponibles dans la littérature relatives à l'impact de l'application de la proline exogène sur les transporteurs de sodium en particulier les transporteurs HKT. Compte tenu des rôles importants de ces transporteurs dans la tolérance des plantes à la salinité, il serait intéressant d'étudier profondément la relation de la proline exogène dans la régulation génique des systèmes de transport de sodium entre autres les transporteurs HKT en conditions du stress salin chez les monocotylédones et chez les différences espèces végétales et de définir les concentrations qui permettront d'optimiser cet effet.

Conclusion générale et perspectives

Le présent travail a accordé un intérêt à la réponse de blé dur à l'apport de la proline exogène en conditions de salinité. Il avait comme objectif l'étude des réponses physiologiques, biochimiques et moléculaires au stress salin et à la proline de deux variétés de blé dur algériens Hedba3 et Mohamed Ben Bachir cultivées en *in vitro*.

Ce travail a permis d'apporter quelques éléments de réponses relatives aux modifications physiologiques, biochimiques et moléculaires sous l'effet de la proline en conditions du stress salin telles que :

- L'amélioration des performances germinatives des graines soumises au stress salin traduisant l'absorption de la proline par les graines et sa contribution dans les mécanismes et la protection des graines contre les effets néfastes du chlorure de sodium NaCl.
- La restauration partielle de la croissance des plantules affectées par le sel.
- Le maintien des pigments chlorophylliens ce qui reflète la protection de la machinerie de la photosynthèse qui pourrait améliorer l'activité photosynthétique et la croissance des plantules.
- La modulation et la stimulation du gène de la biosynthèse de la proline (P5CS) dans les feuilles des deux variétés pourraient être en partie responsables de l'augmentation de la proline accumulée dans les feuilles en conditions stressantes sous l'effet de la proline exogène.
- La perturbation et la diminution des protéines et des carbohydrates des plantules (les sucres solubles) par le stress salin n'ont pas été atténuées par la présence de la proline dans le milieu de culture, ce qui pourrait être expliqué par les niveaux élevés des ions de sodium dans les tissus.
- La régulation de la biosynthèse de la proline n'est pas suffisante pour justifier l'accumulation de la proline dans les tissus
- La diminution des marqueurs de la peroxydation lipidique (malondialdéhyde, fuite relative d'électrolytes) ce qui indique la protection membranaire et la restauration de leur perméabilité sélective traduisant l'implication de la proline dans la limitation des dommages oxydatifs.

- L'activation de l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase au niveau des feuilles. Cette enzyme permet l'élimination des espèces réactives d'oxygène (anion superoxyde) formés lors du stress salin ce qui pourrait expliquer la diminution des dommages oxydatifs. Ceci rejoint la théorie de l'implication de la proline dans la stimulation du système antioxydant.
- La diminution des niveaux du sodium et l'augmentation du potassium dans les feuilles, suggérant que la proline pourrait à un certain degré contribuer dans l'homéostasie ionique en conditions du stress bien que les niveaux des ions Na⁺ enregistrés demeurent élevés par rapport aux témoins.
- La modulation des gènes codants les transporteurs sélectifs de sodium HKT de la classe 1 (HKT1;4) notamment HKT1;4-2 dans les feuilles sachant que ces transporteurs HKT sont associés à la tolérance au stress salin chez le blé dur.

Néanmoins, il en ressort une variabilité spécifique dans ces réponses au sel et à l'application de la proline, cette variabilité est clairement associée à la variété et à l'organe. Les résultats des effets de la salinité ont montré une réduction de la croissance dans les deux variétés sous l'effet du stress salin imposé avec 10g/l NaCl. Ce comportement est lié à de nombreuses perturbations métaboliques notamment la forte accumulation des ions de sodium Na⁺ dans les feuilles et les racines. Cette accumulation engendre des désordres dans l'alimentation hydrique des plantules qui a diminué, de même la concentration des pigments photosynthétiques a été affectée à des degrés différents. La variété MBB s'est montrée plus sensible puisqu'elle présente une faible croissance traduite par une faible matière sèche des feuilles et une faible aptitude à faire face au stress salin imposé. Par ailleurs, la variété HD3 paraît plus tolérante. Ces perturbations se manifestent aussi par la sévérité du stress oxydatif évaluée par les deux indicateurs le malondialdéhyde MDA (produit de la peroxydation des lipides membranaires) et la fuite des électrolytes (perte de l'intégrité et la perméabilité des membranes) avec des pourcentages de fuite d'électrolytes élevés dans les deux variétés et une augmentation des teneurs en MDA chez MBB. Le stress salin a entraîné une accumulation de la proline au niveau des tissus foliaires dans les deux variétés et dans les racines des plantules HD3.

Les résultats de l'apport de la proline exogène ont montré une stimulation de l'accumulation de la proline dans les feuilles et les racines des plantules stressées. Cette forte accumulation semble améliorer la capacité d'ajustement osmotique de la variété MBB uniquement en augmentant sa teneur en eau, la variété HD3 quant à elle a maintenu sa faible potentialité d'ajustement osmotique. Par ailleurs, l'implication de la proline exogène dans le système

antioxydant a été enregistrée dans les deux variétés via la réduction des marqueurs des dommages oxydatifs chez MBB et HD3. Pour l'investigation des changements au niveau du métabolisme de la proline, nous avons analysé l'expression des gènes codant les enzymes de biosynthèse et de catabolisme de la proline. Les résultats ont montré que la proline accumulée dans les tissus suite à l'apport de la proline exogène en conditions stressantes n'est pas associée à la régulation du métabolisme de la proline. En effet, d'une part la légère augmentation de transcrits du gène P5CS dans les feuilles MBB et HD3 et l'absence de sa régulation dans les racines n'est pas suffisante pour justifier la forte accumulation enregistrée dans ces tissus. De plus, il y a une faible régulation de l'enzyme responsable de la dégradation de la proline PDH dans ces plantules et une variabilité dans son expression entre les organes des deux variétés étudiées. Nous suggérons que la proline ajoutée dans le milieu de culture est véhiculée vers les tissus photosynthétiques et s'est accumulée.

Pour tenter de comprendre l'implication de la proline exogène dans le système de défense antioxydant et sur l'homéostasie ionique des plantules exposées au stress salin, nous avons évalué l'activité de l'une des enzymes antioxydante (SOD) et la quantité des ions salins (Na^+ et Cl^-) dans les tissus. Nos résultats ont dévoilé que la présence de la proline dans le milieu favorise l'activité de l'enzyme antioxydante SOD chez la variété HD3 accompagnée d'une amélioration de la perméabilité sélective des membranes suggérant la contribution directe ou indirecte de la proline dans les réponses du système antioxydant. Cette augmentation de l'activité SOD n'a pas été observée chez MBB, par ailleurs la proline a atténué les effets négatifs du stress oxydatif sur les membranes en réduisant le pourcentage de la fuite d'électrolytes et la teneur en MDA. Ce qui indique que l'effet de la proline exogène à fournir au blé une meilleure aptitude pour se protéger contre le stress oxydatif est variable selon la variété. Cette variabilité spécifique de l'effet de la proline a été également observée dans l'homéostasie ionique un autre trait de la tolérance au sel. En effet, les ions Na^+ accumulés dans les feuilles sous l'effet du sel ont diminué en présence de la proline uniquement chez la variété MBB. Nous avons suggéré que l'effet du sel peut être partiellement atténué par la proline et nous avons jugé intéressant d'élucider son effet sur le transport du sodium et de potassium dans ces conditions du stress. Compte tenu du rôle des transporteurs sélectifs de sodium HKT dans la tolérance à la salinité, nous avons donc analysé l'expression des gènes des transporteurs HKT1;4-1 et HKT1 ;4-2. La proline exogène semble moduler l'expression des transporteurs HKT1;4 notamment HKT1;4-2 dans les feuilles HD3 et les racines MBB. Les profils de l'expression affichent une variabilité dans la régulation des HKT qui est spécifique à l'organe. Les deux variétés de blé dur étudiées réagissent différemment au stress

salin en réponse à la proline exogène, au niveau de l'expression du gène HKT1;4 et de l'accumulation de Na⁺ et K⁺. Les paramètres de croissance ont été partiellement sauvés à des degrés différents chez les deux variétés. D'une manière générale, nos résultats ont révélé que les deux variétés de blé dur algérien étudiées ont des sensibilités différentes au stress salin et à l'atténuation de ce stress par la proline.

Une telle stratégie d'apport exogène de la proline a été employée avec succès dans la plupart des travaux de recherche menés sur différentes espèces végétales. Cependant, le rôle précis de la proline exogène dans l'amélioration de la tolérance au stress salin n'est pas toujours bien explicite. Elle déclenche une fluctuation importante et variable des niveaux des métabolites indiquant que les mécanismes impliqués dans la réponse à la proline et au sel sont complexes.

En perspectives, plusieurs questionnements sont encore à soulever quant à l'implication de la proline exogène dans les différentes réponses adaptatives de nos variétés de blé dur au stress salin. Et pour y parvenir, il serait intéressant :

- D'analyser l'effet bénéfique de la proline sur la germination des semences de blé dur notamment la régulation génique en conditions salines et de définir la concentration optimale de la proline.
- D'étudier la régulation coordonnée entre la synthèse, le transport et l'accumulation de la proline endogène et exogène dans les conditions stressantes.
- D'étudier plus de composantes du système de défense antioxydatif enzymatique autres que la SOD et non enzymatiques et élucider les interactions potentielles entre les ROS et la proline exogène.
- De tester d'autres concentrations de la proline exogène pour définir la concentration qui optimisera son effet atténuateur des dommages du stress salin dans chaque variété.
- D'identifier les voies de signalisation stimulées par la proline et qui sont impliquées dans la transduction du signal et la régulation des réponses adaptatives au stress salin.
- D'évaluer l'apport de la proline sur les autres stades de croissance et développement de blé dur notamment le rendement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aarti, P. d., Tanaka, R., Tanaka, A., 2006. Effects of oxidative stress on chlorophyll biosynthesis in cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons. *Physiol. Plant.* 128, 186–197. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00720.x>
- Aberlenc-Bertossi, F., Sané, D., Daher, A., Borgel, A., Duval, Y., 2006. Aptitude à la déshydratation des embryons zygotiques de palmier à huile et de palmier dattier : étude de l'expression de gènes LEA. *Les actes du BRG 6*, 401–413.
- ABO-KASSEM, E., 2007. Effects of Salinity: Calcium Interaction on Growth and Nucleic Acid Metabolism in Five Species of Chenopodiaceae. *Turk. J. Bot.* 31, 125–134. <https://doi.org/10.3906/bot-0506-3>
- Abrahám, E., Rigó, G., Székely, G., Nagy, R., Koncz, C., Szabados, L., 2003. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 51, 363–372. <https://doi.org/10.1023/a:1022043000516>
- Agarwal, M., Zhu, J.-K., 2005. 8 Integration of abiotic stress signaling pathways. *Plant Abiotic Stress* 215.
- Aggarwal, M., Sharma, S., Kaur, N., Pathania, D., Bhandhari, K., Kaushal, N., Kaur, R., Singh, K., Srivastava, A., Nayyar, H., 2011. Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Biol. Trace Elem. Res.* 140, 354–367.
- Ahmed, C.B., Magdich, S., Rouina, B.B., Sensoy, S., Boukhris, M., Abdullah, F.B., 2011. Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive. *Amino Acids* 40, 565–573.
- Akbari, G., Sanavy, S.A., Yousefzadeh, S., 2007. Effect of auxin and salt stress (NaCl) on seed germination of wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* 10, 2557–2561.
- Alagarsamy, K., Karutha Pandian, S., Ramesh, M., 2011. Transgenic indica rice cv. ADT 43 expressing a $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene from *Vigna aconitifolia* demonstrates salt tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 107. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9989-4>
- Ali, Q., Anwar, F., Ashraf, F., Saari, N., Perveen, R., 2013. Ameliorating Effects of Exogenously Applied Proline on Seed Composition, Seed Oil Quality and Oil Antioxidant Activity of Maize (*Zea mays* L.) under Drought Stress. *Int. J. Mol. Sci* 14, 818–835.
- Ali, Q., Ashraf, M., Athar, H.-U.-R., 2007. Exogenously applied proline at different growth stages enhances growth of two maize cultivars grown under water deficit conditions. *Pak. J. Bot.* 39, 1133–1144.
- Alia, Mohanty, P., Matysik, J., 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* 21, 195–200. <https://doi.org/10.1007/s007260170026>
- Alikhani, F., Saboora, A., Razavi, K., 2011. Changes in osmolites contents, lipid peroxidation and photosynthetic pigment of *Aeluropus lagopoides* under potassium deficiency and salinity. *J. Stress Physiol. Biochem.* 7, 5–19.
- Almansouri, M., Kinet, J.M., Lutts, S., 1999. Compared Effects of Sudden and Progressive Impositions of Salt Stress in Three Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Cultivars. *J. Plant Physiol.* 154, 743–752. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80253-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80253-3)
- Almeida, D.M., Oliveira, M.M., Saibo, N.J.M., 2017. Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Genet. Mol. Biol.* 40, 326–345. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0106>
- Almeida, P., Katschnig, D., de Boer, A., 2013. HKT Transporters—State of the Art. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 20359–20385. <https://doi.org/10.3390/ijms141020359>

- Amini, S., Ghobadi, C., Yamchi, A., 2015. Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. *J. Plant Mol. Breed.* 3, 44–55. <https://doi.org/10.22058/jpmb.2015.17022>
- Anjum, N.A., Sofo, A., Scopa, A., Roychoudhury, A., Gill, S.S., Iqbal, M., Lukatkin, A.S., Pereira, E., Duarte, A.C., Ahmad, I., 2015. Lipids and proteins—major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 4099–4121. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3917-1>
- Annunziata, M.G., Ciarmiello, L.F., Woodrow, P., Maximova, E., Fuggi, A., Carillo, P., 2017. Durum Wheat Roots Adapt to Salinity Remodeling the Cellular Content of Nitrogen Metabolites and Sucrose. *Front. Plant Sci.* 7, 2035. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02035>
- Anoop, N., Gupta, A., 2003. Transgenic indica Rice cv IR-50 Over-expressing *Vigna aconitifolia* Δ 1-Pyrroline -5- Carboxylate Synthetase cDNA Shows Tolerance to High Salt. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 12. <https://doi.org/10.1007/BF03263170>
- Anwar Hossain, M., Hoque, Md.A., Burritt, D.J., Fujita, M., 2014. Chapter 16 - Proline Protects Plants Against Abiotic Oxidative Stress: Biochemical and Molecular Mechanisms, in: Ahmad, P. (Ed.), *Oxidative Damage to Plants*. Academic Press, San Diego, pp. 477–522.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A., Blumwald, E., 1999. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na⁺/H⁺ Antiport in Arabidopsis. *Science* 285, 1256–1258. <https://doi.org/10.1126/science.285.5431.1256>
- Apse, M.P., Blumwald, E., 2002. Engineering salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 146–150. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00298-7](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00298-7)
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.* 82, 12.
- Ashraf, M., 2004. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora-Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 199, 361–376.
- Ashraf, M., Foolad, M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59, 206–216. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.12.006>
- Asins, M.J., Villalta, I., Aly, M.M., Olías, R., Alvarez DE Morales, P., Huertas, R., Li, J., Jaime-Pérez, N., Haro, R., Raga, V., Carbonell, E.A., Belver, A., 2013. Two closely linked tomato HKT coding genes are positional candidates for the major tomato QTL involved in Na⁺ /K⁺ homeostasis. *Plant Cell Environ.* 36, 1171–1191. <https://doi.org/10.1111/pce.12051>
- Assaha, D.V.M., Ueda, A., Saneoka, H., Al-Yahyai, R., Yaish, M.W., 2017. The Role of Na⁺ and K⁺ Transporters in Salt Stress Adaptation in Glycophytes. *Front. Physiol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00509>
- Athar, H.R., Ashraf, M., Wahid, A., Jamil, A., 2009. Inducing salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.) by exogenous application of glycinebetaine and proline: Response at the initial growth stages [WWW Document]. *Pak. J. Bot.* 20094131311-1319. URL <https://www.escholar.manchester.ac.uk/uk-ac-man-scw:158085> (accessed 1.22.15).
- Attumi, A., 2007. A study of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Hordeum vulgare* (PhD). University of Glasgow.
- Ayliffe, M.A., Roberts, J.K., Mitchell, H.J., Zhang, R., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., Pryor, T.J., 2002. A plant gene up-regulated at rust infection sites. *Plant Physiol.* 129, 169–180. <https://doi.org/10.1104/pp.010940>
- B. Jarvis, S., Taylor, M., R. MacLeod, M., Davies, H., 1996. Cloning and Characterisation of the cDNA Clones of three Genes that are differentially Expressed during Dormancy-Breakage in the Seeds of Douglas Fir (*Pseudotsuga menziesii*). *J. Plant Physiol.* 147, 559–566. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80046-0](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80046-0)
- Baechtel, F.S., 1988. Recovery of DNA from human biological specimens. *Crime Lab. Dig.* 15, 95–96.

- Ballesteros, E., Blumwald, E., Donaire, J.P., Belver, A., 1997. Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles isolated from sunflower roots induced by NaCl stress. *Physiol. Plant.* 99, 328–334. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb05420.x>
- Banu, M.N.A., Hoque, M.A., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2009. Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J. Plant Physiol.* 166, 146–156.
- Barnun, N., Poljakoff, A., 1977. Salinity Stress and the Content of Proline in Roots of *Pisum sativum* and *Tamarix tetragyna*. *Ann. Bot.* 41, 173–179.
- Barragan, V., Leidi, E.O., Andres, Z., Rubio, L., De Luca, A., Fernandez, J.A., Cubero, B., Pardo, J.M., 2012. Ion Exchangers NHX1 and NHX2 Mediate Active Potassium Uptake into Vacuoles to Regulate Cell Turgor and Stomatal Function in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1127–1142. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095273>
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Daga, M., Dianzani, C., Arcaro, A., Cetrangolo, G.P., Giordano, G., Cucci, M.A., Graf, M., Gentile, F., 2018. Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants* 7, 102. <https://doi.org/10.3390/antiox7080102>
- Bartels, D., Souer, E., 2004. Molecular responses of higher plants to dehydration, in: *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer, pp. 9–38.
- Bassil, E., Tajima, H., Liang, Y.-C., Ohto, M., Ushijima, K., Nakano, R., Esumi, T., Coku, A., Belmonte, M., Blumwald, E., 2011. The *Arabidopsis* Na⁺/H⁺ Antiporters NHX1 and NHX2 Control Vacuolar pH and K⁺ Homeostasis to Regulate Growth, Flower Development, and Reproduction. *Plant Cell* 23, 3482–3497. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.089581>
- Batelli, G., Verslues, P.E., Agius, F., Qiu, Q., Fujii, H., Pan, S., Schumaker, K.S., Grillo, S., Zhu, J.-K., 2007. SOS2 Promotes Salt Tolerance in Part by Interacting with the Vacuolar H⁺-ATPase and Upregulating Its Transport Activity. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7781–7790. <https://doi.org/10.1128/MCB.00430-07>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Battaglia, M., Covarrubias, A.A., 2013. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteins in legumes. *Front. Plant Sci.* 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00190>
- Behelgardy, M.F., Motamed, N., Jazii, F.R., 2012. Expression of the P5CS gene in transgenic versus nontransgenic olive (*Olea europaea*) under salinity stress. *World Appl Sci J* 18, 580–583.
- Ben Amar, S., Brini, F., Sentenac, H., Masmoudi, K., Véry, A.-A., 2014. Functional characterization in *Xenopus* oocytes of Na⁺ transport systems from durum wheat reveals diversity among two HKT1;4 transporters. *J. Exp. Bot.* 65, 213–222. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert361>
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C., Saviouré, A., 2014. How reactive oxygen species and proline face stress together. *Plant Physiol. Biochem.* 80, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>
- Ben Rejeb, K., Abdelly, C., Saviouré, A., 2012. La proline, un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales. *Biol. Aujourd'hui* 206, 291–299. <https://doi.org/10.1051/jbio/2012030>
- Benderradji, L., Brini, F., Amar, S.B., Kellou, K., Azaza, J., Masmoudi, K., Bouzerzour, H., Hanin, M., others, 2011. Sodium Transport in the Seedlings of Two Bread Wheat ('*Triticum aestivum*' L.) Genotypes Showing Contrasting Salt Stress Tolerance.
- Berthomieu, P., 2003. Functional analysis of AtHKT1 in *Arabidopsis* shows that Na⁺ recirculation by the phloem is crucial for salt tolerance. *EMBO J.* 22, 2004–2014. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg207>
- Biancucci, M., Mattioli, R., Moubayidin, L., Sabatini, S., Costantino, P., Trovato, M., 2015. Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 15. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0637-8>
- Blahe, G., Stelzl, U., M T Spahn, C., Agrawal, R., Frank, J., Nierhaus, K., 2000. Preparation of Functional Ribosomal Complexes and Effect of Buffer Conditions on tRNA Positions Observed by cryoelectron microscopy. *Methods Enzymol.* 317, 292–309. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)17021-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)17021-1)

- Blumwald, E., Aharon, G.S., Apse, M.P., 2000. Sodium transport in plant cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1465, 140–151. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00135-8)
- Blumwald, E., Grover, A., Good, A.G., 2004. Breeding for Abiotic Stress Resistance: Challenges and Opportunities.
- Bohnert, H.J., Jensen, R.G., 1996. Metabolic engineering for increased salt tolerance--the next step. *Aust. J. Plant Physiol.*
- Bohra, J.S., Doerffling, K., 1993. Potassium nutrition of rice (*Oryza sativa* L.) varieties under NaCl salinity. *Plant Soil* 152, 299–303. <https://doi.org/10.1007/BF00029100>
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P.E., Sunkar, R., Zhu, J.-K., 2005. Endogenous siRNAs Derived from a Pair of Natural cis-Antisense Transcripts Regulate Salt Tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123, 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.035>
- Botella, M.A., Rosado, A., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 2005. Plant adaptive responses to salinity stress. *Plant Abiotic Stress* 37–70.
- Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Amara, I., Khoudi, H., Hassairi, A., Pagès, M., Masmoudi, K., 2007. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Rep.* 26, 2017–2026. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0412-x>
- Brini, F., Hanin, M., Mezghani, I., Berkowitz, G.A., Masmoudi, K., 2006. Overexpression of wheat Na⁺/H⁺ antiporter TNH1 and H⁺-pyrophosphatase TVP1 improve salt- and drought-stress tolerance in Arabidopsis thaliana plants. *J. Exp. Bot.* 58, 301–308. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl251>
- Burritt, D.J., 2012. Proline and the cryopreservation of plant tissues: functions and practical applications. InTech, Croatia.
- Butt, M., Ayyub, C.M., Amjad, M., Ahmad, R., 2016. PROLINE APPLICATION ENHANCES GROWTH OF CHILLI BY IMPROVING PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ATTRIBUTES UNDER SALT STRESS. *Pak. J. Agric. Sci.* 53, 43–49. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/16.4623>
- Byrt, C.S., Platten, J.D., Spielmeyer, W., James, R.A., Lagudah, E.S., Dennis, E.S., Tester, M., Munns, R., 2007. HKT1;5-Like Cation Transporters Linked to Na⁺ Exclusion Loci in Wheat, Nax2 and Kna1. *PLANT Physiol.* 143, 1918–1928. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093476>
- Byrt, C.S., Xu, B., Krishnan, M., Lightfoot, D.J., Athman, A., Jacobs, A.K., Watson-Haigh, N.S., Plett, D., Munns, R., Tester, M., Gilliam, M., 2014. The Na⁺ transporter, TaHKT1;5-D, limits shoot Na⁺ accumulation in bread wheat. *Plant J.* 80, 516–526. <https://doi.org/10.1111/tpj.12651>
- Cabassa-Hourton, C., Schertl, P., Bordenave-Jacquemin, M., Saadallah, K., Guivarc'h, A., Lebreton, S., Planchais, S., Klodmann, J., Eubel, H., Crilat, E., Lefebvre-De Vos, D., Ghelis, T., Richard, L., Abdelly, C., Carol, P., Braun, H.-P., Savouré, A., 2016. Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in Arabidopsis thaliana. *Biochem. J.* 473, 2623–2634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160314>
- Campalans, A., Messegue, R., Goday, A., Pagès, M., 1999. Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 327–340. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(99\)80039-4](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80039-4)
- Carillo, P., Grazia, M., Pontecorvo, G., Fuggi, A., Woodrow, P., 2011. Salinity Stress and Salt Tolerance, in: Shanker, A. (Ed.), *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech.
- Carillo, P., Mastrolonardo, G., Nacca, F., Parisi, D., Verlotta, A., Fuggi, A., 2008. Nitrogen metabolism in durum wheat under salinity: accumulation of proline and glycine betaine. *Funct. Plant Biol.* 35, 412–426. <https://doi.org/10.1071/FP08108>
- Caverzan, A., Casassola, A., Brammer, S., 2016. Antioxidant responses of wheat plants under stress. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27007891> (accessed 6.8.19).
- Chang-Quan, W., Rui-Chang, L., 2008. Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol-induced water stress. *Acta Physiol. Plant.* 30, 841. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0189-8>
- Chaum, S., Kirdmanee, C., 2010. Effect of glycinebetaine on proline, water use, and photosynthetic efficiencies, and growth of rice seedlings under salt stress. *Turk. J. Agric. For.* 34, 517–527.

- Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann. Bot.* 103, 551–560.
- Cheeseman, J.M., 1982. Pump-leak sodium fluxes in low salt corn roots. *J. Membr. Biol.* 70, 157–164. <https://doi.org/10.1007/BF01870225>
- Chen, W.P., Li, P.H., 2002. Membrane stabilization by abscisic acid under cold aids proline in alleviating chilling injury in maize (*Zea mays* L.) cultured cells. *Plant Cell Environ.* 25, 955–962.
- Chen, Z., Pottosin, I.I., Cuin, T.A., Fuglsang, A.T., Tester, M., Jha, D., Zepeda-Jazo, I., Zhou, M., Palmgren, M.G., Newman, I.A., Shabala, S., 2007. Root Plasma Membrane Transporters Controlling K⁺/Na⁺ Homeostasis in Salt-Stressed Barley. *PLANT Physiol.* 145, 1714–1725. <https://doi.org/10.1104/pp.107.110262>
- Chhipa, B., Lal, P., 1995. Na⁺/K⁺ ratio as the basis of salt tolerance in wheat. *Aust. J. Agric. Res.* - *AUST J AGR RES* 46. <https://doi.org/10.1071/AR9950533>
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.-K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45, 437–448.
- Chorfi, A., Taibi, K., 2011. Physiological behavior of wheat genotypes from Algerian semi-arid regions grown under salt stress. *Afr. J. Agric. Res.* 5, 636–641.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S., Sompornpailin, K., 2011. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in '*Oryza sativa*' L. spp. '*indica*'. *Aust. J. Crop Sci.* 5, 1191.
- Clarke, J.M., McCaig, T.N., 1982. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Sci.* 22, 503–506.
- Close, T.J., 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol. Plant.* 97, 795–803. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x>
- Close, T.J., Kortt, A.A., Chandler, P.M., 1989. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.* 13, 95–108.
- Colmer, T.D., Flowers, T.J., Munns, R., 2006a. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 57, 1059–1078.
- Colmer, T.D., Flowers, T.J., Munns, R., 2006b. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 57, 1059–1078. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj124>
- Come, D., 1970. Les Obstacles à la Germination. *Publ. Société Linn. Lyon* 40, 108–108.
- Corwin, D.L., Rhoades, J.D., Šimůnek, J., 2007. Leaching requirement for soil salinity control: Steady-state versus transient models. *Agric. Water Manag.* 90, 165–180. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2007.02.007>
- Cuin, T.A., Betts, S.A., Chalmandrier, R., Shabala, S., 2008. A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *J. Exp. Bot.* 59, 2697–2706. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern128>
- Cuin, T.A., Shabala, S., 2005. Exogenously supplied compatible solutes rapidly ameliorate NaCl-induced potassium efflux from barley roots. *Plant Cell Physiol.* 46, 1924–1933. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci205>
- Dajic Stevanovic, Z., 2006. Salt stress, in: *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, pp. 41–99.
- Dar, M., Khan, F., Rehman, F., 2016. Responses of Antioxidative Defense System and Composition of Photosynthetic Pigments in *Brassica juncea* L. upon Imidacloprid Treatments. *J. Abiotic Biot. Stress* 1. <https://doi.org/10.17582/journal.absjournal/2015/1.1.3.15>
- Datta, J.K., Nag, S., Banerjee, A., Mondai, N.K., 2009a. Impact of salt stress on five varieties of Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 13. <https://doi.org/10.4314/jasem.v13i3.55372>
- Datta, J.K., Nag, S., Banerjee, A., Mondai, N.K., 2009b. Impact of salt stress on five varieties of Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. *J. Appl. Sci. Environ. Manag.* 13.
- de Carvalho, K., de Campos, M.K.F., Domingues, D.S., Pereira, L.F.P., Vieira, L.G.E., 2013. The accumulation of endogenous proline induces changes in gene expression of several antioxidant enzymes in leaves of transgenic Swingle citrumelo. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3269–3279. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2402-5>

- Deby-Dupont, G., Deby, C., Lamy, M., 2002. Données actuelles sur la toxicité de l'oxygène. *ditions scientifiques et médicales Elsevier SAS* 11, 28–39.
- Deivanai, S., Xavier, R., Vinod, V., Timalata, K., Lim, O.F., 2011. Role of Exogenous Proline in Ameliorating Salt Stress at Early Stage in Two Rice Cultivars. *J. Stress Physiol. Biochem.* 7, 157–174.
- Delatorre-Herrera, J., Pinto, M., 2009. IMPORTANCE OF IONIC AND OSMOTIC COMPONENTS OF SALT STRESS ON THE GERMINATION OF FOUR QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) SELECTIONS 477–485.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993a. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215–223.
- Delauney, A.J., Verma, D.P.S., 1993b. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215–223.
- Demiral, T., Türkan, I., 2006. Exogenous glycinebetaine affects growth and proline accumulation and retards senescence in two rice cultivars under NaCl stress. *Environ. Exp. Bot.* 56, 72–79.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., Leister, D., van der Graaff, E., Kunze, R., Frommer, W.B., 2004. The role of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *Plant Cell Online* 16, 3413–3425.
- Deuschle, K., Funck, D., Hellmann, H., Däschner, K., Binder, S., Frommer, W.B., 2001. A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 27, 345–356.
- Di Martino, C., Delfine, S., Pizzuto, R., Loreto, F., Fuggi, A., 2003. Free Amino Acids and Glycine Betaine in Leaf Osmoregulation of Spinach Responding to Increasing Salt Stress. *New Phytol.* 158, 455–463.
- Dib, T.A., Monneveux, P., Araus, J., 1992. Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. II. Caractères physiologiques d'adaptation. *Agronomie* 12, 381.
- Dionisio-Sese, M.L., Tobita, S., 2000. Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 157, 54–58. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80135-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80135-2)
- Dionisio-Sese, M.L., Tobita, S., 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00025-9)
- Durand, G., Beaudoux, J.-L., 2011. *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives.* Lavoisier.
- Dure, L., Greenway, S.C., Galau, G.A., 1981. Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20, 4162–4168.
- El-Bassiouny, H.M.S., Bekheta, M.A., 2005. Effect of Salt Stress on Relative Water Content, Lipid Peroxidation, Polyamines, Amino Acids and Ethylene of Two Wheat Cultivars 363–368.
- Elthon, T.E., Stewart, C.R., 1981. Submitochondrial Location and Electron Transport Characteristics of Enzymes Involved in Proline Oxidation. *Plant Physiol.* 67, 780–784. <https://doi.org/10.1104/pp.67.4.780>
- Esfandiari, E., Shekari, Fariborz, Shekari, Farid, Esfandiari, M., 2007. THE EFFECT OF SALT STRESS ON ANTIOXIDANT ENZYMES' ACTIVITY AND LIPID PEROXIDATION ON THE WHEAT SEEDLING 9.
- Eyidoğan, F., Öktem, H.A., Yücel, M., 2003. Superoxide dismutase activity in salt stressed wheat seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 25, 263–269. <https://doi.org/10.1007/s11738-003-0007-2>
- Fabro, G., Kovács, I., Pavet, V., Szabados, L., Alvarez, M.E., 2004. Proline accumulation and AtP5CS2 gene activation are induced by plant-pathogen incompatible interactions in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 17, 343–350. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.4.343>
- Farquharson, K.L., 2009. Targeted Overexpression of a Sodium Transporter in the Root Stele Increases Salinity Tolerance. *Plant Cell* 21, 1875. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.210710>
- Favier, A., 2003. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques l'actualité chimique* 8.
- Feki, K., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Masmoudi, K., 2011. Regulation of durum wheat Na⁺/H⁺ exchanger TdSOS1 by phosphorylation. *Plant Mol. Biol.* 76, 545–556. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9787-8>

- Fercha, A., 2011. Some Physiological and Biochemical Effects of NaCl Salinity on Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.). *Adv. Biol. Res.* 5, 315–322.
- Fichman, Y., Gerdes, S.Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., Csonka, L.N., 2015. Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biol. Rev.* 90, 1065–1099. <https://doi.org/10.1111/brv.12146>
- Flowers, T.J., Dalmond, D., 1992. Protein synthesis in halophytes: The influence of potassium, sodium and magnesium in vitro. *Plant Soil* 146, 153–161. <https://doi.org/10.1007/BF00012008>
- Funck, D., Eckard, S., Müller, G., 2010. Non-redundant functions of two proline dehydrogenase isoforms in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 10, 70. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-70>
- Gagneul, D., Ainouche, A., Duhaze, C., Lugan, R., Larher, F.R., Bouchereau, A., 2007. A Reassessment of the Function of the So-Called Compatible Solutes in the Halophytic Plumbaginaceae *Limonium latifolium*. *PLANT Physiol.* 144, 1598–1611. <https://doi.org/10.1104/pp.107.099820>
- Gerdakaneh, M., Mozafari, A., Khalighi, A., Sioseh-Mardah, A., 2010. The effects of exogenous proline and osmotic stress on morpho-biochemical parameters of strawberry callus. *Afr. J. Biotechnol.* 9, 3775–3779.
- Ghassemi, F., Jakeman, A.J., Nix, H.A., 1995. Salinisation of land and water resources. Human causes, extent, management and case studies.
- Gierth, M., Mäser, P., 2007. Potassium transporters in plants – Involvement in K⁺ acquisition, redistribution and homeostasis. *FEBS Lett.* 581, 2348–2356. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.035>
- Gleeson, D., Lelu-Walter, M.-A., Parkinson, M., 2005. Overproduction of proline in transgenic hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea* (Dengler)) cultures renders them tolerant to cold, salt and frost. *Mol. Breed.* 15, 21–29. <https://doi.org/10.1007/s11032-004-1363-3>
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., Probst, N., 2014. Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00151>
- Golldack, D., Lüking, I., Yang, O., 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep.* 30, 1383–1391. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1068-0>
- Gong, Q., Li, P., Ma, S., Rupassara, S.I., Bohnert, H.J., 2005. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 44, 826–839. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02587.x>
- Greenway, H., Munns, R., 1980. MECHANISMS OF SALT TOLERANCE IN NONHALOPHYTES 149–190.
- Grelet, J., Benamar, A., Teyssier, E., Avelange-Macherel, M.-H., Grunwald, D., Macherel, D., 2005. Identification in Pea Seed Mitochondria of a Late-Embryogenesis Abundant Protein Able to Protect Enzymes from Drying. *Plant Physiol.* 137, 157–167. <https://doi.org/10.1104/pp.104.052480>
- Guo, S., Ma, X., Cai, W., Wang, Y., Gao, X., Fu, B., Li, S., 2022. Exogenous Proline Improves Salt Tolerance of Alfalfa through Modulation of Antioxidant Capacity, Ion Homeostasis, and Proline Metabolism. *Plants* 11, 2994. <https://doi.org/10.3390/plants11212994>
- Gupta, A.K., Kaur, N., 2005. Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *J. Biosci.* 30, 761–776.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., Chapelle, J.P., 2007. Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 62, 628–638.
- Halitim, A., 1985. Contribution a l'étude des sols des zones arides (hautes plaines steppiques de l'algerie) : morphologie, distribution et role des sels dans la genese et le comportement des sols - Sécheresse [WWW Document]. URL <http://www.secheresse.info/spip.php?article7604> (accessed 1.1.20).
- Halliwell, B., 2006. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *PLANT Physiol.* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Hamamoto, S., Horie, T., Hauser, F., Deinlein, U., Schroeder, J.I., Uozumi, N., 2015. HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. *Curr. Opin.*

- Biotechnol., Food Biotechnology • Plant Biotechnology 32, 113–120.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.025>
- Hamdia, M.A., Shaddad, M.A.K., 2010. Salt tolerance of crop plants. *J. Stress Physiol. Biochem.* 6, 64–90.
- Hamilton, E.W., Heckathorn, S.A., 2001. Mitochondrial Adaptations to NaCl. Complex I Is Protected by Anti-Oxidants and Small Heat Shock Proteins, Whereas Complex II Is Protected by Proline and Betaine. *Plant Physiol.* 126, 1266–1274.
- Han, K.H., Hwang, C.H., 2003. Salt tolerance enhanced by transformation of a P5CS gene in carrot. *J Plant Biotech* 5, 149–153.
- Hanana, M., Cagnac, O., Zarrouk, M., Blumwald, E., 2009. Rôles biologiques des antiports vacuolaires NHX : acquis et perspectives d’amélioration génétique des plantes. *Botany* 87, 1023–1035.
<https://doi.org/10.1139/B09-073>
- Hanana, M., Hamrouni, L., Cagnac, O., Blumwald, E., 2011. Mecanismes et strategies cellulaires de tolerance a salinite (NaCl) chez les plantes. *Environ. Rev.* 19. <https://doi.org/10.1139/a11-003>
- Hanin, M., Brini, F., Ebel, C., Toda, Y., Takeda, S., Masmoudi, K., 2011. Plant dehydrins and stress tolerance. *Plant Signal. Behav.* 6, 1503–1509. <https://doi.org/10.4161/psb.6.10.17088>
- Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L., Masmoudi, K., 2016. New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01787>
- Hanson, A.D., Peacock, W.J., Evans, L.T., Arntzen, C.J., Khush, G.S., 1990. Drought resistance in rice. *Nature* 345, 26–27. <https://doi.org/10.1038/345026b0>
- Hara, M., Fujinaga, M., Kuboi, T., 2004. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 42, 657–662.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.06.004>
- Hare, P.D., Cress, W.A., 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regul.* 21, 79–102.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J., 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21, 535–553. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1998.00309.x>
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M., 2013. Plant Response to Salt Stress and Role of Exogenous Protectants to Mitigate Salt-Induced Damages, in: Ahmad, P., Azooz, M.M., Prasad, M.N.V. (Eds.), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer New York, New York, NY, pp. 25–87. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4747-4_2
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 51, 463–499.
- Hassine, A., Ghanem, M., Bouzid, S., 2008. An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *J. Exp. Bot.* 59, 1315–26.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ern040>
- Hayano-Kanashiro, C., Calderón-Vázquez, C., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Simpson, J., 2009. Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS One* 4, e7531.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007531>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* 7, 1456–1466.
<https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198.
[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hechenberger, M., Schwappach, B., Fischer, W.N., Frommer, W.B., Jentsch, T.J., Steinmeyer, K., 1996. A Family of Putative Chloride Channels from *Arabidopsis* and Functional Complementation of a Yeast Strain with a *CLC* Gene Disruption. *J. Biol. Chem.* 271, 33632–33638.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33632>

- Heidari, M., 2009. Antioxidant Activity and Osmolyte Concentration of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Wheat (*Triticum aestivum*) Genotypes under Salinity Stress. *Asian J. Plant Sci.*
- Hellmann, H., Funck, D., Rentsch, D., Frommer, W.B., 2000. Hypersensitivity of an *Arabidopsis* sugar signaling mutant toward exogenous proline application. *Plant Physiol.* 122, 357–368.
- Hmida-Sayari, A., Gargouri-Bouزيد, R., Bidani, A., Jaoua, L., Savouré, A., Jaoua, S., 2005. Overexpression of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Sci.* 169, 746–752.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A., Buitink, J., 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138501020520> (accessed 5.16.19).
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., Verma, D.P., 2000. Removal of feedback inhibition of delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiol.* 122, 1129–1136. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1129>
- Hoque, M.A., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2008. Proline and glycinebetaine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* 165, 813–824. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.07.013>
- Hoque, M.A., Banu, M.N.A., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2007a. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco Bright Yellow-2 suspension-cultured cells. *J. Plant Physiol.* 164, 1457–1468.
- Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, M.N.A., Nakamura, Y., Shimoishi, Y., Murata, Y., 2007b. Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *J. Plant Physiol.* 164, 553–561. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.03.010>
- Horie, T., Brodsky, D.E., Costa, A., Kaneko, T., Lo Schiavo, F., Katsuhara, M., Schroeder, J.I., 2011. K⁺ Transport by the OsHKT2;4 Transporter from Rice with Atypical Na⁺ Transport Properties and Competition in Permeation of K⁺ over Mg²⁺ and Ca²⁺ Ions. *PLANT Physiol.* 156, 1493–1507. <https://doi.org/10.1104/pp.110.168047>
- Horie, T., Hauser, F., Schroeder, J.I., 2009. HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Sci.* 14, 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.08.009>
- Hossain, M.A., Fujita, M., 2010. Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 16, 19–29.
- Hossain, M.A., Hasanuzzaman, M., Fujita, M., 2011a. Coordinate induction of antioxidant defense and glyoxalase system by exogenous proline and glycinebetaine is correlated with salt tolerance in mung bean. *Front. Agric. China* 5, 1–14.
- Hossain, M.A., Silva, J.A.T. da, Fujita, M., 2011b. Glyoxalase System and Reactive Oxygen Species Detoxification System in Plant Abiotic Stress Response and Tolerance: An Intimate Relationship. *Abiotic Stress Plants - Mech. Adapt.* <https://doi.org/10.5772/22421>
- Hosseinfard, M., Stefaniak, S., Ghorbani Javid, M., Soltani, E., Wojtyła, Ł., Garnczarska, M., 2022. Contribution of Exogenous Proline to Abiotic Stresses Tolerance in Plants: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 5186. <https://doi.org/10.3390/ijms23095186>
- Houimli, S.I., Denden, M., El Hadj, S.B., 2008. Induction of salt tolerance in pepper (*Capsicum annuum*) by 24-epibrassinolide. *EurAsian J. Biosci. Elektron.* 0, 83–90.
- Hu, C.A., Delauney, A.J., Verma, D.P., 1992. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 9354–9358.
- Hua-long, L., Han-jing, S., Jing-guo, W., Yang, L., De-tang, Z., Hong-wei, Z., 2014. Effect of Seed Soaking with Exogenous Proline on Seed Germination of Rice Under Salt Stress. *J. Northeast Agric. Univ. Engl. Ed.* 21, 1–6. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(14\)60062-3](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(14)60062-3)

- Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., James, R.A., Platten, J.D., Dennis, E.S., Munns, R., 2006. A Sodium Transporter (HKT7) Is a Candidate for Nax1, a Gene for Salt Tolerance in Durum Wheat. *Plant Physiol.* 142, 1718–1727. <https://doi.org/10.1104/pp.106.088864>
- Huang, S., Spielmeier, W., Lagudah, E.S., Munns, R., 2008. Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *J. Exp. Bot.* 59, 927–937. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern033>
- Huang, Y., Bie, Z., Liu, Z., Zhen, A., Wang, W., 2009. Protective role of proline against salt stress is partially related to the improvement of water status and peroxidase enzyme activity in cucumber. *Soil Sci. Plant Nutr.* 55, 698–704.
- Hundertmark, M., Hincha, D.K., 2008. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-118>
- Hur, J., Jung, K.-H., Lee, C.-H., An, G., 2004. Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci.* 167, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.009>
- Hussain, K., Nawaz, K., Majeed, A., Khan, F., Lin, F., Ghani, A., Raza, G., Afghan, S., Zia-ul-Hussain, S., Ali, K., others, 2010. Alleviation of salinity effects by exogenous applications of salicylic acid in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) seedlings. *Afr J Biotechnol* 9, 8602–8607.
- Ibragimova, S.S., Kolodyazhnaya, Ya.S., Gerasimova, S.V., Kochetov, A.V., 2012. Partial suppression of gene encoding proline dehydrogenase enhances plant tolerance to various abiotic stresses. *Russ. J. Plant Physiol.* 59, 88–96. <https://doi.org/10.1134/S1021443712010086>
- Ignatova, Z., Gierasch, L.M., 2006. Inhibition of protein aggregation in vitro and in vivo by a natural osmoprotectant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13357–13361.
- INSID, 2008. LES SOLS SALINS EN ALGERIE 7.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C.-S., Shi, W., Zhu, J.-K., n.d. SOS3 Function in Plant Salt Tolerance Requires N-Myristoylation and Calcium Binding 12.
- Islam, M.M., Hoque, M.A., Okuma, E., Banu, M.N.A., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Murata, Y., 2009. Exogenous proline and glycinebetaine increase antioxidant enzyme activities and confer tolerance to cadmium stress in cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* 166, 1587–1597.
- Iyer, S., Caplan, A., 1998. Products of Proline Catabolism Can Induce Osmotically Regulated Genes in Rice. *Plant Physiol.* 116, 203–211.
- James, R.A., Blake, C., Byrt, C.S., Munns, R., 2011. Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *J. Exp. Bot.* 62, 2939–2947. <https://doi.org/10.1093/jxb/err003>
- James, R.A., Davenport, R.J., Munns, R., 2006. Physiological Characterization of Two Genes for Na⁺ Exclusion in Durum Wheat, Nax1 and Nax2. *PLANT Physiol.* 142, 1537–1547. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086538>
- Jamil, M., Deog Bae, L., Kwang Yong, J., Ashraf, M., Sheong Chun, L., Eui Shik, R., 2006. EFFECT OF SALT (NaCl) STRESS ON GERMINATION AND EARLY SEEDLING GROWTH OF FOUR VEGETABLES SPECIES. *J. Cent. Eur. Agric.* 7, 273–282.
- Jérémie Diédhiou, C., 2006. Mechanisms of salt tolerance : sodium, chloride and potassium homeostasis in two rice lines with different tolerance to salinity stress. *Bielef. Ger. Bielef. Univ.*
- Ji-Bao, C., LiYing, Z., XinGuo, M., ShuMin, W., RuiLian, W., 2010. Response of PvP5CS1 transgenic *Arabidopsis* plants to drought-and salt-stress. *Acta Agron Sin* 36, 147–153.
- Jin, Z.M., Wang, C.H., Liu, Z.P., Gong, W.J., 2007. Physiological and ecological characters studies on *Aloe vera* under soil salinity and seawater irrigation. *Process Biochem.* 42, 710–714. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.11.002>
- Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R., Parida, A.K., 2006. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *J. Genet.* 85, 237–254.
- Julkowska, M.M., Testerink, C., 2015. Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci.* 20, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.06.008>
- Kadri, K., Maalam, S., Cheikh, M.H., Benabdallah, A., Rahmoune, C., Naceur, M.B., 2009. EFFET DU STRESS SALIN SUR LA GERMINATION, LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION EN GRAINS DE

- QUELQUES ACCESSIONS TUNISIENNES D'ORGE (*HORDEUM VULGARE*L.). Sci. Technol. C 0, 72–79.
- Kahlaoui, B., Hachicha, M., Misle, E., Fidalgo, F., Teixeira, J., 2016. Physiological and biochemical responses to the exogenous application of proline of tomato plants irrigated with saline water. J. Saudi Soc. Agric. Sci. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.12.002>
- Kahlaoui, B., Hachicha, M., Teixeira, J., Misle, E., Fidalgo, F., Hanchi, B., 2013. Response of two tomato cultivars to field-applied proline and salt stress. J. Stress Physiol. Biochem. 9.
- Kavi, P.B., Hima Kumari, P., Sunita, M.S.L., Sreenivasulu, N., 2015. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. Front. Plant Sci. 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00544>
- Kavi, P.B.K., Sangam, S., Amrutha, R.N., Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., Sreenivasulu, N., 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Curr. Sci. 88, 424–438.
- Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., Shen, J.-R., 2009. Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 8567–8572. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812797106>
- Kaya, C., Tuna, A., Yokaş, I., 2009. The Role of Plant Hormones in Plants Under Salinity Stress. pp. 45–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9065-3_5
- Kaya, C., Tuna, A.L., Ashraf, M., Altunlu, H., 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. Environ. Exp. Bot. 60, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.12.008>
- Khalil, S.E., El-Noemani, A.A., 2012. Effect of irrigation intervals and exogenous proline application in improving tolerance of garden cress plant (*Lepidium sativum* L.) to water stress. J. Appl. Sci. Res. 8, 157–167.
- Khan, M.I.R., Asgher, M., Khan, N.A., 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). Plant Physiol. Biochem. PPB 80, 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.03.026>
- Khanna-Chopra, R., Semwal, V., Lakra, N., Pareek, A., 2019. Proline – A Key Regulator Conferring Plant Tolerance to Salinity and Drought. pp. 59–80. <https://doi.org/10.1201/9780203705315-5>
- Khedr, A.H.A., Abbas, M.A., Wahid, A.A.A., Quick, W.P., Abogadallah, G.M., 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. J. Exp. Bot. 54, 2553–2562. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg277>
- Kiran Kumar Ghanti, S., Sujata, K.G., Vijay Kumar, B.M., Nataraja Karba, N., Janardhan Reddy, K., Srinath Rao, M., Kavi Kishor, P.B., 2011. Heterologous expression of P5CS gene in chickpea enhances salt tolerance without affecting yield. Biol. Plant. 55, 634. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0161-0>
- Kishor, P., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C., Verma, D., 1995. Overexpression of [delta]-Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants. Plant Physiol. 108, 1387–1394. <https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1387>
- Kishor, P.B.K., Sreenivasulu, N., 2014. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? Plant Cell Environ. 37, 300–311. <https://doi.org/10.1111/pce.12157>
- Kiyosue, T., Yoshida, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. Plant Cell 8, 1323–1335. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1323>
- Knight, H., Trewavas, A.J., Knight, M.R., 1997. Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity. Plant J. Cell Mol. Biol. 12, 1067–1078. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.12051067.x>
- Kolodyazhnaya, Ya.S., Titov, S.E., Kochetov, A.V., Komarova, M.L., Romanova, A.V., Koval', V.S., Shumny, V.K., 2006. Evaluation of salt tolerance in *Nicotiana tabacum* plants bearing an

- antisense suppressor of the proline dehydrogenase gene. *Russ. J. Genet.* 42, 212–214. <https://doi.org/10.1134/S1022795406020153>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Prášil, I.T., 2014. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity – what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Front. Plant Sci.* 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00343>
- Kronzucker, H.J., Coskun, D., Schulze, L.M., Wong, J.R., Britto, D.T., 2013. Sodium as nutrient and toxicant. *Plant Soil* 369, 1–23. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1801-2>
- Kumar, N., Pal, M., Singh, A., SaiRam, R.K., Srivastava, G.C., 2010. Exogenous proline alleviates oxidative stress and increase vase life in rose (*Rosa hybrida* L. 'Grand Gala'). *Sci. Hortic.* 127, 79–85.
- Kumar, T.K., Samuel, D., Jayaraman, G., Srimathi, T., Yu, C., 1998. The role of proline in the prevention of aggregation during protein folding in vitro. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46, 509–517. <https://doi.org/10.1080/15216549800204032>
- Kumar, V., Shriram, V., Anwar Hossain, M., B. Kavi Kishor, P., 2015. Engineering proline metabolism for enhanced plant salt stress tolerance.
- Lacan, D., Durand, M., 1995. Na⁺ and K⁺ transport in excised soybean roots. *Physiol. Plant.* 93, 132–138. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1995.930119.x>
- Lee, B.-R., Jin, Y.L., Avice, J.-C., Cliquet, J.-B., Ourry, A., Kim, T.-H., 2009. Increased proline loading to phloem and its effects on nitrogen uptake and assimilation in water-stressed white clover (*Trifolium repens*). *New Phytol.* 182, 654–663. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02795.x>
- Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2010. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids* 39, 949–962. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0525-3>
- Lehmann, S., Gumy, C., Blatter, E., Boeffel, S., Fricke, W., Rentsch, D., 2011. In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *J. Exp. Bot.* 62, 787–796. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq320>
- Leverve, X., 2009. Cahiers de Nutrition et de Diététique - Présentation - EM consulte [WWW Document]. URL <https://www.em-consulte.com/article/232781/figures/stress-oxydant-et-antioxydants> (accessed 5.14.19).
- Levitt, J., 1980. Responses of Plant to Environmental Stress : water, radiation, salt and others stresses, in: *Physiological Ecology*. p. 607.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F., 2013. Proline Mechanisms of Stress Survival. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, in: *Methods in Enzymology, Plant Cell Membranes*. Academic Press, pp. 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Liu, J., Zhu, J.-K., 1997. Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 114, 591–596.
- Liu, Y.-Z., Chen, J.-K., Li, Z.-P., Zhao, T., Ni, M., Li, D.-J., Jiang, C.-L., Shen, F.-M., 2014. High-salt diet enhances hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 114, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.04.010>
- Lone, M.I., Kueh, J.S.H., Jones, R.W., Bright, S.W.J., 1987. Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *J. Exp. Bot.* 38, 479–490.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Ma, L., Zhou, E., Gao, L., Mao, X., Zhou, R., Jia, J., 2008. Isolation, expression analysis and chromosomal location of P5CR gene in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *South Afr. J. Bot.* 74, 705–712. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.05.003>
- Maghsoudi, K., Emam, Y., Niazi, A., Pessaraki, M., Arvin, M.J., 2018. P5CS expression level and proline accumulation in the sensitive and tolerant wheat cultivars under control and drought stress conditions in the presence/absence of silicon and salicylic acid. *J. Plant Interact.* 13, 461–471. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1506516>

- Mahboob, W., Khan, A., Shirazi, M., 2016. Induction of salt tolerance in wheat (*Triticum Aestivum* L.) seedlings through exogenous application of proline. *Pak. J. Bot.* 48, 861–867.
- Majumder, A.L., Sengupta, S., Goswami, L., 2009. Osmolyte Regulation in Abiotic Stress. *Abiotic Stress Adapt. Plants* 349–370. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3112-9_16
- Mallek-Maalej, E., Boulasnem, F., Ben Salem, M., 1998. Effet de la salinité sur la germination de graines de céréales cultivées en Tunisie. *Cah. Agric.* 2, 153–156.
- Manchanda, G., Garg, N., 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Acta Physiol. Plant.* 30, 595–618. <https://doi.org/10.1007/s11738-008-0173-3>
- Mane, A.V., Karadge, B.A., Samant, J.S., 2011. Salt stress induced alteration in growth characteristics of a grass *Pennisetum alopecuroides*. *J. Environ. Biol.* 32, 753–758.
- Mani, S., Cotte, B.V. de, Montagu, M.V., Verbruggen, N., 2002. Altered Levels of Proline Dehydrogenase Cause Hypersensitivity to Proline and Its Analogs in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 128, 73–83. <https://doi.org/10.1104/pp.010572>
- Mansour, M.M.F., Ali, E.F., 2017. Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry* 140, 52–68. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>
- Masmoudi, K., Brini, F., Hassairi, A., Ellouz, R., 2001. Isolation and characterization of a differentially expressed sequence tag from *Triticum durum* salt-stressed roots. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 971–979. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01315-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01315-8)
- Matsumura, T., Sakakibara, H., Nakano, R., Kimata, Y., Sugiyama, T., Hase, T., 1997. A Nitrate-Inducible Ferredoxin in Maize Roots (Genomic Organization and Differential Expression of Two Nonphotosynthetic Ferredoxin Isoproteins). *Plant Physiol.* 114, 653–660. <https://doi.org/10.1104/pp.114.2.653>
- Mattioli, R., Falasca, G., Sabatini, S., Altamura, M.M., Costantino, P., Trovato, M., 2009. The proline biosynthetic genes P5CS1 and P5CS2 play overlapping roles in *Arabidopsis* flower transition but not in embryo development. *Physiol. Plant.* 137, 72–85. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01261.x>
- Mattioni, C., Lacerenza, N.G., Troccoli, A., De Leonardis, A.M., Di Fonzo, N., 1997. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol. Plant.* 101, 787–792. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01064.x>
- Matysik, J., Alia, Bhalu, B., Mohanty, P., 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 82, 525–532.
- Medeiros, M., Silva, M., Granja, M., Silva-Junior, G., Camara, T., Willadino, L., 2014. Effect of exogenous proline in two sugarcane genotypes grown in vitro under salt stress. *Acta Biológica Colomb.* 20. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.42830>
- Mekhlouf, A., Bouzerzour, H., Benmahammed, A., Abdelkarim, H.S., Harkati, N., 2006. Adaptation des variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) au climat semi-aride 17, 507–13. <https://doi.org/10.1684/sec.2006.0054>
- Mian, A.A., Senadheera, P., Maathuis, F.J.M., 2011. Improving Crop Salt Tolerance: Anion and Cation Transporters as Genetic Engineering Targets 9.
- Miège, É., 1950. Les principales espèces et variétés de Blé cultivées en Afrique du Nord. *J. Agric. Tradit. Bot. Appliquée* 30, 16–38. <https://doi.org/10.3406/jatba.1950.6290>
- Miller, G., Honig, A., Stein, H., Suzuki, N., Mittler, R., Zilberstein, A., 2009. Unraveling Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate-Proline Cycle in Plants by Uncoupled Expression of Proline Oxidation Enzymes. *J. Biol. Chem.* 284, 26482–26492. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009340>
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33, 453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Breusegem, F.V., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.08.009>
- Mohammadkhani, N., Heidari, R., 2008. Drought-induced Accumulation of Soluble Sugars and Proline in Two Maize Varieties 3.

- Molazem, D., Qurbanov, E.M., Dunyamaliyev, S.A., 2010. Role of proline, Na and chlorophyll content in salt tolerance of corn (*Zea mays* L.). *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 9, 319–324.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Besspalhok Filho, J.C., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Leite Junior, R.P., Pereira, L.F.P., Vieira, L.G.E., 2004. Osmotic adjustment in transgenic citrus rootstock Carrizo citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* L. Raf.) overproducing proline. *Plant Sci.*
- Monneveux, P., Nemmar, M., 1986. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.): étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie* 6, 583–590.
- Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167, 645–663. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x>
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25, 239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns, R., Hare, R.A., James, R.A., Rebetzke, G.J., 2000. Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Aust. J. Agric. Res.* 51, 69–74. <https://doi.org/10.1071/AR99057>
- Munns, R., James, R.A., Islam, A.K.M.R., Malik, A.I., Colmer, T.D., 2008. Sodium excluding genes from durum wheat and sea barleygrass improve sodium exclusion of bread wheat.
- Munns, R., James, R.A., Läuchli, A., 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57, 1025–1043. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj100>
- Munns, R., James, R.A., Sirault, X.R.R., Furbank, R.T., Jones, H.G., 2010. New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *J. Exp. Bot.* 61, 3499–3507. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq199>
- Munns, R., James, R.A., Xu, B., Athman, A., Conn, S.J., Jordans, C., Byrt, C.S., Hare, R.A., Tyerman, S.D., Tester, M., Plett, D., Gilliam, M., 2012. Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nat. Biotechnol.* 30, 360–364. <https://doi.org/10.1038/nbt.2120>
- Munns, R., Schachtman, D., Condon, A., 1995. The Significance of a Two-Phase Growth Response to Salinity in Wheat and Barley. *Funct. Plant Biol.* 22, 561–569.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911>
- Nagesh Babu, R., Devaraj, V.R., 2008. High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Aust J Crop Sci* 2, 40–48.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshihara, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1999. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 461, 205–210.
- Nawaz, K., 2007. Alleviation of the adverse effects of salinity stress on maize (*Zea mays* L.) by exogenous application of glycine betaine. UNIVERSITY OF AGRICULTURE FAISALABAD.
- Nawaz, K., Talat, A., Hussain, K., Majeed, A., 2010. Induction of salt tolerance in two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) by exogenous application of proline at seedling stage. *World Appl. Sci. J.* 10, 93–99.
- Nemati, I., Moradi, F., Gholizadeh, S., Esmaili, M.A., Bihamta, M.R., 2011. The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environ.* 57, 26–33. <https://doi.org/10.17221/71/2010-PSE>
- Nessim, M.G., Hussein, M.A., Moussa, A.A., 2009. The effects of irrigation water salinity, potassium nitrate fertilization, proline spraying and leaching fraction on the growth and chemical composition of corn grown in calcareous soil.
- Nounjan, N., Nghia, P.T., Theerakulpisut, P., 2012. Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *J. Plant Physiol.* 169, 596–604.
- Nounjan, N., Theerakulpisut, P., 2012. Effects of Exogenous proline and trehalose on physiological responses in rice seedlings during salt-stress and after recovery | N. Nounjan | Request PDF [WWW Document]. ResearchGate. <http://dx.doi.org/10.17221/762/2011-PSE>

- Oh, S.-J., 2005. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. *PLANT Physiol.* 138, 341–351. <https://doi.org/10.1104/pp.104.059147>
- Okuma, E., Murakami, Y., Shimoishi, Y., Tada, M., Murata, Y., 2004. Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 50, 1301–1305.
- Okuma, E., Soeda, K., Tada, M., Murata, Y., 2000. Exogenous proline mitigates the inhibition of growth of *Nicotiana tabacum* cultured cells under saline conditions. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 257–263.
- Omami, E.N., 2005. Response of Amaranth to salinity stress 255.
- Ondrasek, G., Rengel, Z., Veres, S., 2011. Soil Salinisation and Salt Stress in Crop Production. *Abiotic Stress Plants - Mech. Adapt.* <https://doi.org/10.5772/22248>
- Orsini, F., 2008. Unravelling salt stress tolerance: physiological, morphological and genetic components in crop species and model plants [WWW Document]. <https://doi.org/10.6092/UNINA/FEDOA/2011>
- Ozden, M., Demirel, U., Kahraman, A., 2009. Effects of proline on antioxidant system in leaves of grapevine (*Vitis vinifera* L.) exposed to oxidative stress by H₂O₂. *Sci. Hort.* 119, 163–168.
- Paleg, L.G., Douglas, T.J., Daal, A. van, Keech, D.B., 1981. Proline, betaine and other organic solutes protect enzymes against heat inactivation. *Aust. J. Plant Physiol.*
- Pang, C.-H., Wang, B.-S., 2008. Oxidative Stress and Salt Tolerance in Plants, in: Lüttge, U., Beyschlag, W., Murata, J. (Eds.), *Progress in Botany*, Progress in Botany. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 231–245. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72954-9_9
- Parida, A., Das, A.B., Das, P., 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins, and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* 45, 28–36. <https://doi.org/10.1007/BF03030429>
- Parida, A.K., Dagaonkar, V.S., Phalak, M.S., Aurangabadkar, L.P., 2008. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. *Acta Physiol. Plant.* 30, 619–627.
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 324–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Parvaiz, A., Satyawati, S., 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants – a review. *Plant Soil Environ.* 54, 89–99. <https://doi.org/10.17221/2774-PSE>
- Patade, V.Y., Lokhande, V.H., Suprasanna, P., 2014. Exogenous Application of Proline Alleviates Salt Induced Oxidative Stress More Efficiently than Glycine Betaine in Sugarcane Cultured Cells. *Sugar Tech* 16, 22–29. <https://doi.org/10.1007/s12355-013-0261-6>
- Peng, Z., Lu, Q., Verma, D.P.S., 1996. Reciprocal regulation of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Mol. Gen. Genet.* MGG 253, 334–341.
- Per, T.S., Khan, N.A., Reddy, P.S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M.I.R., Anjum, N.A., 2017. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant Physiol. Biochem.* PPB 115, 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.018>
- Petrollino, D., 2010. STUDIO SUL RUOLO DELL'ACIDO Δ 1-PIRROLIN-5-CARBOSSILICO NEI FENOMENI DI TOSSICITÀ INDOTTA DA PROLINA IN ARABIDOPSIS THALIANA. (phd). Università degli Studi di Ferrara. http://eprints.unife.it/310/1/Petrollino_2010.pdf
- Phang, J.M., 2012. The Proline Regulatory Axis and Cancer. *Front. Oncol.* 2. <https://doi.org/10.3389/fonc.2012.00060>
- Phang, J.M., 1985. The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Curr. Top. Cell. Regul.* 25, 91–132.
- Platten, J.D., Cotsaftis, O., Berthomieu, P., Bohnert, H., Davenport, R.J., Fairbairn, D.J., Horie, T., Leigh, R.A., Lin, H.-X., Luan, S., Mäser, P., Pantoja, O., Rodríguez-Navarro, A., Schachtman, D.P., Schroeder, J.I., Sentenac, H., Uozumi, N., Véry, A.-A., Zhu, J.-K., Dennis, E.S., Tester, M.,

2006. Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci.* 11, 372–374. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.06.001>
- Plażek, A., Tatrzańska, M., Maciejewski, M., Koscielniak, J., Gondek, K., Bojarczuk, J., Dubert, F., 2013. Investigation of the salt tolerance of new Polish bread and durum wheat cultivars. *Acta Physiol. Plant.* <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1287-9>
- Posmyk, M.M., Janas, K.M., 2007. Effects of seed hydropriming in presence of exogenous proline on chilling injury limitation in *Vigna radiata* L. seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 29, 509–517.
- Prasad, P.V.D., Potluri, S.D.P., 1996. Influence of proline and hydroxyproline on salt-stressed axillary bud cultures of two varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *Vitro – Plant* 32, 47–50. <https://doi.org/10.1007/BF02823013>
- Provin, T., Pitt, J., 2001. Managing soil salinity. *Tex. Agri Life Ext. Serv. Publ.* E-60.
- Rahimi, A., Biglarifard, A., 2011. Impacts of NaCl stress on proline, soluble sugars, photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of strawberry. *Adv. Environ. Biol.*
- Rahman, M., Soomro, U.A., Haq, M.Z., Gul, S., 2008. Effects of NaCl salinity on wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World J. Agric. Sci.* 4, 398–403.
- Rajendrakumar, C.S., Reddy, B.V., Reddy, A.R., 1994. Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 957–963. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1795>
- Ramezani, A., Niazi, A., Abolimoghadam, A.A., Zamani Babgohari, M., Deihimi, T., Ebrahimi, M., Akhtardanesh, H., Ebrahimie, E., 2013. Quantitative expression analysis of TaSOS1 and TaSOS4 genes in cultivated and wild wheat plants under salt stress. *Mol. Biotechnol.* 53, 189–197. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9513-z>
- Rampino, P., Pataleo, S., Gerardi, C., Mita, G., Perrotta, C., 2006. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ.* 29, 2143–2152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01588.x>
- Rana, V., Ram, S., Nehra, K., Sharma, I., 2016. Expression of genes related to Na⁺ exclusion and proline accumulation in tolerant and susceptible wheat genotypes under salt stress. *Cereal Res. Commun.* 44, 404–413. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.009>
- Rastgar, J.F., Yamchi, A., Hajirezaei, M., Abbasi, A.R., Karkhane, A.A., 2011. Growth assessments of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthitans formed with *Arabidopsis thaliana* P5CS under salt stress. *Afr J Biotechnol* 10, 8539–8552.
- Rathinasabapathi, B., 2000. Metabolic Engineering for Stress Tolerance: Installing Osmoprotectant Synthesis Pathways. *Ann. Bot.* 86, 709–716. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1254>
- Raza, S.H., Athar, H.U.R., Ashraf, M., 2006. Influence of exogenously applied glycinebetaine on the photosynthetic capacity of two differently adapted wheat cultivars under salt stress [WWW Document]. *Pak. J. Bot.* 2006382341-351. URL <https://www.escholar.manchester.ac.uk/uk-ac-man-scw:158088> (accessed 1.29.15).
- Razavizadeh, R., Ehsanpour, A., 2009. Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants. *Biol. Lett.* 46, 63–75. <https://doi.org/10.2478/v10120-009-0002-4>
- Reddy, S.P., Jogeswar, G., Rasineni, G.K., Maheswari, M., Reddy, A.R., Varshney, R.K., Kavi Kishor, P.B., 2015. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiol. Biochem.* 94, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.05.014>
- Reilly, K., Gómez-Vázquez, R., Buschmann, H., Tohme, J., Beeching, J.R., 2004. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Mol. Biol.* 56, 625–641. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-2271-6>
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., Frommer, W.B., 1996. Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* 8, 1437–1446. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1437>

- Reza, S., Heidari, R., Zare, S., Norastehnia, A., 2006. Antioxidant response of two salt-stressed Barley varieties in the presence or absence of exogenous proline. *Gen. Appl. Plant Physiology* 32, 233–251.
- Ribarits, A., Abdullaev, A., Tashpulatov, A., Richter, A., Heberle-Bors, E., Touraev, A., 2007. Two tobacco proline dehydrogenases are differentially regulated and play a role in early plant development. *Planta* 225, 1313–24. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0429-3>
- Rochette, L., 2008. stress oxydant et sepsis. *Réanimation* 17, 1–4.
- Roosens, N.H., Bitar, F.A., Loenders, K., Angenon, G., Jacobs, M., 2002. Overexpression of ornithine- δ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants. *Mol. Breed.* 9, 73–80. <https://doi.org/10.1023/A:1026791932238>
- Rosa, M., Prado, C., Podazza, G., Interdonato, R., González, J.A., Hilal, M., Prado, F.E., 2009. Soluble sugars: Metabolism, sensing and abiotic stress: A complex network in the life of plants. *Plant Signal. Behav.* 4, 388–393. <https://doi.org/10.4161/psb.4.5.8294>
- Roy, D., Basu, N., Bhunia, A., Banerjee, S.K., 1993. Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biol. Plant.* 35, 69–72.
- Rubio, F., Gassmann, W., Schroeder, J.I., 1995. Sodium-Driven Potassium Uptake by the Plant Potassium Transporter HKT1 and Mutations Conferring Salt Tolerance. *Science* 270, 1660–1663. <https://doi.org/10.1126/science.270.5242.1660>
- Sadak, M.S., Mostafa, H.A.M., 2015. Physiological role of pre-sowing seed with proline on some growth, biochemical aspects, yield quantity and quality of two sunflower cultivars grown under seawater salinity stress. *Sci. Agric.* 9, 60–69.
- Saibi, W., Feki, K., Ben Mahmoud, R., Brini, F., 2015. Durum wheat dehydrin (DHN-5) confers salinity tolerance to transgenic Arabidopsis plants through the regulation of proline metabolism and ROS scavenging system. *Planta* 242, 1187–1194. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2351-z>
- Sairam, R.K., Rao, K.V., Srivastava, G.C., 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 163, 1037–1046. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00278-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00278-9)
- Sairam, R.K., Tyagi, A., 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.-BANGALORE*- 86, 407–421.
- Sangeetha, R., 2013. Effect of salinity induced stress and its alleviation on the activity of amylase in the germinating seeds of Zea mays. *Int. J. Basic Life Sci.* 1, 1–9.
- Sassi, A., Mieulet, D., Khan, I., Moreau, B., Gaillard, I., Sentenac, H., Very, A.-A., 2012. The Rice Monovalent Cation Transporter OsHKT2;4: Revisited Ionic Selectivity. *PLANT Physiol.* 160, 498–510. <https://doi.org/10.1104/pp.112.194936>
- Satoh, R., Fujita, Y., Nakashima, K., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2004. A Novel Subgroup of bZIP Proteins Functions as Transcriptional Activators in Hypoosmolarity-Responsive Expression of the ProDH Gene in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 45, 309–317. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch036>
- Satoh, R., Nakashima, K., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 2002. ACTCAT, a Novel cis-Acting Element for Proline- and Hypoosmolarity-Responsive Expression of the ProDH Gene Encoding Proline Dehydrogenase in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 130, 709–719. <https://doi.org/10.1104/pp.009993>
- Savouré, A., Hua, X.J., Bertauche, N., Van Montagu, M., Verbruggen, N., 1997. Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* MGG 254, 104–109. <https://doi.org/10.1007/s004380050397>
- Sawahel, W.A., Hassan, A.H., 2002. Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnol. Lett.* 24, 721–725. <https://doi.org/10.1023/A:1015294319114>
- Schachtman, D., I. Schroeder, J., 1994. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants. *Nature* 370, 655–8. <https://doi.org/10.1038/370655a0>

- Seaman, J., 2008. Mechanisms of salt tolerance in halophytes: can crop plants resistance to salinity be improved?
- Servet, C., Ghelis, T., Richard, L., Zilberstein, A., Savoure, A., 2012. Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 17, 607–620.
- Shabala, S., Wu, H., Bose, J., 2015. Salt stress sensing and early signalling events in plant roots: Current knowledge and hypothesis. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.* 241, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.10.003>
- Shahbaz, M., mushtaq, Z., Andaz, fatma, masood, atifa, 2014. Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)? *Sci. Hortic.* 164, 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.10.001>
- Shahid, S.A., Zaman, M., Heng, L., 2018. Soil Salinity: Historical Perspectives and a World Overview of the Problem, in: Zaman, M., Shahid, S.A., Heng, L. (Eds.), *Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and Related Techniques*. Springer International Publishing, Cham, pp. 43–53. https://doi.org/10.1007/978-3-319-96190-3_2
- Shanker, A. (Ed.), 2011. *Abiotic Stress in Plants - Mechanisms and Adaptations*. InTech.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J. Bot.* 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sharma, S., Verslues, P.E., 2010. Mechanisms independent of abscisic acid (ABA) or proline feedback have a predominant role in transcriptional regulation of proline metabolism during low water potential and stress recovery. *Plant Cell Environ.* 33, 1838–1851. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02188.x>
- Sharma, S., Villamor, J.G., Verslues, P.E., 2011. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.* 157, 292–304. <https://doi.org/10.1104/pp.111.183210>
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., Zhu, J.-K., 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6896–6901. <https://doi.org/10.1073/pnas.120170197>
- Shi, H., Quintero, F.J., Pardo, J.M., Zhu, J.-K., 2002. The Putative Plasma Membrane Na⁺/H⁺ Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na⁺ Transport in Plants. *PLANT CELL ONLINE* 14, 465–477. <https://doi.org/10.1105/tpc.010371>
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., 1997. Gene Expression and Signal Transduction in Water-Stress Response. *Plant Physiol.* 115, 327–334.
- Silva-Ortega, C.O., Ochoa-Alfaro, A.E., Reyes-Agüero, J.A., Aguado-Santacruz, G.A., Jiménez-Bremont, J.F., 2008. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 82–92.
- Singer, M.A., Lindquist, S., 1998. Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding In Vitro and In Vivo. *Mol. Cell* 1, 639–648. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80064-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80064-7)
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28, 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)
- Sobahan, M.A., Arias, C.R., Okuma, E., Shimoishi, Y., Nakamura, Y., Hirai, Y., Mori, I.C., Murata, Y., 2009. Exogenous proline and glycinebetaine suppress apoplastic flow to reduce Na(+) uptake in rice seedlings. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 2037–2042. <https://doi.org/10.1271/bbb.90244>
- Sobahan, M.A., ohno, misao, akter, N., Okuma, E., 2012. Effects of Exogenous Proline and Glycinebetaine on the Salt Tolerance of Rice Cultivars | Muhammad Abdus Sobahan | Request PDF [WWW Document]. ResearchGate. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120233>
- Sobhanian, H., Aghaei, K., Komatsu, S., 2011. Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops? *J. Proteomics* 74, 1323–1337.
- Solomon, A., Beer, S., Waisel, Y., Jones, G.P., Paleg, L.G., 1994. Effects of NaCl on the carboxylating activity of Rubisco from *Tamarix jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. *Physiol. Plant.* 90, 198–204. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1994.tb02211.x>

- Sorkheh, K., Shiran, B., Khodambashi, M., Rouhi, V., Mosavei, S., Sofu, A., 2012. Exogenous proline alleviates the effects of H₂O₂-induced oxidative stress in wild almond species. *Russ. J. Plant Physiol.* 59, 788–798. <https://doi.org/10.1134/S1021443712060167>
- Sripinyowanich, S., Klomsakul, P., Boonburapong, B., Bangyeekhun, T., Asami, T., Gu, H., Buaboocha, T., Chadchawan, S., 2013. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): The role of OsP5CS1 and OsP5CR gene expression during salt stress. *Environ. Exp. Bot., Special Issue: Phytohormones and Stress* 86, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.01.009>
- Stephenie, S., Chang, Y.P., Gnanasekaran, A., ME, N., Gnanaraj, C., 2020. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *J. Funct. Foods* 68. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>
- Stoyanov, Z., 2005. EFFECTS OF WATER STRESS ON LEAF WATER RELATIONS OF YOUNG BEAN PLANTS. *J. Cent. Eur. Agric.* <https://doi.org/10.5513/jcea.v6i1.241>
- Strizhov, N., Abrahám, E., Okrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L., 1997. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 12, 557–569.
- Su, J., Wu, R., 2004. Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Sci.* 166, 941–948. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.004>
- Subbarao, G.V., Johansen, C., 1999. Strategies and Scope for Improving Salinity Tolerance, in: *Handbook of Plant and Crop Stress: Second Edition, Revised and Expanded*. Marced Lekkerin, C., pp. 1069–1087.
- Sun, X., Lin, H.-H., 2010. Role of plant dehydrins in antioxidation mechanisms. *Biologia (Bratisl.)* 65, 755–759. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0090-y>
- Sunarpi, Horie, T., Motoda, J., Kubo, M., Yang, H., Yoda, K., Horie, R., Chan, W.-Y., Leung, H.-Y., Hattori, K., Konomi, M., Osumi, M., Yamagami, M., I Schroeder, J., Uozumi, N., 2006. Enhanced salt tolerance mediated by AtHKT1 transporter-induced Na⁺ unloading from xylem vessels to xylem parenchyma cells. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 44, 928–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02595.x>
- Surekha, Ch., Kumari, K.N., Aruna, L.V., Suneetha, G., Arundhati, A., Kavi Kishor, P.B., 2014. Expression of the *Vigna aconitifolia* P5CSF129A gene in transgenic pigeonpea enhances proline accumulation and salt tolerance. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* 116, 27–36. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0378-z>
- Surender Reddy, P., Jogeswar, G., Rasineni, G.K., Maheswari, M., Reddy, A.R., Varshney, R.K., Kavi Kishor, P.B., 2015. Proline over-accumulation alleviates salt stress and protects photosynthetic and antioxidant enzyme activities in transgenic sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Plant Physiol. Biochem.* 94, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.05.014>
- Szabados, L., Kovács, H., Zilberstein, A., Bouchereau, A., 2011. Chapter 4 - Plants in Extreme Environments: Importance of Protective Compounds in Stress Tolerance, in: Turkan, I. (Ed.), *Advances in Botanical Research, Plant Responses to Drought and Salinity Stress*. Academic Press, pp. 105–150. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387692-8.00004-7>
- Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97.
- Szabolcs, I., 1989. Salt-affected soils. *Salt-Affect. Soils*.
- Székely, G., Ábrahám, E., Csépl\Ho, Á., Rigó, G., Zsigmond, L., Csiszár, J., Ayaydin, F., Strizhov, N., Jásik, J., Schmelzer, E., others, 2008. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J.* 53, 11–28.
- Szoke, A., Miao, G.-H., Hong, Z., Verma, D.P.S., 1992. Subcellular Location of Δ 1-Pyrroline-5-Carboxylate Reductase in Root/Nodule and Leaf of Soybean. *Plant Physiol.* 99, 1642–1649.
- Tahi, H., Wahbi, S., EL Modafar, C., Aganchich, A., Serraj, R., 2008. Changes in antioxidant activities and phenol content in tomato plants subjected to partial root drying and regulated deficit

- irrigation. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* 142, 550–562. <https://doi.org/10.1080/11263500802410900>
- Talat, A., Nawaz, K., Hussian, K., Bhatti, K.H., Siddiqi, E.H., Khalid, A., Anwer, S., Sharif, M.U., 2013. Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Appl. Sci. J.* 22, 547–554.
- Tammam, A.A., Alhamd, M.A., Hemeda, M.M., others, 2008. Study of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Banysoif 1. *Aust. J. Crop Sci.* 1, 115–125.
- Tavakkoli, E., Fatehi, F., Rengasamy, P., McDonald, G.K., 2012. A comparison of hydroponic and soil-based screening methods to identify salt tolerance in the field in barley. *J. Exp. Bot.* 63, 3853–3867. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers085>
- Teakle, N.L., Tyerman, S.D., 2010. Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant Cell Environ.* 33, 566–589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02060.x>
- Teh, C.Y., Mahmood, M., Shaharuddin, N.A., Ho, C.L., 2014. In vitro rice shoot apices as simple model to study the effect of NaCl and the potential of exogenous proline and glutathione in mitigating salinity stress. *Plant Growth Regul.* 1–11.
- Tester, M., Davenport, R., 2003. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.* 91, 503–527.
- Timperio, A.M., Egidi, M.G., Zolla, L., 2008. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). *J. Proteomics* 71, 391–411. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.07.005>
- Toivonen, P.M.A., Hodges, D.M., 2011. Abiotic Stress in Harvested Fruits and Vegetables. *Abiotic Stress Plants - Mech. Adapt.* <https://doi.org/10.5772/22524>
- Torabi, M., 2014. PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES OF PLANTS TO SALT STRESS. the 1st internaional conferance on new ideas in agriculture 25.
- Touaf, L., Daoud, Y., Djili, K., 2004. Evaluation de l'état de salinité et de sodicité des sols du nord de l'Algérie. *Inst. Natl. Rech. Agron. El Harrach Algér.* 35–42.
- Tounsi, S., Ben Amar, S., Masmoudi, K., Sentenac, H., Brini, F., Véry, A.-A., 2016. Characterization of Two HKT1;4 Transporters from *Triticum monococcum* to Elucidate the Determinants of the Wheat Salt Tolerance *Nax1* QTL. *Plant Cell Physiol.* 57, 2047–2057. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw123>
- Tremel, J., Šmejkal, K., 2016. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 720–738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>
- Tripepi, M., Pohlschroder, M., Bitonti, M., 2011. Diversity of Dehydrins in Oleae europaea Plants Exposed to Stress.
- Turchetto-Zolet, A.C., Margis-Pinheiro, M., Margis, R., 2009. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: A key enzyme in proline synthesis. *Mol. Genet. Genomics* 281, 87–97. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0396-4>
- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymol.* 428, 419–438.
- Ueda, A., Shi, W., Sanmiya, K., Shono, M., Takabe, T., 2001. Functional analysis of salt-inducible proline transporter of barley roots. *Plant Cell Physiol.* 42, 1282–1289. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce166>
- UNESCO, 1957. Utilisation des eaux salines: compte rendu de recherches - UNESCO Bibliothèque Numérique [WWW Document]. URL <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000137251> (accessed 5.12.19).
- Vartanian, N., Hervochon, P., Marcotte, L., Larher, F., 1992. Proline Accumulation during Drought Rhizogenesis in *Brassica napus* var. oleifera. *J. Plant Physiol.* 140, 623–628. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80799-6](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80799-6)
- Vendruscolo, E.C.G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C.A., Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Vieira, L.G.E., 2007. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant Physiol.* 164, 1367–1376. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.05.001>
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008a. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>
- Verbruggen, N., Hermans, C., 2008b. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35, 753–759. <https://doi.org/10.1007/s00726-008-0061-6>

- Verbruggen, N., Villarroel, R., Montagu, M.V., 1993. Osmoregulation of a Pyrroline-5-Carboxylate Reductase Gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 103, 771–781. <https://doi.org/10.1104/pp.103.3.771>
- Verdoy, D., Coba De La Peña, T., Redondo, F.J., Lucas, M.M., Pueyo, J.J., 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 29, 1913–1923. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01567.x>
- Verslues, P.E., Bray, E.A., 2006. Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J. Exp. Bot.* 57, 201–212. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj026>
- Verslues, P.E., Kim, Y.-S., Zhu, J.-K., 2007. Altered ABA, proline and hydrogen peroxide in an *Arabidopsis glutamate:glyoxylate aminotransferase* mutant. *Plant Mol. Biol.* 64, 205–217. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9145-z>
- Verslues, P.E., Sharma, S., 2010. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Arab. Book American Soc. Plant Biol.* 8.
- Voetberg, G.S., Sharp, R.E., 1991. Growth of the Maize Primary Root at Low Water Potentials: III. Role of Increased Proline Deposition in Osmotic Adjustment. *Plant Physiol.* 96, 1125–1130. <https://doi.org/10.1104/pp.96.4.1125>
- Wahid, A., 2004. Analysis of toxic and osmotic effects of sodium chloride on leaf growth and economic yield of sugarcane. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45, 9.
- Wan, Q., Hongbo, S., Zhaolong, X., Jia, L., Dayong, Z., Yihong, H., 2017. Salinity Tolerance Mechanism of Osmotin and Osmotin-like Proteins: A Promising Candidate for Enhancing Plant Salt Tolerance. *Curr. Genomics* 18, 553–556. <https://doi.org/10.2174/1389202918666170705153045>
- wang, meng, xia, guangmin, 2018. The landscape of molecular mechanisms for salt tolerance in wheat.
- Wang, W., Vinocur, B., Altman, A., 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5>
- Wang, Y., Xu, H., Zhu, H., Tao, Y., Zhang, G., Zhang, L., Zhang, C., Zhang, Z., Ma, Z., 2014. Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes. *Plant Sci.* 214, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.10.005>
- Waters, S., Gilliam, M., Hrmova, M., 2013. Plant High-Affinity Potassium (HKT) Transporters Involved in Salinity Tolerance: Structural Insights to Probe Differences in Ion Selectivity. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7660–7680. <https://doi.org/10.3390/ijms14047660>
- Widodo, Patterson, J.H., Newbigin, E., Tester, M., Bacic, A., Roessner, U., 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *J. Exp. Bot.* 60, 4089–4103. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp243>
- Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., Van Camp, W., 1995. Catalases in plants. *Mol. Breed.* 1, 207–228. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02277422>
- Wu, H., Shabala, L., Azzarello, E., Huang, Y., Pandolfi, C., Su, N., Wu, Q., Cai, S., Bazihizina, N., Wang, L., Zhou, M., Mancuso, S., Chen, Z., Shabala, S., 2018. Na⁺ extrusion from the cytosol and tissue-specific Na⁺ sequestration in roots confer differential salt stress tolerance between durum and bread wheat. *J. Exp. Bot.* 69, 3987–4001. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery194>
- Wu, L., Fan, Z., Guo, L., Li, Y., Zhang, W., Qu, L.-J., Chen, Z., 2003. Over-expression of an *Arabidopsis* δ -OAT gene enhances salt and drought tolerance in transgenic rice. *Chin. Sci. Bull.* 48, 2594–2600.
- Xiong, L., Zhu, J.-K., 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 25, 131–139.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 2006. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 781–803. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>

- Yan, Z., Guo, S., Shu, S., Sun, J., Tezuka, T., 2013. Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 18381–18390.
- Yan, Z., Guo, S., Shu, S., Sun, J., Tezuka, T., 2011. Effects of proline on photosynthesis, root reactive oxygen species (ROS) metabolism in two melon cultivars (*Cucumis melo* L.) under NaCl stress. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 18381–18390. <https://doi.org/10.4314/ajb.v10i80>.
- Yang, peng, LiSha, L., ChangLong, W., LiQun, Z., Bing, Z., YangDong, G., 2010. Cloning and functional identification of ProDH gene from broccoli. *Genomics Appl. Biol.* 29, 206–214.
- Yang, Z., Li, J.-L., Liu, L.-N., Xie, Q., Sui, N., 2020. Photosynthetic Regulation Under Salt Stress and Salt-Tolerance Mechanism of Sweet Sorghum. *Front. Plant Sci.* 10.
- Yazici, I., Türkan, I., Sekmen, A.H., Demiral, T., 2007. Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation. *Environ. Exp. Bot.* 61, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.02.010>
- Yokoi, S., Quintero, F.J., Cubero, B., Ruiz, M.T., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., Pardo, J.M., 2002. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na⁺/H⁺ antiporters in the salt stress response. *Plant J.* 30, 529–539. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01309.x>
- Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol.* 38, 1095–1102.
- Yu, J.N., Huang, J., Wang, Z.N., Zhang, J.S., Chen, S.Y., 2007. An Na⁺/H⁺ antiporter gene from wheat plays an important role in stress tolerance. *J. Biosci.* 32, 1153–1161. <https://doi.org/10.1007/s12038-007-0117-x>
- Zahid, A., 2010. Mécanismes cellulaires et moléculaires régissent le métabolisme des semences de céréales : Role du réseau rédoxines-système antioxydant dans la prédiction de la qualité germinative. Université de Toulouse, France.
- Zeid, I.M., 2011. Alleviation of seawater stress during germination and early growth of barley. *Int. J. Agric. Res. Rev.* 1, 59–67.
- Zhang, J., Nguyen, H.T., Blum, A., 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *Journal of experimental botany* 50, 291–302.
- Zhang, L., Becker, D.F., 2015. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Front. Plant Sci.* 6.
- Zhu, B., Su, J., Chang, M., Verma, D.P.S., Fan, Y.-L., Wu, R., 1998. Overexpression of a Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci.* 139, 41–48. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00175-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00175-7)
- Zhu, J.-K., 2007. Plant Salt Stress, in: John Wiley & Sons, Ltd (Ed.), *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001300.pub2>
- Zhu, J.-K., 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 441–445. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00085-2)
- Zhu, J.-K., 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 247.
- Zhu, J.-K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 66–71.
- Zhu, M., Shabala, L., Cuin, T.A., Huang, X., Zhou, M., Munns, R., Shabala, S., 2016. Na⁺ loci affect SOS1-like Na⁺/H⁺ exchanger expression and activity in wheat. *J. Exp. Bot.* 67, 835–844. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv493>
- Zuther, E., Koehl, K., Kopka, J., 2007. Comparative Metabolome Analysis of the Salt Response in Breeding Cultivars of Rice, in: Jenks, M.A., Hasegawa, P.M., Jain, S.M. (Eds.), *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 285–315. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5578-2_12

Annexe 1

Classification APG III de blé dur (APGIII, 2009)

- Règne : Plantae
- Sous règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta
- Sous-classe : Commelinidae
- Ordre : Poales
- Famille : Poaceae
- Sous-famille : Pooideae
- Tribu : Triticeae
- Genre : *Triticum* L.,
- Espèce : *Triticum durum*

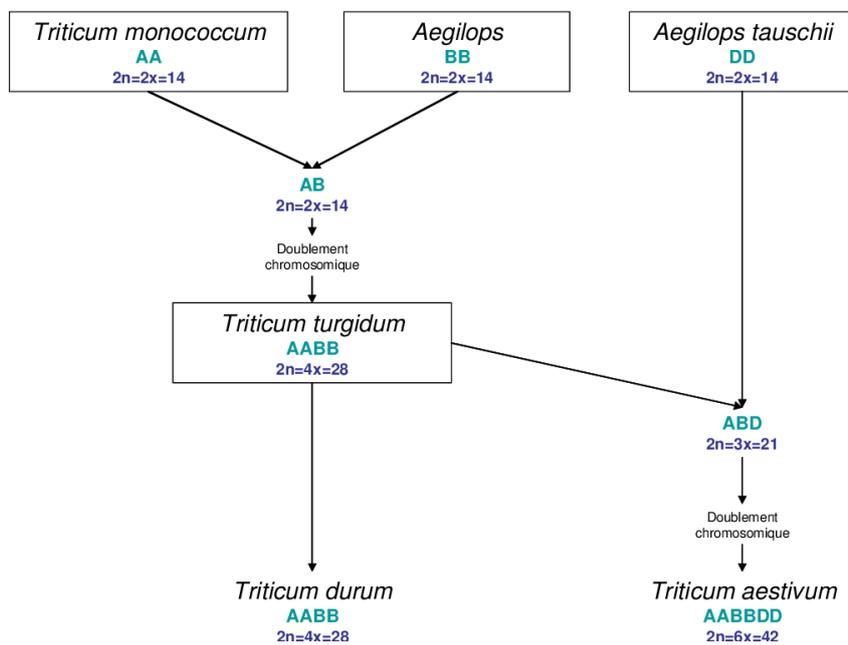


Figure 1. Classification et origine du blé dur (Debiton et al., 2010)

Tableau 1. Fiche variétale : caractéristiques de variétés étudiées (CNCC, 2009)

Variété	Obtenteur	Demandeur	Origine	Année d'inscription	Pedigree	Caractères cultureux	Aptitudes agronomiques
HEDBA 3	ITGC Sétif	ITGC	Algérie	2001	Sélection de la population locale	Tardive Zones de culture : Sersou, Berrouaghia, Sour-El-ghozlane, Ain Temouchent, Tlemcen, Said Tiaret, Sétif et constantine.	Productivité : moyenne Poids de 1000 grains : élevé
MOHAMED BEN BACHIR	ITGC Sétif	ITGC	Algérie	2001	Sélection de la population locale	Tardive Zones de culture : la région de Sétif Nord, Tiaret et Tniet-El-Had. Assez résistante à la verse Excellente qualité semoulière.	Productivité : assez faible (inférieure à HD3) Poids de 1000 grains : assez élevé

Tableau 2. Composition du milieu Murashige et Skoog (1962) concentration originale
(*Murashige and Skoog medium Basal Salt Mixture, Duchef Biochemie, M0221*)

MICRO ELEMENTS	mg/l	μM
CoCl₂.6H₂O	0.025	0.11
CuSO₄.5H₂O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H₃BO₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO₄.H₂O	16.90	100.00
Na₂MoO₄.2H₂O	0.25	1.03
ZnSO₄.7H₂O	8.60	29.91
MACRO ELEMENTS		
CaCl₂	332.02	2.99
KH₂PO₄	170.00	1.25
KNO₃	1900.00	18.79
MgSO₄	180.54	1.50
NH₄NO₃	1650.00	20.61

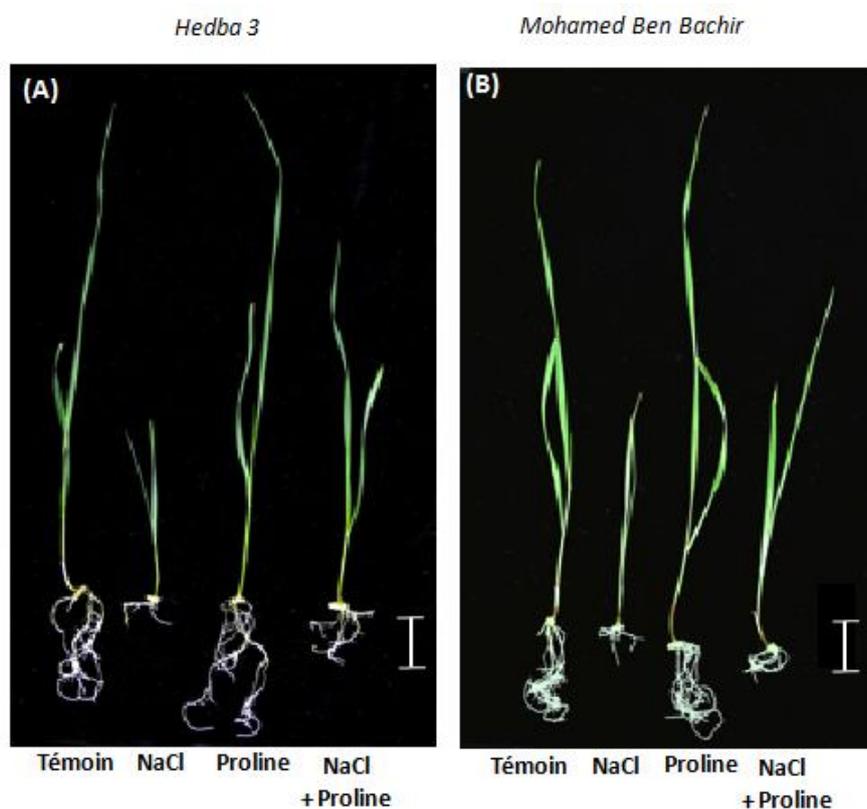


Figure 2. L'aspect morphologique des plantules de blé dur (HD3 et MBB) cultivées *in vitro* pendant 10 jours dans le milieu de culture contenant de NaCl avec ou sans proline.

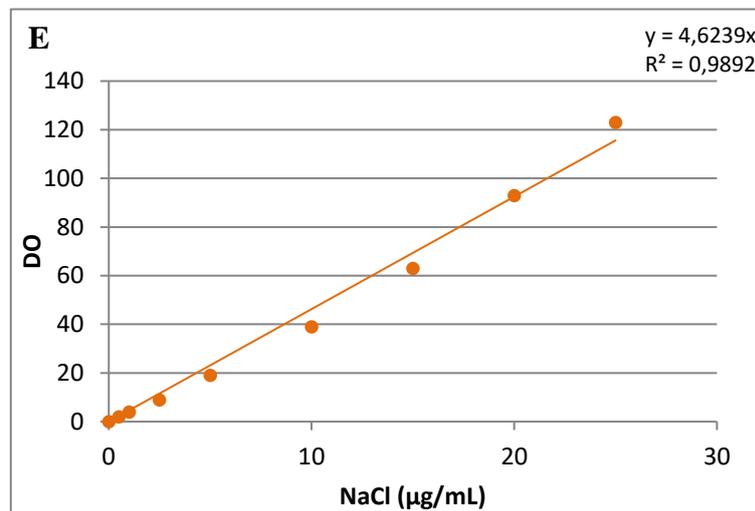
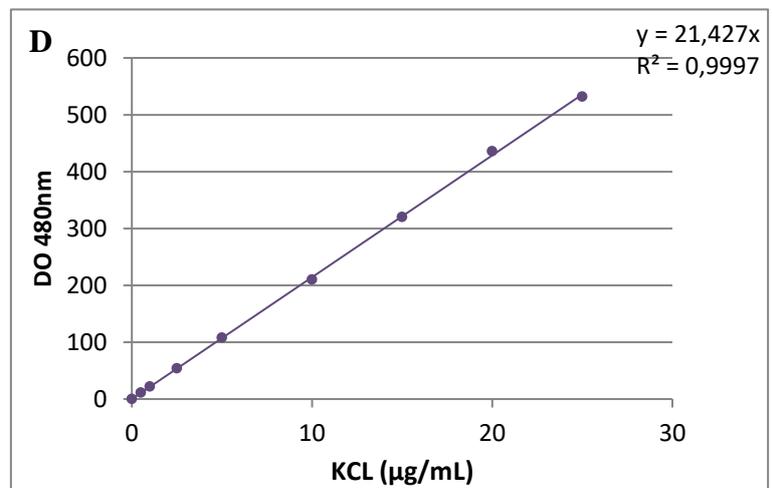
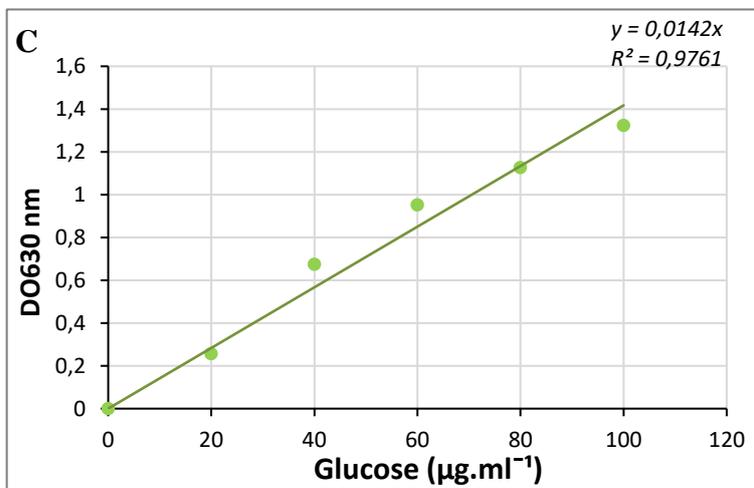
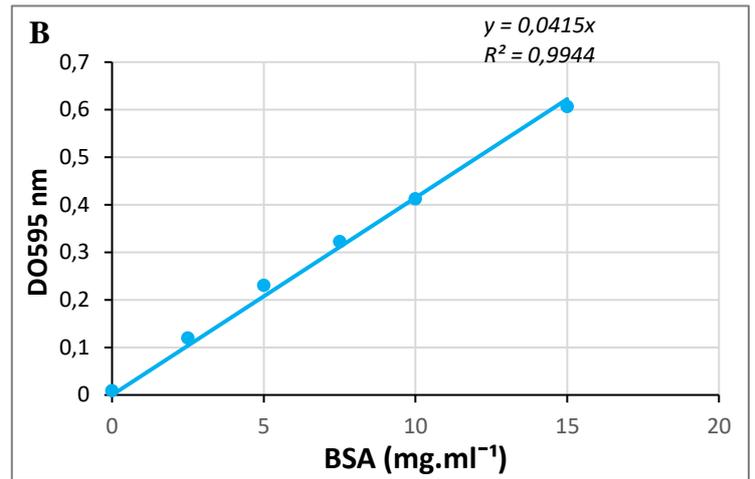
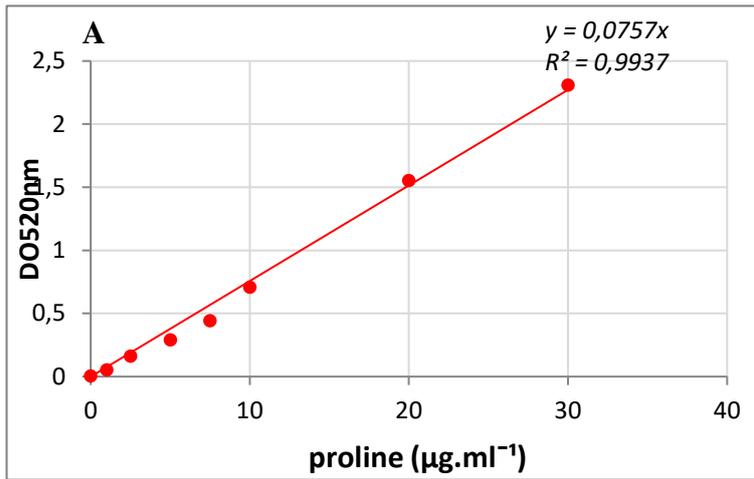


Figure 3. Courbes d'étalonnage. **A** de la proline ; **B** des protéines hydrosolubles, **C** des sucres solubles ; **D** du potassium, **E** de sodium.



Brûleur

Filtres Na⁺ et K⁺

Solution
(échantillon)

Combustible (gaz
butane)

Air comprimé

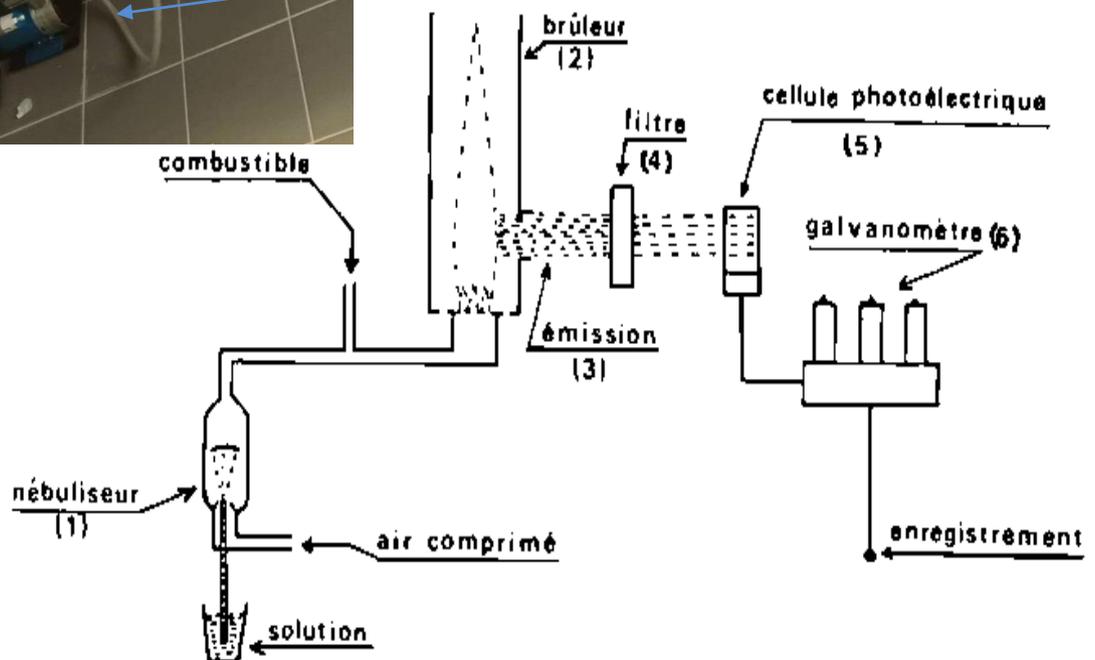


Figure 4. Illustration et schéma de la composition de la spectrophotométrie de flamme

Tableau 3. Composition des gels SDS-PAGE

Volume pour 2 gels (10ml)		Resolving gel (8%)	Stacking gel (4%)
Acryl/bis 30%		2.7 ml	1.3 ml
Tris-HCL	1.5M pH 8.8	2.5 ml	-----
	0.5M pH 6.8	-----	2.5 ml
SDS 10%		100 µl	100 µl
H2O milliQ		4.7 ml	6.1 ml
ASP 10%		50 ml	50 ml
TEMED		12.5 ml	20 ml

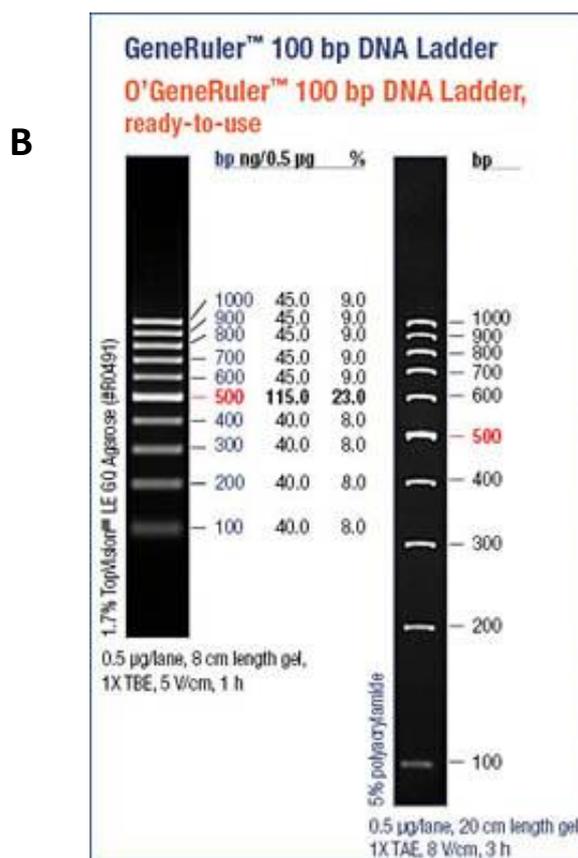
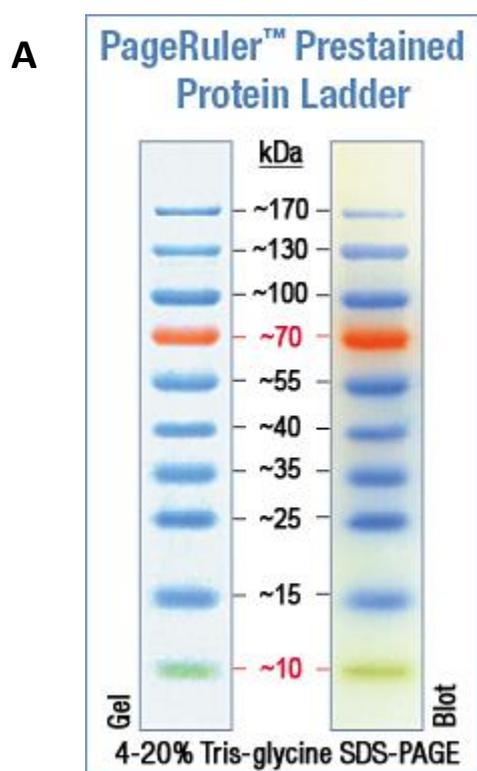


Figure 5. Les marqueurs utilisés: **A** marqueur de poids moléculaire des protéines en kilodalton Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher. **B** le marqueur ADN utilisé dans l'électrophorèse « DNA Ladder »

Tableau 4. Composition du tampon de la respiration (tampon d'électrode).

Tampon électrode pH entre 7.2 et 7.4	Molarité finale	Quantité ou volume pour 20 ml
Saccharose	0.3 M	2.05 g
KH ₂ PO ₄	5 mM	200 µl de 500 mM
TES	10 mM	200 µl de 1M
KCL	10 mM	200 µl de 1M
MgSO ₄	2 mM	200 µl de 200 mM
BSA (FFA)	0.1 %	0.02 g

Le pH est ajusté avec KOH 5M

Tableau 5. La composition du mélange réactionnel de l'activité enzymatique PDH

Concentration dans le milieu réactionnel	Solution stock	Masse molaire (g/mol)	Préparation de la solution (dans l'H ₂ O)
MgCl ₂ 2.5 mM	50 mM (4°C)	95.211	47.6 mg/10 ml
KCN 1mM	100 mM (-20°C)	65.12	6.5 mg/1 ml
DCIP 0.06 mM	6 mM (-20°C)	268.1	16 mg/10 ml
FAD 0.5 mM	50 mM (-20°C)	785.55	35 mg/1 ml
PMS 0.5 mM	100 mM (-20°C) fraichement préparé	306.3	6 mg/200 µl
L-proline 150 mM	1M (4°C)	115.13	1.15 g/ 10 ml
Protéines mitochondriales	Suspension congelée à -20°C	-----	20 µl
Tris-HCL (< 100mM) pH 7.5	100 mM	121.14	10 ml de Tris-HCL 1M + 40 ml H ₂ O

Composition du tampon d'extraction des ARNs totaux selon la méthode phénol chloroforme :

Tampon d'extraction : 20 ml Tris-HCl 0.2M pH7.5 ; 5ml EDTA 25mM pH8 ; 5ml SDS 10%, 6.25ml NaCl 0.25M).

Phénol : solution phénol ARN (*Sigma P4682*) saturé avec 0.1M du tampon citrate, pH4.3).

Phénol-chloroforme : un volume phénol ajouté avec un même volume de chloroforme (1:1, v/v).

Annexe 2

I. Les séquences des gènes Tubuline, P5CS, P5CR et ProDH utilisées pour le choix des amorces :

I.1. La séquence du gène TUBULINE TUB

Triticum aestivum alpha-tubulin mRNA, complete cds

GenBank: U76558.1

GenBank Graphics

>U76558.1 Triticum aestivum alpha-tubulin mRNA, complete cds

```
CCGCGTCGACAGGCGTCTTCGTA CTCTCCGCGCATCTAGCCTTCGCCCTCCTCCTTCCCCAT
TTCGCCAGCGGCGCAGCCCACCAACCACCCCCACCCGCCCATGAGGGAGTGCATCTCGATCCACATCG
GCCAGGCCGGCATCCAGGTCGGGAACGCGTGTGGGAGCTCTACTGCCTCGAGCATGGCATTTCAGCCTGA
TGGCCAGATGCCCGGTGACAAGACCGTTGGGGGAGGTGATGATGCTTTCAACACCTTCTTCAGCGAGACT
GGTGCTGGGAAGCATGTCCCCCGCGTGTCTTTGTAGATCTCGAGCCCACTGTGATTGATGAGGTGAGGA
CTGGTGCTTACCGCCAGCTCTTCCACCCTGAGCAGCTTATCAGTGGCAAGGAGGATGCAGCCAACAACCTT
CGCCCGTGGTCATTACACCATTTGGCAAGGAGATTGTTGATCTGTGCCTTGACCGTATCAGGAAGCTTTCA
GACAACTGCACTGGTCTCCAGGGATTCCCTTGTATTCAACGCTGTTGGAGGTGGAAGCTGCTGTCCTTG
GCTCGCTTCTCCTGGAGCGCCTCTCTGTTGACTATGGAAGAAAGTCCAAGCTTGGGTTACGGTGTACCC
ATCTCCCCAGGTCTCCACCTCTGTTGTTGAGCCATACAACAGTGTCTGTCCACCCACTCACTCCTTGAG
CACACTGATGTCTCTATCCTTCTTGACAATGAGGCCATCTATGACATCTGCCCGCGCTCCCTTGACATTG
AGCGCCCAACATAACCAACCTCAACAGGCTTGTCTCAGGTCATTTTCATCACTGACAGCTTCCCTGAG
GTTTGATGGTGTCTGAATGTTGATGTCAATGAATTCAGACCAACTTGGTGCCCTACCCGAGGATCCAC
TTCATGCTTTCTCCTATGCCCCAGTGATCTCAGCTGAGAAGGCTTACCATGAGCAGCTGTCCGTTGCTG
AGATCACCAACAGCGCCTTTGAGCCTTCGTCCATGATGGCCAAGTGCAGCCCCGCCACGGCAAGTACAT
GGCCTGCTGTCTCATGTACCGTGGTGATGTTGTGCCAAAGGACGTCAACGCTGCTGTGGCCACCATCAAG
ACCAAGCGCACTATTAGTTTGTGACTGGTGCCCCACTGGCTTCAAGTGTGGTATCAACTACCAGCCAC
CAGGTGTCGTCCCAGGCGGTGACCTTGCCAAGGTCCAGAGGGCTGTGTGCATGATCTCCAACCTCACCAG
TGTCGTGAGGCTTCTCCTCCGCATCGACCACAAGTTTGACCTGATGTACGCCAAGCGTGCCTTCGTCCAC
TGGTACGTCCGGTGAGGGCATGGAGGAGGGAGAGTTCTCTGAGGCCCGTGAGGATCTCGCTGCCCTGGAGA
AGGACTATGAAGAAGTTGGTGTGAGTTCGACGAGGGTGAGGACGGTGTGAGGGCGATGAGTATTAAGC
CTGCCTCCTGGTGTCTTTCCCAAGGCTTGCTACTGCTATCCTATGATCTGCCCGAGTGGCTTTATCTGTTA
TCTGTCTGTTTGAACGTTTGGCTTTGTGGTGTGTTTTACAACCTGTTGTGTTGTAAGAACCTTGTATCT
TTGAACCTGCTTTGCACCTTGGTTAATATGCATGCTATCTGGTTATCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

► Les amorces choisies pour l'amplification du gène TUB

TaTUB F: TGAAGAAGTTGGTGTGAGT

TbTUB R: ACCACAAAGCAAACGTTCAA

► Test virtuel des amorces (PCR virtuelle)

PCR Products results

>162 bp product from linear template TaTUB sequence base 1408 to base 1569
TGAAGAAGTTGGTGCTGAGTTTCGACGAGGGTGAGGACGGTGATGAGGGCGATGAGTATTA
AGCCTGCCTCCTGGTGCTTTCCCAAGCCTTGCTACTGCTATCCTATGATCTGCCCGAGTG
GCTTTATCTGTTATCTGTCTGTTTGAACGTTTGCTTTGTGGT

I.2. La séquence du gène P5CS

KI7LS-225 KI7LS Triticum turgidum subsp. durum cDNA similar to Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), mRNA sequence

GenBank: FK827071.1

EST GenBank

>FK827071.1 KI7LS-225 KI7LS Triticum turgidum subsp. durum cDNA similar to Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS, mRNA sequence
TCAGAGGAGCGCAAGAAAATATTATTAGATGTTGCGGATGCTTTAGAGGCAAATGAGGATTTAATTAGAT
CCGAGAATGAAGCAGATTTAGCAGCAGCACATGAGGCTGGGTATGAGAGTGCTTTGGTTTCTAGATTGAC
TCTGAAACCAGGAAAGATAGCAAGCCTTGCCAAATCTGTTGCGACTCTTGCGAATATGGAAGACCCATT
AACGAGATACTGAAAAGGACAGAGGTTGCTGATGGTTTAGTTCTTGAGAAAACATCTTGCCCTTTGGGTG
TTCTATTGATTATATTTGAGTCCCGACCTGATGCCTTAGTCCAGATTGCGTCTTTAGCCATTCGAAGTGG
TAATGGTCTTCTCCTAAAAGGTGGAAGAAGCAATGAGATCAAACGCAATATTGCATAAGGTTATAACC
AATGCTATTCTGACAATGTTGGCGAAAAATTGATTGGCCTTATTACAACACTAGAGATGAAATTGCGGATT
TGCTAAAGCATGATGATGTCATTGATCTTGTGATTCCAAGAGGGAGTAATAAGCTTGTGCTCAAATCAA
ATCATCAACAAAGATTCCTGTTCTTGGCCATGCTGATGGTGTGTTGTCATGTATATATTGACAAATCAGCA
GACATGGATATGGCAAAACGTATTGTGATGGATGCAAAAATTGATTACCCAGCTGCCTGCAACGCTGGAG
ACGTTGCTTGTTTCATAAAGATCTTATGAAGACTCCAGAACTTAATGACATACTAGTAGCACT

► Les amorces choisies pour l'implification du gène P5CS

TdP5CS F: GGGTATGAGAGTGCTTTGGT

TdP5CS R: CCATTACCACTTCGAATGGC

► Le test virtuel des amorces (PCR virtuelle)

PCR Products results

>248 bp product from linear template TdP5CS sequence base 109 to base 356
GGGTATGAGAGTGCTTTGGTTTCTAGATTGACTCTGAAACCAGGAAAGATAGCAAGCCTTGCCAAATCTGTTGCG
ACTCTTGCGAATATGGAAGACCCATTAAACGAGATACTGAAAAGGACAGAGGTTGCTGATGGTTTAGTTCTTGAG
AAAACATCTTGCCCTTTGGGTGTTCTATTGATTATATTTGAGTCCCGACCTGATGCCTTAGTCCAGATTGCGTCT
TTAGCCATTCGAAGTGGAATGG

I.3. La séquence du gène P5CR

Triticum aestivum pyrroline-5-carboxylate reductase mRNA, complete cds

GenBank: AY880317.1

GenBank Graphics

>AY880317.1 Triticum aestivum pyrroline-5-carboxylate reductase mRNA,
complete cds

```
TAGCCGCCGCGCCCCCTCTCCTACTCCCCAATGGCGGGCCGCGCCTCCCCAGCCCGCCGCGCCCCGCCCCGG
CCCCGCGAACGGCGGCGACGCGTTCGCGCTGGGCTTCGTCGGCGCGGGGAACCTGGCCGAGAGCATCGCG
CGCGGCGTCGCGGCGTCGGGCGTCTCCCGGCCTCCGCGTCCGCACCGCTCCCCACCGCCGCCCCGAGC
GCGGCGCCGCCTTCGCCTCCCTCGGCGCCACCATCTCGCCTCCAACGCCAGGTTGTGGACGGCAGCGA
TGTGATCGTCATCTCCGTCAAGCCCCAGATTGTGAAGCAGGTTCTGGTTGAGCTCAAGCCCTTGCTGTCT
GAAGAAAAGCTTCTGGTCTCCATCGCTGCTGGCATCAAAATGAAAGATTTGCAGGATTGGTCTGGTCAGC
GCAGAATTATTAGAGTAATGCCAAACACCCCCTCTGCTGTGCGACAAGCAGCATCAGTGATGTGTCTGGG
AGAGACAGCTACTGAGAAGGATGAAAACCGTGTCAAAGCTTATTTAGTGCCATTGGAAAAGTTTGGACA
GCTGAAGAAAAATATTTTGTATGCGGTTACTGGCTTGAGTGGTAGTGGTCCGGCCTACATTTTCTTGGCAA
TAGAGGCCATGGCTGATGGTGGAGTTGCTGCTGGGCTTCTCGGGATCTTGCTCTTGGTCTTGCAGCTCA
GACAGTGCTAGGTGCTGCAACCATGGTTAGCGAGACGGGTAAACATCCAGGGCAGCTGAAGGATCAGGTC
ACTTCCCCTGCAGGAACTACCATAGCTGGTGTTCATGAGCTCGAGAAGGGTTCGTTTCGYGGCACACTGA
TAAATGCCGTTGTTGCTGCCACAACAAGATGCCGAGAGCTCTCAAAAAATTAGTCCTCTTATAATCCTGG
TAGCCATTGTTAGTTTTGCTACAATTCCAGAATAAAATGGTGGACATGATTTATGAGATCTTAATCTCAG
ACTCCAACAAGTTATCGATAAATTTTCTGGTCTAGCTGTGTAG
```

► Les amorces choisies pour l'amplification du gène P5CR

TaP5CR F: GATTTGCAGGATTGGTCTGG

TaP5CR R: TACCACTCAAGCCAGTAACC

► Le test virtuel des amorces (PCR virtuelle)

PCR Products results

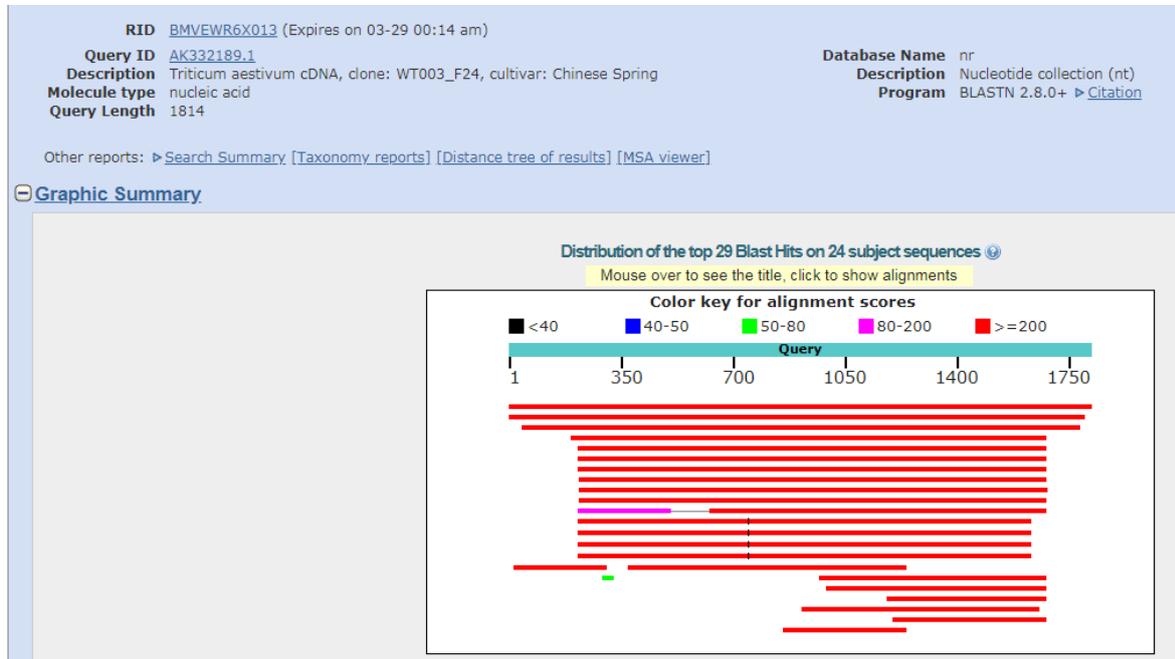
>208 bp product from linear template TaP5CR sequence, base 396
to base 603

```
GATTTGCAGGATTGGTCTGGTCTGAGCGCAGAATTATTAGAGTAATGCCAAACACCCCCTCT
GCTGTGCGGACAAGCAGCATCAGTGATGTGTCTGGGAGAGACAGCTACTGAGAAGGATGAA
AACCGTGTCAAAGCTTATTTAGTGCCATTGGAAAAGTTTGGACAGCTGAAGAAAAATAT
TTTGTATGCGGTTACTGGCTTGAGTGGTA
```

I.4. La séquence du gène PDH

- **Alignement multiple des sequences ARNm du gène PDH chez les tritacées réalisé sur le portail BLAST de la banque de données nucléotidiques NCBI**

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastm&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)



- **Les séquences alignées d'ARNm de la PDH et les pourcentages d'identité**

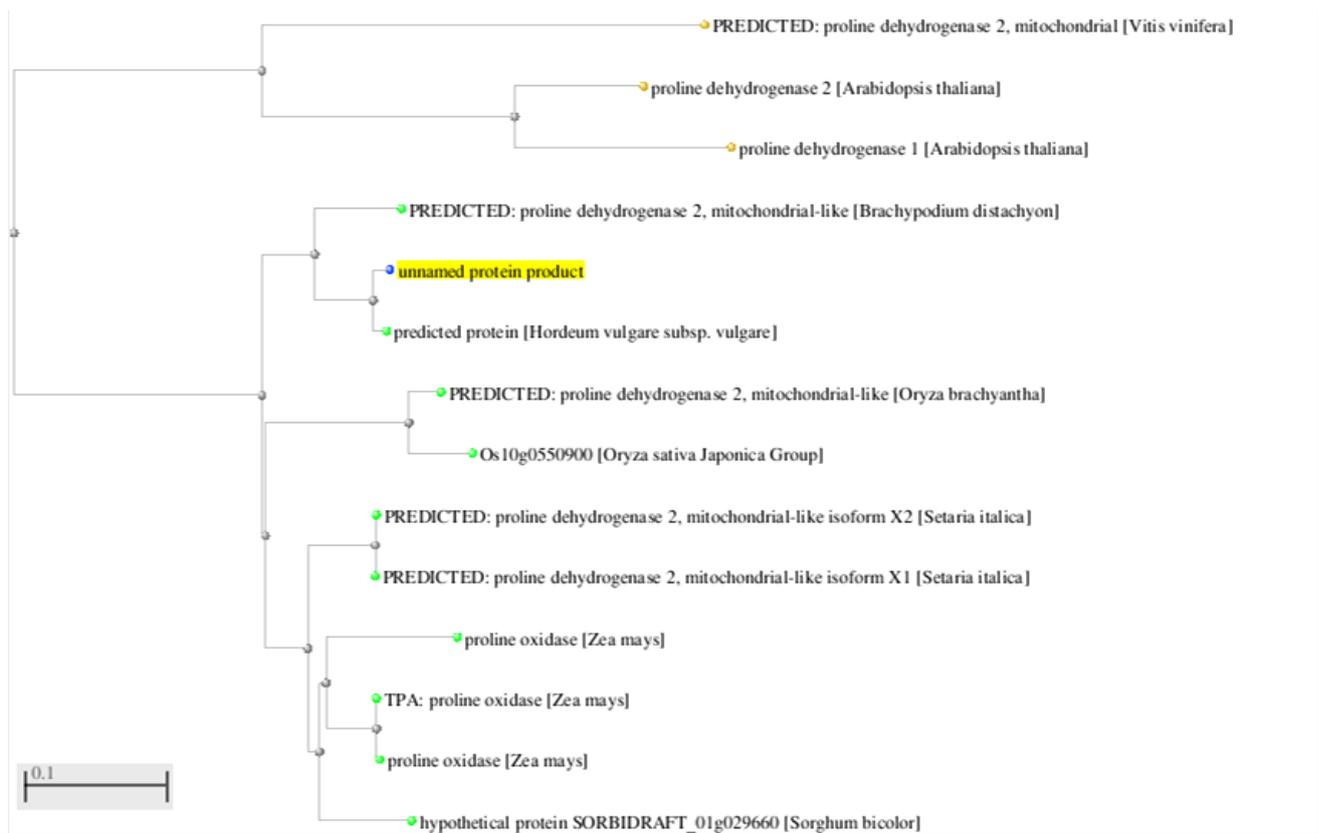
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Triticum aestivum cDNA, clone: WT003_F24, cultivar: Chinese Spring	3350	3350	100%	0.0	100%	AK332189.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. tauschii proline dehydrogenase 2, mitochondrial-like (LOC109770177), mRNA	3304	3304	98%	0.0	99%	XM_020328890.1
<input type="checkbox"/> Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv2140D07	2687	2687	95%	0.0	95%	AK371694.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Brachypodium distachyon proline dehydrogenase 2, mitochondrial (LOC100838313), mRNA	1683	1683	81%	0.0	87%	XM_003574255.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Setaria italica proline dehydrogenase 2, mitochondrial (LOC101775799), mRNA	1531	1531	80%	0.0	86%	XM_004983669.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group proline dehydrogenase 2, mitochondrial (LOC4349318), mRNA	1489	1489	80%	0.0	85%	XM_015757226.1

➤ Arbre phylogénétique du gene PDH construit sur NCBI



➤ La séquence PDH de blé tendre

PDH/Triticum aestivum cDNA, clone: WT003_F24, variété: Chinese Spring

GenBank: AK332189.1

GenBank Graphics

>AK332189.1 Triticum aestivum cDNA, clone: WT003_F24, variété: Chinese Spring

```
GACCGTTTCTCGGATTCCTCCGCATTCGTTTCGCTCCCAGCCTCACACTGCACCGATCAACACCAGCGTCGT
CTCAGACTTCTTCTTCTTCTTCTTCTGTCTACTCGGTTGATTCCCTTTGACCCGTCGTTTCGTTTCGTTTCGTT
GGTTTCATCCATCGTCCGGTACAGGAGAAGAGCAGCCGGCGCCTCTTTTCGTTGCTTTCTAGCGACCCC
TCCGAGTCCGACCTTCCATGGCCATCGCCTCCCGCATCACGAAGCGCGCGCTCTCCACCTTCGCCGCCGC
AGCCAAGCTCCCGGAGGCGGCCGTCGCGGCCGCCGGCGCCGAGGCGGTGCCCGCGCCGTCGTTCCGCGCAG
CACCAGCAGCAGCAGCAGGTCCTGGAGTTTGGAGACACCGAGAGGCTCTTACCGGGGAGCCGTCCACGG
CTCTGGTGCACGCTCGCGGCGCTGCAGTTGATGTCCGCGGGCCCCGCTGGTGGACGTGGGCCTCGCGGC
GCTGCGGTCTCCGGCGGTGGCCGCCAGCCCCGTGGTCCAGGCCGCGGCGCGGGCCACGGCGTACAAGCAC
TTCTGCGCCGGGAGACCGCCGATGAGGCCGCGGCCCGGGTGCAGCGCCTCTGGCGGGCGGCATGGGCG
GGATCCTCGACTACGGCATCGAGGACGCCGAGGACGGCGCCGCTGCGACCGCAACGTCGCCGGCTTCCT
CGCCGCCGTCGACGTCGCCGCCGCGCTGCCGCCGGATCGGCGAGCGTGTGTATCAAGATCACGGCGCTG
TGCCCGATCGCGTTGCTGGAGAAGACGAGCGACCTGCTGCGGTGGCAGCACAAGAACCCGTCGGTGCACC
TGCCGTGGAAGCAGCACGCTTCCCGATCTGTCCGACTCGAGCCCCTGTACCTGACCCGTCGGAGCC
GGCGGCGCTGACGGCGGAGGAGGAGCACGAGCTGCAGCTGGCGCACGACCGGCTGCTGGCCGTGGGCGCG
```

CGGTGCGCGGAGCACGACATCCCGCTGCTGGTGGACGCCGAGTACGCGTCGGTGCAGCCGTCCATCGACT
ACTTCACCTTCGTGGGCGCGCTGGCGTGCAACGGCGGGCGGACCCATCGTGCACGGCACCGTCCAGGC
GTACCTCCGCGACGCGCGGACCGGCTGGAGGCCATGGTGC GCGCGGCCGAGGAGGAGCGCGTGTGCCTC
GGGGTCAAGATCGTCCGCGGGCCTACCTCACCCGGGAGGCCCGGCTGGCGGAGTCCCTGGGCGTGCCGT
CGCCCATCCACGGCAGCATCCAGGACACCCACGACTGCTACAACGGCTGCGCGGCCCTTCTCCTGGAGCG
CGTCCGCCGCGGGTTCGGCGTCCGTGATGCTGGCCACCCACAACGTGGAGTCCGGGCAGCTGGCGGGCGG
AGGGCGCAGGAGCTGGGCATCGGCAAGGGCGACCCGGAACCTGCAGTTTCGCGCAGCTGATGGGCATGGCGG
ACGGGCTGTCCCTGGGGCTCCGCAACGCGGGGTTCCAGGTGAGCAAGTACCTGCCCTACGGCCCCGTGGA
GCACATCATCCCCTACCTCATCCGGCGGGCCGAGGAGAACAGAGGACTGCTCTCCGCTTCCGCCTTCGAC
CGGCAGCTGCTCCGGAAGGAGCTCGTTCAGGAGGTTCAAGAACGCGGTGATGGGACGGGAGTGAGGAGGCC
GGCGGGAGGTTACGTACGGGAGAGAAGCGACGGAGTTAGGAGTTGTAAATATGCATTGTTGTATCGCGA
CCTGAATGAATGGAATAAACGAAATAACGCTGTTGTTCAATCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAACGA

➤ **Les amorces choisies pour l'amplification du gène PDH**

TaPDH F: TCGACTACTTCACCTTCGTG

TaPDH R: TTGTAGCAGTCGTGGGTG

➤ **Le test virtuel des amorces (PCR virtuelle)**

PCR Products results

>259 bp product from linear template TaPDH sequence, base 1067
to base 1325

TCGACTACTTCACCTTCGTGGGCGCGCTGGCGTGCAACGGCGGGCGGACCCATCGTGC
ACGGCACCGTCCAGGCGTACCTCCGCGACGCGCGGACCGGCTGGAGGCCATGGTGC GCG
CGGCCGAGGAGGAGCGCGTGTGCCTCGGGGTCAAGATCGTCCGCGGGCCTACCTCACCC
GGGAGGCCCGGCTGGCGGAGTCCCTGGGCGTGCCGTCGCCATCCACGGCAGCATCCAGG
ACACCCACGACTGCTACAA

I.5. La séquence du gène Dehydrine DHN

Triticum turgidum subsp. durum partial mRNA for dehydrin 3 (DHN15.3 gene)

GenBank: AM180931.1

GenBank Graphics

>AM180931.1 Triticum turgidum subsp. durum partial mRNA for dehydrin 3 (DHN15.3 gene)

```
ATGGAGTACCAGGGACAGCAGCAGCACGGTCAGGCGACTAACCGCGTCGACGAGTACGGTAACCCGGTTG
CCGGACATGGCGTCGGCACCGGCGCGCCGCTGGTGGGCATTTCCAGCCCTCGAGGGAGGAGCACAAAGGC
CGGCGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCTAGTAGCTCCGGCTCGTCTGAGGATGATGGCATGGGCGGG
AGGAGGAAGAAGGGCATCAAGGATAAGATCAAGGAGAAGCTCCCTGGTGGCCACGGCGACCAGCAGCAGA
CCACTGACAACGCCTACGGACAGCAAGGTCATACGGCAGGGATGGCCGGCACTGGCGGCACCTACGGCCA
GCCGGGACACACCGGAATGGCCGGCACTGGGACGCATGGCACCGACGGCACCGGCGAGAAGAAGGGCATC
ATGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCC
```

► Les amorces choisies pour l'amplification du gène DHN

TdDHN F: GAGTACCAGGGACAGCAG

TdDHN R: ATGCCATCATCCTCAGACG

► Le test virtuel des amorces (PCR virtuelle)

PCR Products results

>200 bp product from linear template TdDHN sequence, base 4 to base 203

```
GAGTACCAGGGACAGCAGCAGCACGGTCAGGCGACTAACCGCGTCGACGAGTACGGTAAC
CCGGTTGCCGGACATGGCGTCGGCACCGGCGCGCCGCTGGTGGGCATTTCCAGCCCTCG
AGGGAGGAGCACAAAGCCGGCGGGATCCTGCAGCGCTCCGGCAGCTCTAGTAGCTCCGGC
TCGTCTGAGGATGATGGCAT
```

I.6. La séquence du gène HKT1;4-1

Triticum durum HKT1;4-1 mRNA, complete cds

GenBank: KF443078.1

GenBank Graphics

>KF443078.1 Triticum durum HKT1;4-1 mRNA, complete cds

```
ATGGCCGAGCTCATCATAAGGTCGGCGAGCTGTTGCGCCACGCACGGCGACGGTCGACGGCCGCGCTCGAC
AAGGCATTGTCCCTCCTGTCATCGCATTCTGGTCATACGTGCAGCACCACGTCGTCAAGGAGCGGGTGAAGC
GGTGGCGGCACGCTCTCGCCGGGCGGTTCTGGCGGCGCCTCGGCTCGCTGCTCGTCCACGTCGCCTACTTCT
CGCCGTCTCCTGGCTCGGTTACCTCCTCCTCGCGCAGCTCAGGTTCCGCGCCGGCGGCGACGGGACGAGGCGG
CCCCGCGGCATCGACCTGTTCTTACCGCCGTCTCGGCCGCGACGGTGTCCAGCATGTCCACCGTCGAGATGG
AGGTGTTCTCAATGGCCAGCTCCTCGTCTGACTGTCCTCATGTTTCGTCGGCGGCGAGGTGTTTTTGTGCTC
CTAGGCCTCGCGTCCAAGTGGTCCAAGCTGAGGAAGCAAGCCGTTACAAATCATCCCGCCGCTCGACAACC
ACGACGTCCCCGAGCTTGAGATGCCGCCGGTAGACGCCGCCACCGAATTGGCCAACCAACGTCGATGACATC
GACCGTCGATGATGAGATGAGCAAGCCGTTGGACCACTTCGATGACACGAGGCTGCGGCGCGACGCGGTGCT
GTCGCTGTTCTTCGTCGTCCTCGCCATCCTCCTAGCGGTGCACGTCCTCGGTTCCGGCGCCATCGTGGCGTACG
TCTTGCACGCGTCGCCGGCGGCGAGGCGGACGCTGCGGGACAAGGCCCTGAACATGTGGACCTTCGCCGTGT
TCACGACGGTGTCCACGTTCTCGAGCTGCGGGTACATGCCGACGAACGAGAACATGATCGTCTTCAAGCGAGA
CACCGGGCTGCAGCTGCTGCTCGTGCCGACGGCGTGGTCGGGAACACGCTGTTCCCGCCGCTGCTCGCCGCG
TGCGTGC GCGTCGCCGCCGCGGCGACCCGGCGCGTGGAGCTCAAGGAGACGGCGAAGAAGGGCCGGGAGTT
GACGGGGTACTACCACCTGCTCCCGGCGCGGCGGTGCGCGATGCTGGCGGCGACGGTGGTGGGCTTCTCGC
CGTGCAAGTGGCGATGCTGTGCGGCATGGAGTGGGGCGGCGCGCTGCGGGGGATGAGCGCGTGGGAGAAG
GTGTCGAACGCGGTGTTCTGCGGTTGAACTCCCGGCACACCGGCGAGTCGACCCTCGACCTTTCACCTCG
CGCCGGCCATCCTCGTCTCTTCGTGCTCATGATGTACCTGCCTCCATACACGACGTGGTTTCCATTTGAAGAGA
GCTCCGGCGTCAAGGACCAACCCAGGGAGGAGACCCAGGGGGTCAAGGCTGCTCAAGAGCACGCTTCTGTAC
AACTCTCTACCTCGCCATCTTTGTCATCGCCATCTGCATCACCGAGAGGGAAAAGCTCAAGGAGGACCCCTC
AATTCAACTTGCTCAGCATCGTCGTCGAAGTCGTCAGCGCTTATGGGAATGTGGGCTTCTCCATGGGCTACAG
CTGCAGTAGGCAGATCAGCCCGACGGGATGTGCACTGACAGGTGGACCGGCTTTGCTGGGAGGTGGAGCG
ATTCTGGCAAACATCCTCATTCTTGTGTCATGCTCTTCGGGAGGATGAAAAAGTTCAGCATGAAAGCGGGCAA
AGCCTGGAAGCTTAGTTAG
```

► Les amorces choisies pour l'amplification du gène HKT1 ;4-1

TdHKT1 ;4-1 F: TGACTGTCCTCATGTTTCGTC

TdHKT1 ;4-1 R: CGAAGGTCCACATGTTTCAG

► Le test virtuel des amorces (PCR virtuelle)

PCR Products results

>402 bp product from linear template TdHKT141 sequence, base 395 to base 796

```
TGACTGTCCTCATGTTTCGTCGGCGGCGAGGTGTTTTTGTGCTCCTAGGCCTCGCGTCCA
AGTGGTCCAAGCTGAGGAAGCAAGCCGTTACAAATCATCCCGCCGCGTCGACAACCACG
ACGTCCCCGAGCTTGAGATGCCGCCGGTAGACGCCGCCACCGAATTGGCCAACCAACGT
CGATGACATCGACCGTTCGATGATGAGATGAGCAAGCCGTTGGACCACTTCGATGACACGA
GGCTGCGGCGCGACGCGGTGCTGTGCTGTTCTTCGTCGTCCTCGCCATCCTCCTAGCGG
```

TGCACGTCCTCGGTTCCGGCGCCATCGTGGCGTACGTCTTGCACGCGTCGCCGGCGGCGA
GGCGGACGCTGCGGGACAAGGCCCTGAACATGTGGACCTTCG

I.7. La séquence du gène HKT1;4-2

Triticum durum HKT1;4-2 mRNA, complete cds

GenBank: KF443079.1

GenBank Graphics

>KF443079.1 Triticum durum HKT1;4-2 mRNA, complete cds

ATGGCCGGAGCTCATCGTAAGGTCCGCGAGCTGTTAGAGCACACGCGGCGGCGCTCGACGGCCGCGCTCA
ACAATGTAATGTCCCTCATGCGCTCGCTCTCCGGGCATACGCGCAGCACCACGTCAAGGAGCGCGTGGC
GCGGTGGCGCCGCGCGCTCGCCGGGCGGTTATCGCCGCGCCTCGGCTCGCTGCTCGTCCACGTGCGGTAC
TTCCTCGCCGTCTCCTGGCTCGGTTACCTTGTCTCGCGCAGCTCAGGTTCCGCGCCGGCGGCGAGGGGA
CGAGGCGGCCCCGGCGCCATCGATCTGTTCTTACC CGCGTCTCGGCCGCGACGGTGTGAGCATGTCCAC
CGTCGAGATGGAGGCGTTCTCCAACGGCCAGCTCCTCGTCCTGACCGTGTCTATGTTTCGTCGGCGGCGAG
GTGTTTTTGTGCTCCTAGGCCTCGCGTCCAAGTGGTCCAAGCTGAGGAAGCAAGCTGTACGCAAATCCC
GTCGCGTCGAGATCCACGACGTGCGCCGAGCTTGAGATGCCGCCGGTCGCCGCTGCTGGCGAATTCGACAA
CCCAACGTGATTACGTGACCCGCGACGACGAGATGAGCAAGCCGTTGGACCGCTTCGATGACACGAGG
CTGCGGCGCGACGCGGTGTTGTGCTCTTCTTCGTCGTCTCGCCATCCTCTGACGGTGACGTGCTGCG
GAGCCGTGCGCGTTCGCGGCGTACATCTTGCATGCGTCGCCGGCGGCGAGGCGGACGCTTCGGGAGAAGGC
CCTGAACGAGTGGACATTCGCCGTGTTACGACGCGGTGTCCACGTTCTCGAGCTGCGGGTACATGCCGACA
AACGAGAACATGGCGGTGTTCAAGCGGGACACCGGTCTGCAGCTGCTGCTCGTGCCGAGGCGCTGGTTCG
GGAACACGCTGTTCCCGCGCTGCTGGCCGCGTGCCTGCGCGCCGCCCGCGGCAACCAGGCGCGTGGA
GCTCAAGGAGACGGCGAAGGAGGGCGGGAACTGACGGGGTACTACCACCTGCTCCCGGCGCGGCGGTGC
GCGATGCTAGCGCAACGGTGGCCGGGTTTCGTCGCCGTGCAGGCGGCGATGTTGTGCGGCATGGAGTGGG
GTGGCGCGCTGAGCGGGATGAGCGCGTGGGAGAAGGTGTGAACCGGTTCTTCGCGGTGAACTCCCG
GCACACCGGCGAGACAACCCTCGACCTCTCCACCCTCGCGCCGGCCATCCTCGTCTCTTCGTGCTCATG
ATGTACCTCCCTCCATACACGACATGGTTTTCCATTTGGAGAGAGCTCCAGCGTGAAGGACCATCCCACGG
AGGAGACCCAGGGGGTGGAGTTGCTCAAGAGCACGCTTCTGTCACAACTCTCCTACCTTGCCATCTTTGT
CATCGCCATCTGCGTCACTGAGAGGGAAAAGCTCAAGGAGGACCCCTCAACTTCAACTTGTCTAGCATC
GTCGTGAAGTGTGCTGAGCGCTTATGAAAATGTGGGCTTCTCCATGGGCTACAGCTGCAGTAGGCAGATCA
GCCCCGACGGGATGTGCACTGACAGGTGGACCGGCTTCGCTGGGAGGTGGAGCGATTCCGGCAAACATCAT
CCTCATTCTTGTGCTGCTCTTCGGGAGGCTGAAAAAGTTTCAAGCATGAACGCGGGCAAAGCCTGGAAGCTT
AGTTAG

► Les amorces choisies pour l'amplification du gène HKT1 ;4-2

TdHKT1 ;4-2 F: CCATCTTTGTCATCGCCATC

TdHKT1 ;4-2 R: GAATGAGGATGAGTTTGCCG

► Le test virtuel des amorces (PCR virtuelle)

PCR Products results

>228 bp product from linear template TdHKT142 sequence base 1391 to base
1618

CCATCTTTGTTCATCGCCATCTGCGTCACTGAGAGGGAAAAGCTCAAGGAGGACCCCCCTCA
ACTTCAACTTGCTCAGCATCGTCGTCGAAGTCGTGAGCGCTTATGGAAATGTGGGCTTCT
CCATGGGCTACAGCTGCAGTAGGCAGATCAGCCCCGACGGGATGTGCACTGACAGGTGGA
CCGGCTTCGCTGGGAGGTGGAGCGATTCCGGCAAACATCCTCATTC

I.8. La séquence du gène HKT8

Triticum turgidum subsp. durum HKT8 (HKT8) mRNA, HKT8-B1 homeolog, complete cds

>DQ646333.1

AGGCCAAGAAGTCTCTACAATACTTACCAACGAATGGGTTCTCTGCATGTCTCCTGCAGTACCCTCAACATAGC
AAGCTTCAGAGGGTTTACCAACTCCTGTTTTTCCATGTGCACCCGTTCTGGCTCCATTTCTTGTACTTTGTAACC
ATCTCCTTCTTAGGTTTCGTGATCCTGAAAGCCCTGCCCATGAAGACCAGCATGGTCTCGAGGCCCATAGACCTT
GACCTGATCTTACCTCGGTGTGCGCCACCACGGTGTGAGCATGGTGGCCGTGGAGATGGAGTCTTCTCCAAC
CCCCAGCTCCTACTCCTGACCATCCTTATGCTCCTCGGCGGCGAGGTGTTACCAGCATGCTTGGCCTTTACTTT
ACCTACATCAAGTCCAAGAAGAAAGAAGCCCCCATGACCATGGTGTGATGGTGGTGGCAAAGTGAACCAGCACCG
TCTAGCCTAGAGCTCCCTGCTACCACCTTCATGGACGATAGCACTGCACAGAACCAGATGGAGCAAGGGTTCAAC
AAGGAGCAGCCCCGATACGGCCGAGCCTTCCCTCACCAGGTTGCTCCTGTTTCATAGTGTGGGCTATCAGTGGT
GTGCACCTCGCCGGCTACTCCCTGATGCTGCTTACCTGAGCGTCTCGTCCGGCGCAAGGGCTGTGCTCGCCGGC
AAGGGGATCAGCCTGCACACCTTCTCCGTATTACCGTCTGTCGACATTCGCCAATGGTGGCTTCGTGCCGAAC
AACGAAGGGATGGTTCGTTCCGGTCTTCCCGGGCCTCCTGCTCCTCGTTCATGCCGCACGTCTCCTCGGCAAC
ACGCTCTTCCCTGTCTTCCCTCAGGCTGGCCATCTGGGCTCTCCGGAGGGTACCAGGAGGCCCGAGCTCGGCCAG
CTGCAGAGCATCGGCTATGGTACCTGCTGACGAGCCGGCACACCTGCTTCTTGGCTTTCACCGTGGCCACGTT
GTGCTGGCGCAGCTGTGCTCTTCTGCGCCATGGAGTGGGGTCCAACGGGCTGCACGGGCTCACCGCCGCGCAG
AAGCTCGTTGCGGCACTGTTTCATGTGCGTCAACTTAGGCACACCGGCGAGATGGTTCGTGGACCTTTCACCATG
TCGTACGCCGTTGTGGTCTTACGTGGTTCATGATGATACCTACCACCTTACACTACATTTCTACCAGTGGAGAC
GACAGTGACCAACAAGTGGGAGCAGATCAGCACCACCAGAAAAGGGTAACAAGCATATGGCGGAAGCTGCTCATG
TCGCCGCTCTCGTTCTTGGCCATCTTTCATCGCCGTCGTGTGCATCACGGAGCGGGCGGCGAGATCTCCGATGACCCC
CTCAACTTCAACGTCCTCAACATCACCGTTCGAGGTTATCAGTGCCTACGGAAACGTGGGGTTTAGCACCGGGTAC
AGCTGTGCCCGGCAGGTGACTGCCGACGGCGGCTGCAGGGATACGTGGGTGGCTTCTCTGGGAAGTGGAGCTGG
CAAGGGAAGCTGGTTCTCATTGCTGTTCATGTTCTACGGCAGACTCAAGAAGTTCGGCATGCATGGTGGCGAGGCA
TGGAGGATAGTATAACCTAGTAGCAGACTGCATATTTCTCAATGATCTCTCTTCCAGACAGAGACTAGCTACATCT
CGCTCTAGTCTAAAACCATCTGAACCTATTTTTCATTATGCAAGTACCT

Triticum turgidum subsp. durum HKT8 (HKT8) mRNA, HKT8-B2 homeolog, complete cds

>DQ646334.1

AGAAGTCTCTAGAATACTTGCAGTAGAAATGGGCTCTTTGCTGCATGTCTCCTTCAGTGCCACTCAACATAGCAA
GCTTCATCGGGCTTACCAACTCCTGTTTTTCCATGTGCACCCGTTCTGGCTCCAGCTCTTGTACTTTGTATCCAT
CTCCTTCTTTCGGCTTCGTGATCCTCAAAGCCCTGCCCATGAAGACCAGCATGCCCATGGACCTGGACCTGATCTT
TACGTACAGTATCGGCGACGACGGTGTGAGCATGGTGGCTGTGGAGATGGAGTCTTCTCCAACCCCCAGCTCCT
ACTCCTGACCCTCCTCATGCTCCTCGGCGGCGAGGTGTTACGAGCATGCTTGGCCTGCACCTCACCTACCTCAA
GTCCAAGACGAAAGAAGCACAAGCCCCCACGAGCATGACGATGCTGACAAAGGCAAACCAGCACCATCATCTAG
CCTACAGCTCACCGCTACCACCTGCATGGATGATGTCAATCGTGTGGAGCAAGGGTTTAAAGACCAGCCCCGTTA
CGATCGTGCCTTCTCACCAGGTTGCTCTTGTTCATAGTGTGGGCTATCACGTGGTGGTGCACCTCGCCGGCTA
CTCCCTGATGCTGGTCTACCTGAGCGTCTCGTCCGGCGGCGAGGGCTGTGCTCGCCGGCAAGGGGATCAGCCTGCA
CACCTTCTCCGTCTTACCGTCTGTCGACGTTTCGCCAACGGTGGCTTTCATGCCCAACAATGAAGAGATGGTTCGC
CTTTCCGGTCTTCCCGGGCCTCCTGCTCCTCGTTCATGCCGCACGTACTCCTCGGCAACACGCTCTTCCCTGTCTT
CCTCAGGCTGGCCATCTGGGCTCTCCGGAGGGTACCAGGAGGCCCGAGCTCGGCGAGCTGCAGAGCATCGGCTA
CGACCACCTGCTGACGAGCCGGCACACCTGCTTCTTGGCTTTCACTGTGGCCATGTTTCGTGCTGGCGCAGCTGTC
GCTCTTCTGCGCAATGGAGTGGGGCTCCGACGGGCTGCATGGGCTCACCGCCGCGCAGAAGCTCGTTCACGGCACT
GTTTCATGTCGGTCAACTCCAGGCACACAGGCGAGATGGTTCGTGGACCTTTCACGGTGTGCTCAGCCGTTGTGGT
GCTTACGTGGTTCATGATGTACCTACCACCTTACACTACATTTCTACCAGTGGAAAGCAGCAGCCGACCAACAAGT
GGGAGCAGATCAGCACCACCAGAAAAGGGTAACAATCATATGGCGGAAGCTGCTCATGTCACCGCTCTCGTGTCTT
GGCCATCTTTCATCGCTGTGCTGTGCATCACGGAGCGGGCGGCGAGATCTCCGATGACCCCCCTCAACTTCAAAGTCTT
CAACATCACCGTTCGAGGTTATCAGTGCCTACGGAAACGTGGGGTTTAGCACCGGGTACAGCTGTGGCCGGCAGGT
GACGCCCCGACGGCGGCTGCAGGGATACGTGGGTTGGCTTCTCTGGGAAGTGGAGCTGGCAAGGGAAAGCTGGTTCT
CATTGCTGTTCATGTTCTACGGCAGGCTCAAGAAGTTCAGCATGCATGGTGGCGAGGCATGGATGATAGTATAACC

TAGTAGCAGACTGCATATTTCTCAATGATCTCTCTTCAGACAGAGACTAGCTACATCTCGCTCTAGTCAAAAACC
ATCTGAACATATT

Alignment multiple des sequences homologues B1 et B2 du gene HKT1;5 (HKT8)

Multalin version 5.4.1
Multiple sequence alignment
Consensus levels: high=90% low=50%
Name: DQ646333.1
Name: DQ646334.1

```
1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          391     400     410     420     430     440     450     460     470     480     490     500     510     520
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          521     530     540     550     560     570     580     590     600     610     620     630     640     650
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          651     660     670     680     690     700     710     720     730     740     750     760     770     780
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          781     790     800     810     820     830     840     850     860     870     880     890     900     910
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          911     920     930     940     950     960     970     980     990     1000    1010    1020    1030    1040
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1041    1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1171    1180    1190    1200    1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1301    1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400    1410    1420    1430
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1431    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500    1510    1520    1530    1540    1550    1560
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1561    1570    1580    1590    1600    1610    1620    1630    1640    1650    1660    1670    1680    1690
DQ646333.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
          1691    1700    1708
DQ646333.1  |-----|-----|-----|
DQ646334.1  |-----|-----|-----|
Consensus   |-----|-----|-----|
```

➤ **Les amorces choisies pour l'amplification du gène HKT1 ;5**

TdHKT1;5 F: CTCTTCCCTGTCTTCCTCAG

TdHKT1;5 R: GAGTTGACCGACATGAACAG

➤ **Le test virtuel des amorces (PCR virtuelle)**

PCR Products results

>257 bp product from linear template TdHKT8 sequence base 812 to base 1068 (T7 - T3).

```
CTCTTCCCTGTCTTCCTCAGGCTGGCCATCTGGGCTCTCCGGAGGGTCACCAGGAGGCC  
GAGCTCGGCGAGCTGCAGAGCATCGGCTACGACCACCTGCTGACGAGCCGGCACACCTGC  
TTCTTGGCTTTCCTACTGTGGCCATGTTTCGTGCTGGCGCAGCTGTCGCTCTTCTGCGCAATG  
GAGTGGGGCTCCGACGGGCTGCATGGGCTCACCGCCGCGCAGAAGCTCGTCACGGCACTG  
TTCATGTCGGTCAACTC
```

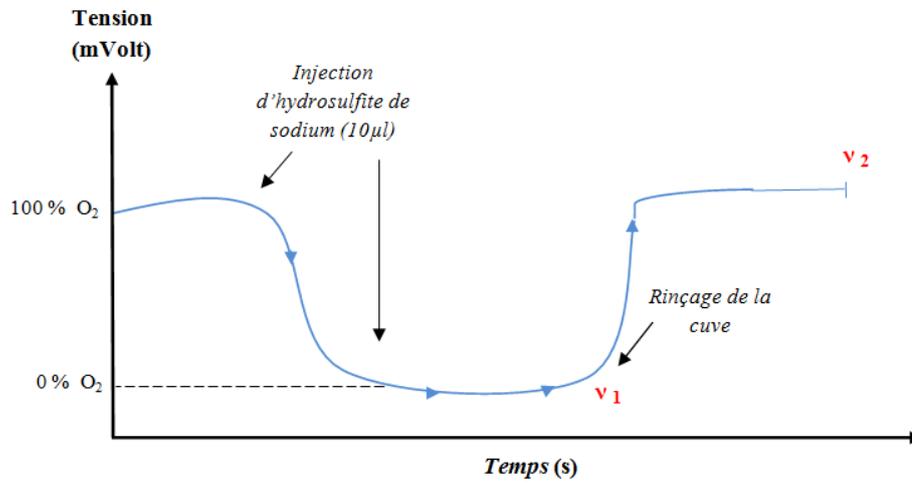


Figure . Calibration de l'oxymètre effectuée à partir de deux points : 100% d'oxygène obtenu à un équilibre entre le tampon d'électrode et la pression atmosphérique ; 0% d'oxygène obtenu par l'ajout du piègeur d'oxygène hydrosulfite de sodium.

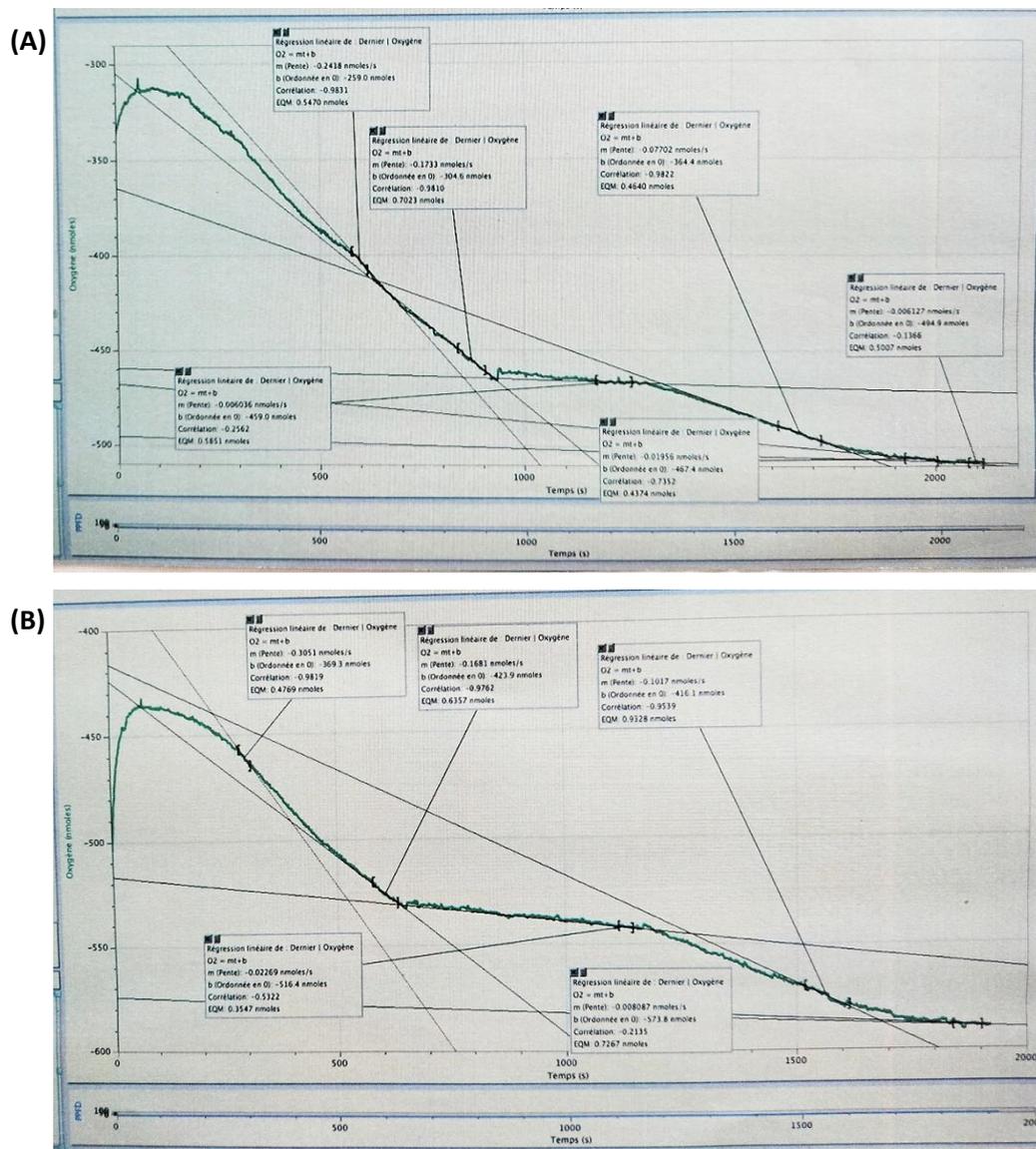


Figure. La consommation de l'oxygène des mitochondries brutes des racines de variété HD3 enregistrée à l'aide l'électrode Clark en présence du substrat Succinate +NADH. **(A)** mitochondries brutes des racines de plantules HD3 en conditions stress + la proline. **(B)** mitochondries brutes des racines de plantules HD3 en conditions du stress.

Annexe 3

HD3

Longueur

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Organe	1	10626	10626	2743.022	< 2e-16	***
Treatment	3	2893	964	248.954	< 2e-16	***
Organe:Treatment	3	62	21	5.372	0.00153	**
Residuals	152	589	4			

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-9.9250	-11.0682473	-8.7817527	0.0000000
SP-P	-8.0775	-9.2207473	-6.9342527	0.0000000
T-P	-1.2950	-2.4382473	-0.1517527	0.0195069
SP-S	1.8475	0.7042527	2.9907473	0.0002650
T-S	8.6300	7.4867527	9.7732473	0.0000000
T-SP	6.7825	5.6392527	7.9257473	0.0000000

PF

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Organe	1	1.2340	1.2340	1257.68	< 2e-16	***
Treatment	3	0.1789	0.0596	60.77	< 2e-16	***
Organe:Treatment	3	0.0445	0.0148	15.10	1.18e-08	***
Residuals	152	0.1491	0.0010			

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-0.0828700	-0.1010645775	-0.064675423	0.0000000
SP-P	-0.0653950	-0.0835895775	-0.047200423	0.0000000
T-P	-0.0198525	-0.0380470775	-0.001657923	0.0265238
SP-S	0.0174750	-0.0007195775	0.035669577	0.0647215
T-S	0.0630175	0.0448229225	0.081212077	0.0000000
T-SP	0.0455425	0.0273479225	0.063737077	0.0000000

PS

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Organe	1	0.025404	0.025404	746.687	< 2e-16	***
Treatment	3	0.003619	0.001206	35.459	< 2e-16	***
Organe:Treatment	3	0.000451	0.000150	4.416	0.00522	**
Residuals	152	0.005171	0.000034			

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-0.0121300	-0.015518078	-0.008741922	0.0000000
SP-P	-0.0104000	-0.013788078	-0.007011922	0.0000000
T-P	-0.0050925	-0.008480578	-0.001704422	0.0008093

SP-S	0.0017300	-0.001658078	0.005118078	0.5476013
T-S	0.0070375	0.003649422	0.010425578	0.0000015
T-SP	0.0053075	0.001919422	0.008695578	0.0004355

TRE

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment	3	53.02	17.675	3.072	0.0908 .
Residuals	8	46.02	5.753		

Chlo a

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment	3	3916048	1305349	9.953	0.00447 **
Residuals	8	1049173	131147		

Chlo b

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment	3	1049483	349828	14.57	0.00132 **
Residuals	8	192101	24013		

Sucres

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	0.6156	0.6156	158.986	1.00e-09 ***
Treatment	3	0.2964	0.0988	25.513	2.45e-06 ***
Organe:Treatment	3	0.0987	0.0329	8.495	0.00132 **
Residuals	16	0.0620	0.0039		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	0.25986463	0.157075971	0.36265329	0.0000109
SP-P	-0.02231638	-0.125105037	0.08047228	0.9237977
T-P	0.09464265	-0.008146009	0.19743131	0.0766867
SP-S	-0.28218101	-0.384969669	-0.17939235	0.0000039
T-S	-0.16522198	-0.268010641	-0.06243332	0.0015204
T-SP	0.11695903	0.014170368	0.21974769	0.0230984

Proline

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	67126	67126	4485	<2e-16 ***
Treatment	3	261332	87111	5820	<2e-16 ***
Organe:Treatment	3	41982	13994	935	<2e-16 ***
Residuals	16	239	15		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-150.57463	-156.96518	-144.18408	0
SP-P	59.02725	52.63670	65.41780	0
T-P	-194.59729	-200.98784	-188.20674	0
SP-S	209.60188	203.21133	215.99243	0
T-S	-44.02266	-50.41321	-37.63211	0
T-SP	-253.62454	-260.01509	-247.23399	0

IM

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment	3	4063	1354.3	6.764	0.0138 *
Residuals	8	1602	200.2		

MDA

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment	3	433.7	144.58	3.977	0.0526 .
Residuals	8	290.8	36.35		

N+

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	5021	5021	8.10	0.011678 *
Treatment	3	8476614	2825538	4558.19	< 2e-16 ***
Organe:Treatment	3	22142	7381	11.91	0.000238 ***
Residuals	16	9918	620		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	1162.858257	1121.732430	1203.98408	0.0000000
SP-P	1211.394162	1170.268336	1252.51999	0.0000000
T-P	-1.953979	-43.079806	39.17185	0.9990640
SP-S	48.535906	7.410079	89.66173	0.0181321
T-S	-1164.812236	-1205.938063	-1123.68641	0.0000000
T-SP	-1213.348142	-1254.473968	-1172.22231	0.0000000

K+

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	1403259	1403259	3183.0	<2e-16 ***
Treatment	3	2699189	899730	2040.9	<2e-16 ***
Organe:Treatment	3	735805	245268	556.3	<2e-16 ***
Residuals	16	7054	441		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-836.09752	-870.77993	-801.41512	0.0000000
SP-P	-775.03638	-809.71879	-740.35398	0.0000000
T-P	-680.22337	-714.90578	-645.54097	0.0000000
SP-S	61.06114	26.37873	95.74355	0.0006335
T-S	155.87415	121.19174	190.55655	0.0000000
T-SP	94.81301	60.13060	129.49541	0.0000041

Ratio

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	191	191	18.53	0.000546 ***
Treatment	3	67460	22487	2183.93	< 2e-16 ***
Organe:Treatment	3	3509	1170	113.59	5.35e-11 ***
Residuals	16	165	10		

SOD

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Treatment	3	4290	1430.1	230.4	4.2e-08 ***
Residuals	8	50	6.2		

MBBLongueur

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	753.6	753.6	66.326	4.4e-07 ***
Treatment	3	404.8	134.9	11.875	0.000242 ***
Organe:Treatment	3	23.2	7.7	0.682	0.575828
Residuals	16	181.8	11.4		

Treatment

	Diff	lwr	upr	p adj
S-P	-3.322706	-8.89062091	2.2452088	0.3521260
SP-P	-8.724426	-14.29234100	-3.1565113	0.0019207
T-P	2.168694	-3.39922074	7.7366089	0.6862119
SP-S	-5.401720	-10.96963492	0.1661948	0.0588391
T-S	5.491400	-0.07651467	11.0593150	0.0539039
T-SP	10.893120	5.32520542	16.4610351	0.0002125

Poids frais

	Df	m Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	1.6469	1.6469	758.676	< 2e-16 ***
Treatment	3	0.2628	0.0876	40.355	< 2e-16 ***
Organe:Treatment	3	0.0433	0.0144	6.644	0.000302 ***
Residuals	152	0.3300	0.0022		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-0.0937950	-0.120858164	-0.06673184	0.0000000
SP-P	-0.0754475	-0.102510664	-0.04838434	0.0000000
T-P	-0.0098250	-0.036888164	0.01723816	0.7816784
SP-S	0.0183475	-0.008715664	0.04541066	0.2961933
T-S	0.0839700	0.056906836	0.11103316	0.0000000
T-SP	0.0656225	0.038559336	0.09268566	0.0000000

Poids sec

	Df	Sum Sq	MeanSq	F value	Pr(>F)
Organe	1	0.03915	0.03915	903.609	< 2e-16 ***
Treatment	3	0.00349	0.00116	26.865	5.35e-14 ***
Organe:Treatment	3	0.00066	0.00022	5.051	0.00231 **
Residuals	152	0.00659	0.00004		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-0.0110000	-0.014823523	-0.007176477	0.0000000
SP-P	-0.0082850	-0.012108523	-0.004461477	0.0000005

T-P	-0.0010575	-0.004881023	0.002766023	0.8896274
SP-S	0.0027150	-0.001108523	0.006538523	0.2566901
T-S	0.0099425	0.006118977	0.013766023	0.0000000
T-SP	0.0072275	0.003403977	0.011051023	0.0000137

Sucres

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	1.1261	1.1261	713.28	1.06e-14 ***
Treatment	3	0.1725	0.0575	36.43	2.22e-07 ***
Organe:Treatment	3	0.4828	0.1609	101.94	1.22e-10 ***
Residuals	16	0.0253	0.0016		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-0.15390608	-0.21953788	-0.08827429	0.0000272
SP-P	-0.20765215	-0.27328394	-0.14202035	0.0000006
T-P	-0.03469068	-0.10032247	0.03094112	0.4534955
SP-S	-0.05374607	-0.11937786	0.01188573	0.1295804
T-S	0.11921541	0.05358361	0.18484720	0.0004623
T-SP	0.17296147	0.10732968	0.23859327	0.0000065

Proteines

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	753.6	753.6	66.326	4.4e-07 ***
Treatment	3	404.8	134.9	11.875	0.000242 ***
Organe:Treatment	3	23.2	7.7	0.682	0.575828
Residuals	16	181.8	11.4		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-3.322706	-8.89062091	2.2452088	0.3521260
SP-P	-8.724426	-14.29234100	-3.1565113	0.0019207
T-P	2.168694	-3.39922074	7.7366089	0.6862119
SP-S	-5.401720	-10.96963492	0.1661948	0.0588391
T-S	5.491400	-0.07651467	11.0593150	0.0539039
T-SP	10.893120	5.32520542	16.4610351	0.0002125

Proline

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-178.66454	-195.30897	-162.02012	0.00e+00
SP-P	31.85092	15.20650	48.49535	2.69e-04
T-P	-233.33306	-249.97749	-216.68864	0.00e+00
SP-S	210.51547	193.87105	227.15989	0.00e+00
T-S	-54.66852	-71.31294	-38.02410	4.00e-07
T-SP	-265.18399	-281.82841	-248.53957	0.00e+00

Na+

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	69282	69282	368.1	1.82e-12 ***
Treatment	3	4329132	1443044	7666.1	< 2e-16 ***
Organe:Treatment	3	485384	161795	859.5	< 2e-16 ***
Residuals	16	3012	188		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	879.8273174	857.16457	902.49006	0.0000000
SP-P	816.0515687	793.38882	838.71431	0.0000000
T-P	-0.5740749	-23.23682	22.08867	0.9998573
SP-S	-63.7757487	-86.43849	-41.11300	0.0000028
T-S	-880.4013923	-903.06414	-857.73865	0.0000000
T-SP	-816.6256436	-839.28839	-793.96290	0.0000000

K+

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Organe	1	823081	823081	1553.5	<2e-16 ***
Treatment	3	3772547	1257516	2373.5	<2e-16 ***
Organe:Treatment	3	1043514	347838	656.5	<2e-16 ***
Residuals	16	8477	530		

Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-899.53084	-937.5519	-861.50978	0.0000000
SP-P	-972.12653	-1010.1476	-934.10547	0.0000000
T-P	-386.47589	-424.4969	-348.45482	0.0000000
SP-S	-72.59569	-110.6168	-34.57463	0.0002754
T-S	513.05495	475.0339	551.07601	0.0000000
T-SP	585.65065	547.6296	623.67171	0.0000000

Ratio

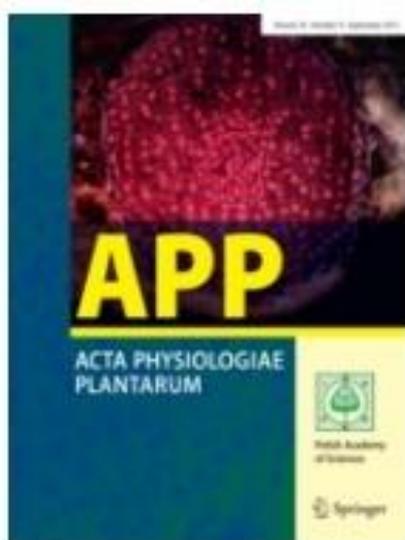
Treatment

	diff	lwr	upr	p adj
S-P	-158.57736865	-170.87584	-146.27890	0.0000000
SP-P	-158.61149668	-170.90997	-146.31302	0.0000000
T-P	-31.30405460	-43.60253	-19.00558	0.0000100
SP-S	-0.03412803	-12.33260	12.26434	0.9999998
T-S	127.27331405	114.97484	139.57179	0.0000000
T-SP	127.30744208	115.00897	139.60591	0.0000000

Annexe 4 liste des publications scientifiques

ARTICLE 1

Acta Physiologiae Plantarum (2020) 42:21
<https://doi.org/10.1007/s11738-019-3004-9>



Different proline responses of two Algerian durum wheat variétés to *in vitro* salt stress

Katia Ami^{1,2,3} · Séverine Planchais¹ · Cécile Cabassa¹ · Anne Guivarc'h¹ · Anne-Alienor Very⁴ · Majda Khelifi² · Réda Djebbar³ · Ouzna Abrous-Belbachir³ · Pierre Carol¹

¹ Institute for Ecology and Environmental Sciences of Paris iEES, UMR 7618 Sorbonne Université, CNRS, INRA, IRD, UPEC, Sorbonne Université, University Paris Diderot, 4 Place Jussieu, 75252 Paris, France

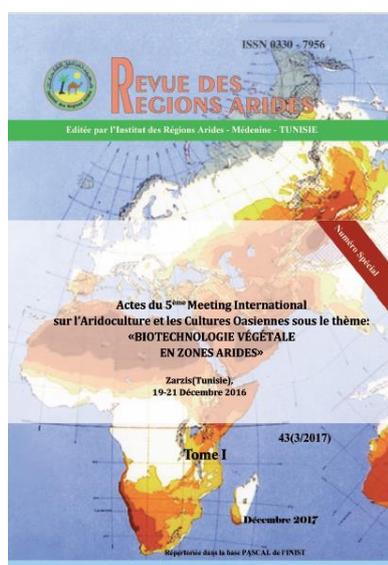
² ENSA, El Harrach, Algiers, Algeria

³ Laboratory of Biology and Physiology of Organisms, University of Sciences and Technology Houari Boumediene, El Alia, Bab Ezzouar, BP 32, 16111 Algiers, Algeria

⁴ BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRA, SupAgro, Montpellier, France

ARTICLE 2

Revue des Régions Arides n°43 (3/2017) – *Numéro spécial* – Actes du 5ème Meeting International sur l'Aridoculture et les Cultures Oasiennes : Biotechnologie végétale en zones arides et oasiennes Zarzis (Tunisie), 19-21 décembre 2016



Effect of exogenous proline on seed germination of two algerian durum wheat variétés under *in vitro* salt stress

Ami Katia^{1*}, Khelifi-Slaoui Majda¹, Abrous-Belbachir Ouzna²

¹ Ecole doctorale en biotechnologies végétales- Ecole Nationale supérieure Agronomique d'El-Harrach, Alger

² Equipe de physiologie végétale, laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes- Faculté des Sciences

Biologiques université des sciences et de la technologie Houari Boumediene, Alger.

* email : k.ami@st.ensa.dz , Tel : (+213)550136664



Different proline responses of two Algerian durum wheat cultivars to in vitro salt stress

Katia Ami^{1,2,3} · Séverine Planchais¹ · Cécile Cabassa¹ · Anne Guivarc'h¹ · Anne-Aliénor Very⁴ · Majda Khelifi² · Réda Djebbar³ · Ouzna Abrous-Belbachir³ · Pierre Carol¹

Received: 30 January 2019 / Revised: 14 June 2019 / Accepted: 30 December 2019
© Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2020

Abstract

Durum wheat, *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn., is one of the most salt-sensitive cereal crops, but the physiological responses of different cultivars to salt stress vary. Cultivars that are suited to arid conditions like in Algeria may not necessarily be tolerant to increased salinity. When 10-day seedlings of Algerian durum wheat varieties Hedba 3 (HD3) and Mohamed Ben Bachir (MBB) were subjected to salt stress, they accumulated proline and expressed stress-related and proline metabolism genes in a classic salt-stress response. Expression of the selective sodium transporter genes *HKT1;4-1* and *-2* was found to be organ-specific and modulated by salt stress in both cultivars. Adding proline to the salt-containing growth medium alleviated some salt stress effects such as decrease in water content, ion leakage and expression oxidative stress markers while growth parameters were partially rescued to different extents in the two cultivars. Durum wheat seedlings accumulated sodium ions (Na^+) at the expense of potassium ions (K^+) under salt stress which lowered the in planta K^+/Na^+ ratio. The two durum wheat cultivars studied here respond differently to salt stress in terms of responsiveness to proline, *HKT1;4* gene expression, and Na^+ and K^+ accumulation. Notably, salt stress can be partially alleviated by proline in the drought-resistant cultivar MBB, even though it is relatively salt sensitive.

Keywords Durum wheat · *Triticum turgidum* · Salt stress · Proline · HKT · In vitro

Introduction

Durum wheat, *Triticum turgidum* subsp. *durum* (Desf.) Husn., is an important crop both economically and nutritionally. It is especially cultivated in Mediterranean regions, which like others around the world are currently subject to progressive soil salinization (Munns and Tester 2008). On farms where the sole water supply for agriculture is from irrigation, the salinity of soil tends to increase because there is not enough rainfall to leach salt away (Corwin et al. 2007). Salinity limits the growth of many salt-sensitive (or glycophyte) crops, lowering yield (Horie et al. 2012). Rice (*Oryza sativa*) is one of the least salt-tolerant cereal species (Dionisio-Sese and Tobita 2000; Colmer et al. 2006; Munns and Tester 2008; Munns et al. 2010), while barley (*Hordeum vulgare*) is relatively salt tolerant being able to grow in the presence of up to 250 mM NaCl. Amongst wheat species, *Triticum monoccocum* is salt-resistant, *Triticum aestivum* (bread wheat) is moderately salt tolerant, and durum wheat is the least salt tolerant (Munns et al. 2012; Munns and Tester 2008; Wu et al. 2018). Relative salt tolerance does,

Communicated by E. Kuzniak-Gebarowska.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11738-019-3004-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pierre Carol
pierre.carol@upmc.fr

¹ Institute for Ecology and Environmental Sciences of Paris iEES, UMR 7618 Sorbonne Université, CNRS, INRA, IRD, UPEC, Sorbonne Université, University Paris Diderot, 4 Place Jussieu, 75252 Paris, France

² ENSA, El Harrach, Algiers, Algeria

³ Laboratory of Biology and Physiology of Organisms, University of Sciences and Technology Houari Boumediene, El Alia, Bab Ezzouar, BP 32, 16111 Algiers, Algeria

⁴ BPMP, Univ Montpellier, CNRS, INRA, SupAgro, Montpellier, France

however, depend on the cultivar as much as the species of wheat (Plazek et al. 2013).

The impact of salinization on plant growth results from the combination of hyperosmotic stress and ionic toxicity caused by the accumulation of salts, mainly NaCl, in plant organs (Munns and Tester 2008; Almeida et al. 2017; Waters et al. 2013). Plants growing on salinized soil accumulate high concentrations of sodium ions (Na^+) that can damage the cell membrane, alter levels of growth regulators, inhibit enzymes, disrupt photosynthesis, interfere with ionic homeostasis, produce harmful reactive oxygen species (ROS), and thus lead to plant death (Munns and Tester 2008; Julkowska and Testerink 2015). High Na^+ concentrations also have inhibitory effects on the absorption of major nutrients with similar physicochemical properties, such as K^+ , by the root (Almeida et al. 2017; Hamamoto et al. 2015).

The control of Na^+ transport and exclusion of Na^+ from leaf tissues are important processes protecting plants from sodium toxicity (Hanin et al. 2016). Durum wheat and rice both have a low capacity for Na^+ exclusion (Dionisio-Sese and Tobita 2000; Colmer et al. 2006; Munns and Tester 2008; Munns et al. 2010). Sodium transporters have been found to be important for salt tolerance, such as the *SOS1* and *SOS4* genes in durum wheat (Feki et al. 2011; Ramezani et al. 2013). *HKT* genes encoding high-affinity K^+ transporters (HKT) are important for sodium tolerance in *Triticum species* (Huang et al. 2006, 2008; James et al. 2006, 2011; Byrt et al. 2014). A proposed mechanism for Class-I HKT is where HKT activity in xylem parenchymal cells pumps Na^+ out of xylem, lowering the Na^+ concentration in the circulating xylem sap, which prevents Na^+ from accumulating in the leaf blade (Horie et al. 2009; Byrt et al. 2014). Class-II HKT are involved in nutritional sodium uptake dur-

ing potassium deficiency (Horie et al. 2009). Salt sensing and exclusion is also attributed to *SOS1* type protein (Shi et al. 2000, 2002; Wu et al. 2018) and Na^+/H^+ exchangers (Apse et al. 1999; Shabala et al. 2015). Interestingly, introduction of some genetic characteristics from the relatively salt-resistant *T. monoccocum* led to improved salt tolerance in durum wheat (Huang et al. 2006, 2008; James et al. 2006, 2011). The *T. monoccocum* loci *Nax1* and *Nax2* responsible for the improved salt tolerance trait encode HKT sodium transporters (Platten et al. 2006; Horie et al. 2009; Byrt et al. 2014; Almeida et al. 2017).

The deleterious consequences of salt stress on the plant can in some cases be counteracted by the accumulation of solute compounds, such as the amino acid proline (Zhang et al. 2016; Rana et al. 2016; Annunziata et al. 2017). The accumulation of proline in plants growing under saline conditions may contribute to stress protection through a number of mechanisms, for example, as an osmotic agent, as a stabilizer of membranes and macromolecules, or as an inducer of the expression of salt-stress-responsive genes

(Hayat et al. 2012). The processes of proline metabolism and catabolism contribute to balancing redox potential (Szabados and Savoure 2010). Proline biosynthesis occurs via two pathways either from glutamate or from ornithine, but the glutamate pathway probably predominates under stress conditions (Hu et al. 1992; Delauney and Verma 1993). The enzymes Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C) synthetase (P5CS) and P5C reductase (P5CR), respectively, catalyse the first two steps of proline biosynthesis from glutamate (Verbruggen et al. 1993; Amini et al. 2015). Proline catabolism involves the sequential action of proline dehydrogenase (PRODH), which converts proline to P5C, and P5C dehydrogenase (P5CDH), which converts P5C to glutamate (Elthon and Stewart 1981; Hare et al. 1999; Verbruggen and Hermans 2008; Zhang and Becker 2015). In most plant species, the metabolism of proline is upregulated by stress, often by transcriptional activation of *P5CS*, resulting in high intracellular proline concentrations (Mi Zhang and Becker 2015; Liang et al. 2013; Verslues and Sharma 2010; Silva-Ortega et al. 2008). However, stress-induced proline accumulation is variable in crops and depends on the species, the growth stage and the salt concentration (Annunziata et al. 2017). Proline can be applied exogenously to salt-stressed plants to increase endogenous levels *in planta*, thus minimizing damage, re-establishing salt tolerance (Roy et al. 1993; Hoque et al. 2007), and improving water retention, growth, and antioxidant defences. Several studies have shown a beneficial effect of exogenous proline on durum wheat and other crops subject to moderate stress induced by up to 100 mM NaCl (Mahboob et al. 2016), although relative salt tolerance does not correlate to endogenous proline content in durum wheat (Plazek et al. 2013).

Drought resistance is a desirable trait in durum wheat, but it is not necessarily associated with salt-stress resistance (Dionisio-Sese and Tobita 2000; Colmer et al. 2006; Munns and Tester 2008; Munns et al. 2010). Here we studied two durum wheat cultivars from Algeria that perform differently under drought stress. The Hedba 3 (HD3) cultivar has been characterized as being relatively drought sensitive while the Mohamed Ben Bachir (MBB) cultivar is relatively drought tolerant (Ali Dib and Monneveux 1992; Monneveux and Nemmar 1986; Mekhlouf et al. 2006). Plant responses to salt stress vary depending on test field–test location (Munns et al. 2006). *In vitro* and field responses to salt stress might also differ (Munns et al. 2006; Tavakkoli et al. 2012). We evaluated physiological and gene expression responses to salt stress in controlled conditions *in vitro*. A harsh salt stress (10 g/L, 171 mM NaCl), reflecting the high range of salt stress (Wu et al. 2018; Per et al. 2017), was chosen to study the impact of exogenous proline on stress relief.

Materials and methods

Plant material

Triticum turgidum subsp. *durum* (Desf.) Husn. (durum wheat) seeds were obtained from the Crops Technical Institute (ITGC), Algiers, Algeria (<https://www.itgc.dz/>). Hedba 3 (HD3) and Mohamed Ben Bachir (MBB) are cultivars chosen for their contrasting responses to water stress. HD3 is relatively sensitive to water stress (Ali Dib and Monneveux 1992) while MBB is relatively resistant to it (Monneveux and Nemmar 1986; Mekhlouf et al. 2006).

Plant growth conditions and statistical analysis

Seeds were surface sterilized for 20 min in 6% sodium hypochlorite, then rinsed five times in sterile water, washed once in 70% ethanol (v/v) for 1 min, and rinsed in sterile pure water.

Seeds were germinated on 0.7% agar solid MS medium (Murashige and Skoog 1962) for 3 days (d). Germinated seedlings (2–3 cm long) were transferred individually on solid agar medium into glass tubes containing 10 mL of 0.35% agar MS medium (the 0.35% agar concentration was chosen to allow for seedling growth and facilitate handling). Tubes were plugged with sterile cotton wool. For stress conditions, the agar medium contained 171 mM (10 g/L) NaCl or 20 mM proline or both. The chosen NaCl

concentration are within the range of those used to evoke a strong stress response in vitro or in aquaponics (Wu et al. 2018; Per et al. 2017). Proline concentration in the range of 20 mM was shown to relieve stress in plants (Hur et al. 2004; Mahboob et al. 2016; Medeiros et al. 2015). Seedlings were grown for a further 10 days in a growth chamber at 22 °C with a photoperiod of 16 h of neon light, averaging 90 μmoles of photons m^{-2}/s of photosynthetically active radiation at the level of seedlings, and 8 h of dark. Seedlings grew satisfactorily in these conditions, the control reaching 25 cm on average.

Leaves and roots were harvested and frozen in liquid N_2 then stored at -80 °C until further analysis.

When short-term responses to stress were studied, 10-day seedlings grown on control MS medium were carefully up-rooted then placed in a beaker with the roots in MS liquid medium, either with or without NaCl and/or proline.

All experiments were repeated three times. 24 individual plants were grown for each condition (control, NaCl, proline, NaCl and proline). At least 20 plants were used for analysis. Extracts for biochemical analyses were made from pools of six to eight plants. Three separate extracts were prepared in each experiment. Statistical analysis was

performed using R computer software (as indicated in figure legends).

Observation of root tips

Root tips (1 cm) from 10-day plants were excised and immediately incubated in Hoyer's solution (Anderson 1954) at 4 °C for 6 days, then observed using a Zeiss Axioskop microscope equipped with DIC optics and a 10 \times magnification objective. Images were recorded using an AxioCam camera MR (Zeiss) and processed and archived with AxioVision software (Zeiss).

Measurement of physiological parameters of seedlings

After 10 days, seedlings were uprooted and the maximum lengths of shoots and roots were measured. Fresh weight (FW) was recorded. To determine relative water content (RWC), tissues were allowed to fully hydrate on the surface of pure water for 1 day at 4 °C in the dark and their turgid weight (TW) was recorded. Tissues were allowed to dry for 2 days at 80 °C and then weighed to determine the dry weight (DW). Relative water content (RWC) was calculated as $100 \times (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW})$.

Quantification of proline, malondialdehyde and electrolyte leakage

Proline content was determined using a colorimetric assay adapted from Bates et al. (1973). Powdered frozen seedling tissue (50 mg FW) was homogenized in 1.5 mL of 3% sulfosalicylic acid. The homogenate was centrifuged at 14,000 rpm at 4 °C for 10 min. Ninhydrin buffer (2.5% ninhydrin, 60% acetic acid in 2.5 M phosphoric acid) and 100% acetic acid were added to 0.4 mL of supernatant (1:1:1, v/v/v). The proline–ninhydrin reaction was allowed to continue for 60 min at 95 °C. After cooling on ice, 0.8 mL of toluene was added to each sample to extract the coloured proline–ninhydrin complex. The optical density at 520 nm of the upper organic phase was determined. Proline was quantified by comparison with known concentrations of L-proline up to 20 mg/L (0.174 mM).

To estimate the amount of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) resulting from lipid peroxidation can be used as markers of salt stress (Hodges et al. 1999; Pang and Wang 2008). Leaf MDA was quantified using the thiobarbituric acid (TBA) colorimetric reaction according to Hodges et al. (1999) (from Heath and packer 1968). Fresh tissues (100 mg of leaves) were ground and homogenized in 2 mL of 20% trichloroacetic acid (TCA) solution. The homogenate was centrifuged at 15,000 rpm for 15 min at 4 °C, and 0.5 mL of the supernatant was mixed with 0.5 mL of 0.5%

thiobarbituric acid (TBA) in 20% TCA. The mixture was boiled in a water bath for 30 min, chilled on ice, and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min at 4 °C. The absorbance of the supernatant (or TBA–MDA complex) was measured at 532 nm. The concentration was calculated using the extinction coefficient $\epsilon = 155/\text{mM}/\text{cm}$.

Electrolyte leakage was quantified as a way to estimate the degree of membrane integrity. Ten 1-cm-long leaf fragments were immersed in 20 mL of distilled water at room temperature for 15 min, rinsed thoroughly then left for 1 h in fresh 20 mL of distilled water, which was found sufficient to ensure reliable measurement of ion leakage. The initial electrical conductivity (EC1, $\mu\text{S}/\text{cm}$) was measured. The samples were boiled for 5 min, cooled to room temperature and the conductivity was measured again (EC2, $\mu\text{S}/\text{cm}$). Electrolyte leakage (EL) was computed as $\text{EL} = (\text{EC}1/\text{EC}2) \times 100$ (Dionisio-Sese and Tobita 2000).

Superoxide dismutase (SOD) activity assay

Superoxide dismutase (SOD) is a detoxifying enzyme. SOD is used as a marker of oxidative stress (Miller et al. 2010; Saibi and Brini 2018; Joseph and Jini 2010). Enzymatic extracts were prepared by homogenizing 0.5 g of powdered frozen shoots in cold phosphate buffer (50 mM KPO_4 buffer, pH 7.0, 1 mM EDTA, Triton X-100, and 1% PVP). Insoluble material was pelleted by centrifugation at $16,000 \times g$ for 30 min at 4 °C. The supernatant was loaded onto a PD10 Sephadex G25 column (GE Healthcare). Soluble proteins were eluted with 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8, and quantified (Bradford 1976) against bovine serum

albumin as standard. SOD activity was determined spectrophotometrically at 560 nm based on the capacity of SOD to inhibit the photochemical reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) to formazan by riboflavin in the light, provided by fluorescent white light (Beauchamp and Fridovich

1971; Beyer and Fridovich 1987). The assay mixture consisted of 1.5 mL of reaction buffer (50 mM KPO_4 buffer, pH 7.8, 1 mM EDTA, 13 mM methionine, 2.25 mM NBT and 2 mM riboflavin) containing 20 μL of enzyme extract (20–60 μg protein). The reaction, started by illumination, lasted 13 min. SOD activity was expressed in relative units (U/mg protein) where 1 U caused a 50% decrease in NBT reduction at 25 °C.

Measurement of Na^+ and K^+ content of tissues

Frozen plant tissues were lyophilized under vacuum. Powdered dry tissues (50 mg) were suspended in 5 mL of 0.5 M nitric acid for 1 h at 80 °C, as described in Munns et al. (2010). After centrifugation for 10 min at $3000 \times g$, the supernatant was used to quantify Na^+ or K^+ using a Sherwood M410 flame ionization spectrophotometer (Sherwood Scientific Limited, UK). Ranges of NaCl and KCl dilutions were used for calibration.

Analysis of gene expression by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

All gene sequence identifiers are given in Table 1. *PRODH*, *P5CS*, *P5CR*, the durum wheat dehydrin (*DHN*) (Rampino et al. 2006), and tubulin (*TUB*) gene sequences are available in the NCBI GenBank (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Durum wheat *HKT1;4-1* and *HKT1;4-2* sequences were retrieved from the wheat genome database (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr>).

The Multalin program was used to align and compare multiple sequences (<https://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) to identify highly similar gene regions on which to base the design of specific primers. Primer sequences used in this study are shown in Table 1. Gene-specific primer

Table 1 Sequence of primers used for RT-PCR

Gene	GenBank Ref.	Sequence	Amplicon (bp)	Cycles
<i>TUB</i>	U76558.1	F: TGAAGAAGTTGGTGCTGAGT R: ACCACAAAGCAAACGTTCAA	162	27
<i>HKT1.4-2</i>	KF443079	F: CCATCTTIGTCATCGCCATC R: GAATGAGGATGAGTTTGCCG	228	33
<i>HKT1.4-1</i>	KF443078	F: TGACTGTCTCATGTTTCGTC R: CGAAGGTCCACATGTTTCAG	402	33
<i>P5CR</i>	AY880317.1	F: GATTTCAGGATTGGTCTGG R: TACCACTCAAGCCAGTAACC	208	27
<i>P5CS</i>	FK827071.1	F: GGGTATGAGAGTGCTTGGT R: CCATTACCACTTCGAATGGC	248	28
<i>PRODH</i>	AK332189.1	F: TCGACTACTTCACCTTCGIG R: TTGTAGCAGTCGTGGGTG	259	30
<i>DHN</i>	AM180931.1	F: GAGTACCAGGGACAGCAG R: ATGCCATCATCCTCAGACG	203	28

pairs were designed and selected using Primer3 software, tested on Virtual PCR software (https://bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html) and synthesized by Eurogentec (Belgium).

RNA was extracted from 100 mg of frozen powdered tissue homogenized in 0.5 mL of extraction buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.25 M NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) then extracted twice with a mixture (1:1, v/v) of phenol citrate, pH 4.3 (Sigma-Aldrich), and chloroform. The suspension was centrifuged for 5 min at 14,000×g. RNA was selectively precipitated twice from the upper aqueous phase with 2 M LiCl (final concentration) for 8 h–16 h at 0 °C. After 10 min of centrifugation at 14,000×g, the RNA pellet was rinsed with 70% ethanol (v/v), air dried and suspended in 30 µL of pure water. RNA was quantified by measuring UV absorbance at 260 and 280 nm using a Nanovue spectrophotometer (ND1000 UV-Vis). After a DNase treatment, RNA integrity was checked by electrophoresis in a 1% agarose gel with Tris acetate-EDTA buffer.

For reverse transcription, 1.5 µg of RNA was used with Revert Aid Reverse Transcriptase according to the manufacturer's instructions (Life Technologies). Complementary DNA samples were diluted fourfold with ultrapure water. PCR was done using Dream Taq Green DNA polymerase (Life Technologies). For each PCR, 2 µL of cDNA was used as a template, 0.8 µM of both forward and reverse primers, 0.2 mM dNTP and 1 unit of DreamTaq in 1× GreenTaq Buffer. PCR conditions were 5 min at 94 °C; then 28 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 30 s at

72 °C; followed by 10 min at 72 °C. The number of PCR cycles was adopted for each gene so that the amount of PCR product amplified allowed semi-quantitative estimation of the level of expression compared to control gene expression. Quantification of PCR samples was performed using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov>) image analysis. Each sample was quantified first relative to the endogenous *TUB* gene expression and then to the corresponding control sample. Only expression ratios from measurable gene expression are calculated, otherwise data are indicated as not determined (nd).

Results

Proline accumulates preferentially in leaves of salt-stressed durum wheat seedlings grown in vitro

In the control condition, free proline content was similar in roots and leaves of both durum wheat cultivars studied, ranging from 33 to 36 µmol/g DW (Fig. 1a, b). In response to salt stress, proline content mainly increased in leaves, threefold in HD3 and fourfold in MBB (Fig. 1a, b). When proline was present in the growth medium, proline accumulated in both leaves and roots (Fig. 1a, b). More proline accumulated in MBB roots (Fig. 1b) than in HD3 roots (Fig. 1a) (244 compared to 150 µmol/g DW). In both cultivars, the combination of salt stress and added proline

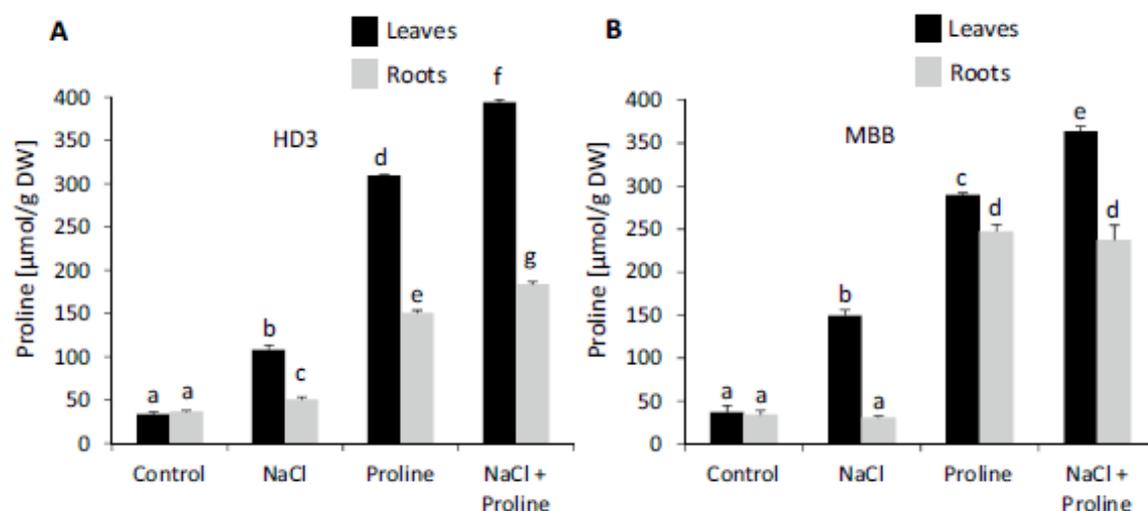
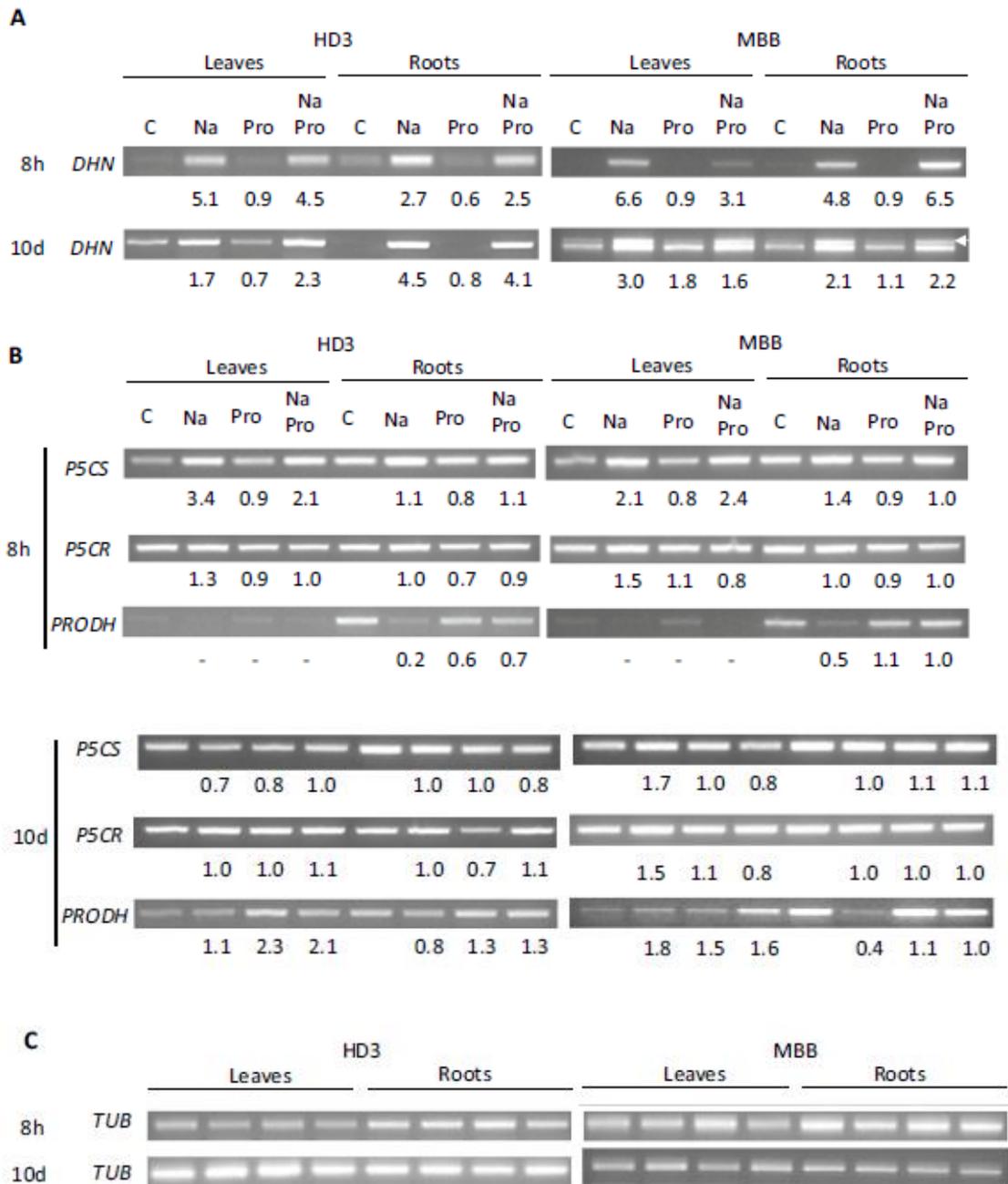


Fig. 1 Effect of salt and proline on proline accumulation in seedlings. Durum wheat seedlings of HD3 and MBB cultivars were grown for 10 days on medium in the presence of NaCl and proline (see “Materials and methods”). Proline accumulation in leaves and roots of a

HD3 and b MBB. Data are averages of at least three replicates, of 12 seedlings each, with bars indicating standard errors. In each panel, histograms marked with different letters indicate values that are significantly different ($p < 0.05$) in a two-way ANOVA Tukey's test



increased proline content even more, particularly in leaves that contained tenfold as much proline as control leaves (Fig. 1a, b). In these conditions, proline accumulated

more in MBB roots than HD3 roots (237 compared to 183 $\mu\text{mol/g DW}$).

Fig. 2 Stress and proline metabolism gene expression in durum wheat leaves. Durum wheat seedlings of HD3 and MBB cultivars subjected to salt stress in the presence or absence of proline in the growth medium (see “Materials and methods”) for 8 h or 10 days. RNA was extracted from leaves and roots. Gene expression was analysed by RT-PCR. Expression ratio relative to control is indicated below each panel (there is no figure for control sample). (-) refers to samples with weak signals that did not give a reliable reading. **a** Transcripts of the stress-related gene dehydrin (DHN). White arrow points to a double PCR product. **b** Transcripts of the proline metabolism genes P5C synthase (P5CS), P5C reductase (P5CR) and proline dehydrogenase (PDH). Numbers under gels in **a** and **b** indicate fold differences in transcript abundance relative to the control for each organ/cultivar set. **c** Transcripts of the control gene tubulin (TUB) whose expression is not affected by proline or stress, C control, Pro proline, Na NaCl

Effect of salt stress and proline on the expression of stress and proline-related genes

Using semi-quantitative reverse-transcription PCR, we measured the effect of salt stress on the expression of *TdDHN15.3* (shortened to *DHN* here), a durum wheat gene known to be responsive to water stress and salt stress that encodes a dehydrin (Rampino et al. 2006). We observed an increase in *DHN* transcripts in leaves and roots of seedlings exposed to 8-h salt stress. When proline is present with salt stress, *DHN* transcript increases less in leaves. In roots, proline alone has no effect but in combination with salt stress it stimulates *DHN* transcript accumulation (in MBB) (Fig. 2a). Plants stressed for 10 days still display *DHN* accumulation. The effect of proline on lowering the effect of stress on *DHN* accumulation is observed after 10 days in MBB leaves but not in HD3 cultivar (Fig. 2a). Proline alone also slightly modifies *DHN* transcript accumulation in MBB leaves after 10 days.

The expression of proline biosynthesis gene *P5CS* was up-regulated in leaves of both cultivars after 8 h of salt stress. In roots, *P5CS* gene expression was less obviously modulated by stress but the basal level of expression was higher than in leaves. *P5CS* transcript accumulation is lower in HD3 leaves and MBB roots of seedlings subjected to proline and salt stress. After 10 days of salt stress, *P5CS* expression ratio lowers to control level except in MBB roots where it increases under salt and it lowers with stress and added proline (Fig. 2b).

P5CR expression was high in control seedlings and was not influenced by the stress conditions (Fig. 2b). Here, we found that a short period of salt stress lowered *PRODH* expression in roots (Fig. 2b), but this effect was not observed when proline was present, especially for MBB. *PRODH* gene expression was slightly upregulated in the presence of proline alone, most noticeably in HD3 leaves after 10 days of exposure to proline.

Overall the stress-related and proline metabolism genes studied are regulated in a salt-stress and organ-specific

manner. Salt stress can transiently upregulate the expression of *P5CS* and repress the expression of *PRODH*. However, the two durum wheat cultivars differ in the fine regulation of these genes.

Differences in proline alleviation of stress marker expression in MBB and HD3

Relative water content (RWC) of leaves was similar in the two cultivars in control conditions. Under salt stress, leaf RWC was significantly lower (81%) for the MBB cultivar indicative of hyperosmotic stress (Fig. 3a). When proline was present during salt stress, the RWC of MBB remained similar to that of non-stressed controls (Fig. 3a). The proline alleviation effect on RWC is, therefore, cultivar specific.

SOD activity increased differently in salt-stressed HD3 and MBB plants (Fig. 3b). In HD3, it increases threefold in stress and more than fourfold when proline and salt stresses were combined (Fig. 3b). In MBB, the basal SOD activity was lower than in HD3, it doubled in salt stress, and remained at the control level when both salt and proline were combined (Fig. 3b). Under salt stress, MDA content increased in MBB but not in the HD3 cultivar (Fig. 3c). When both salt and proline were combined, MDA content remained at the control level in both cultivars (Fig. 3c).

Ion leakage from leaf tissues is a measure of membrane integrity which is affected by oxidative stresses and lipid peroxidation. We found that salt stress increased ion leakage while added proline counterbalanced the effect of salt stress in both cultivars (Fig. 3d). Proline, therefore, has different effects on antioxidative activity in MBB and HD3 under salt stress, with MBB generally being more responsive.

Proline rescues the detrimental effects of salt stress on seedling growth

Plant growth was evaluated by measuring the length of the longest leaves and roots and the fresh weight (FW) and dry weight (DW) of whole shoots and roots (Fig. 4a–c). In the absence of salt stress, proline stimulated the growth of the HD3 cultivar, with an increase in DW of 24% in leaves and 14% in roots (Fig. 4b, c). Proline stimulation of growth was negligible in MBB.

In both cultivars, NaCl had a negative impact on both leaf and root growth compared to the non-stressed controls (Fig. 4a–c). It was noted that the appearance of salt-stressed roots was altered near the meristem zone and near the root tip (Supplementary Fig. 1). Organ growth was differentially inhibited in the presence of NaCl as roots were more sensitive than shoots. Roots of both cultivars were similarly sensitive to salt stress with decreases in DW of 53% for MBB and 57% for HD3 (Supplementary Table 1). MBB leaves, however, were more sensitive to salt as they lost 32% of

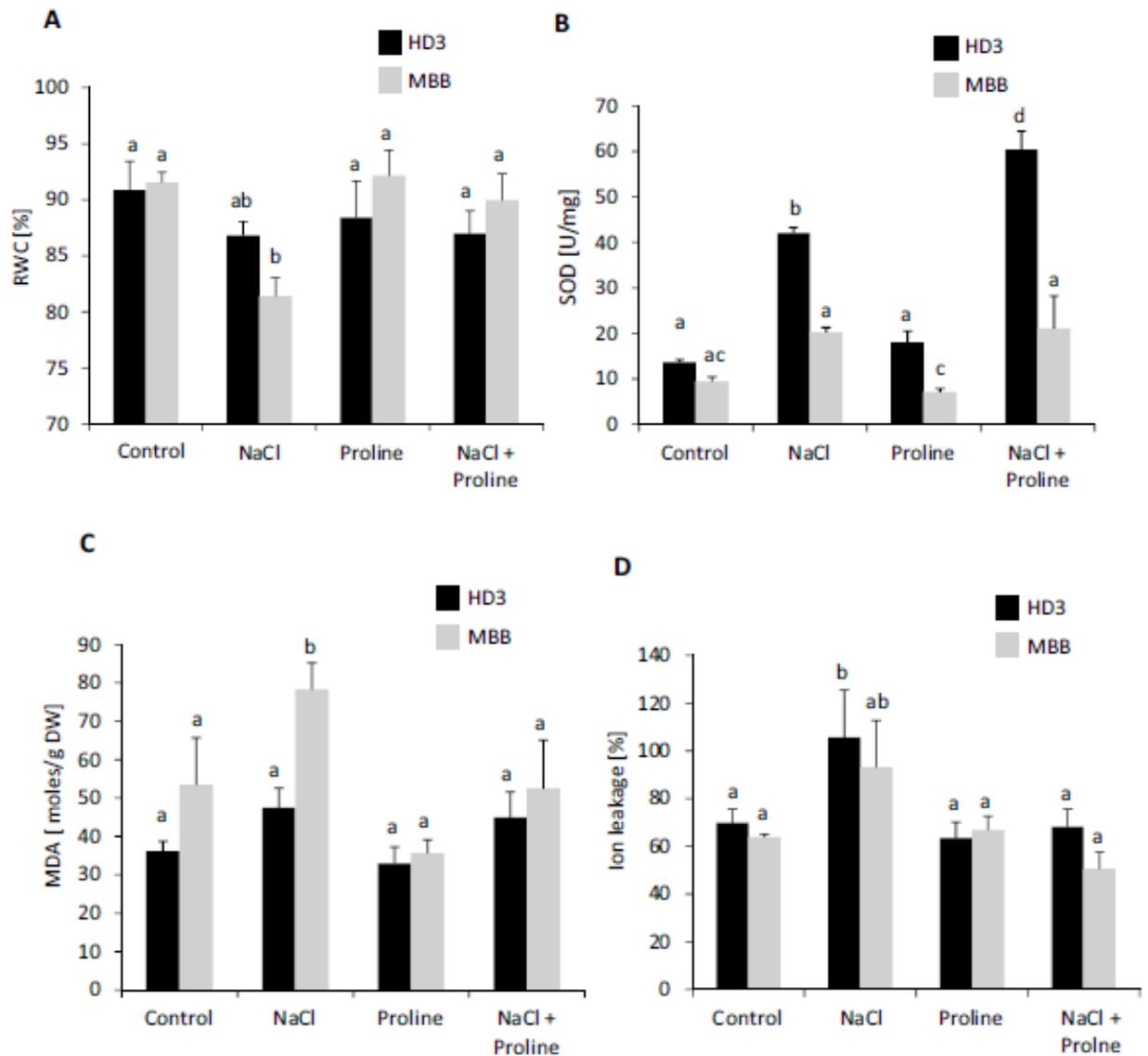


Fig. 3 Effect of salt and proline on stress physiology of durum wheat seedlings. Durum wheat seedlings of HD3 and MBB cultivars were grown for 10 days on medium containing NaCl and/or proline (see “Materials and methods”). **a** Relative water content (RWC), **b** superoxide dismutase (SOD) activity, **c** malondialdehyde (MDA) con-

centration, and **d** ion leakage of leaves. In each panel, histograms marked with different letters indicate values that are significantly different ($p < 0.05$) in a two-way ANOVA Tukey’s test. Data are averages of at least three replicates, of 12 seedlings each.

DW compared to 21% lost from HD3 leaves (Supplementary Table 1).

When proline was present during salt stress, a beneficial effect was observed as growth was partially restored in both durum wheat cultivars (Fig. 4a–c). The two durum wheat cultivars responded differently though. Proline

reduced the inhibitory effects of salt stress on root growth by 39% in HD3 and 9% in MBB, and on leaf growth by 5% in HD3 and 16% in MBB (Supplementary Tables 2 and 3). While proline can partially alleviate the negative effects of salt stress in durum wheat, each cultivar has specific salt and proline sensitivities in leaves and roots.

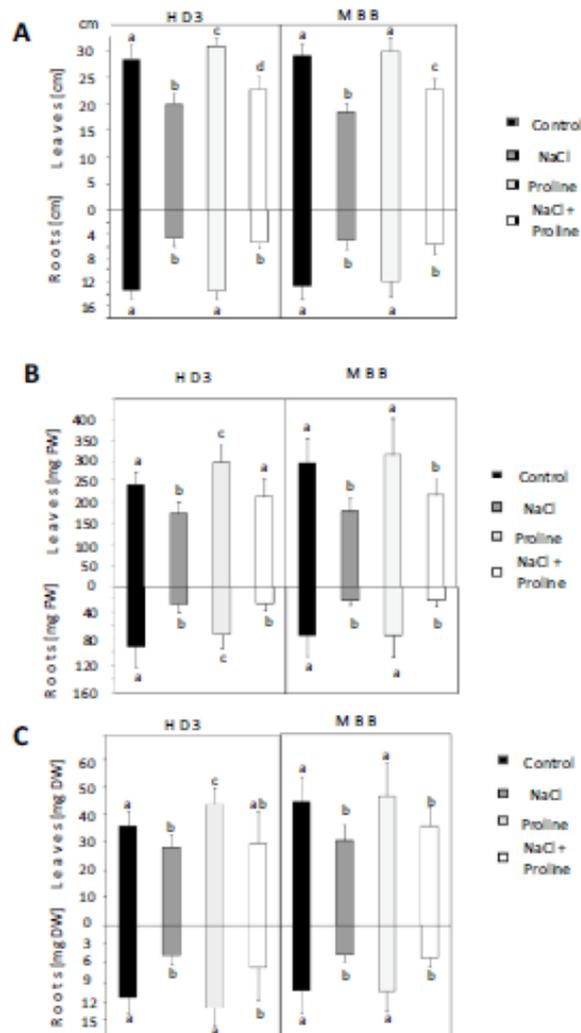


Fig. 4 Effect of salt and proline on growth of durum wheat seedlings. Durum wheat seedlings of HD3 and MBB cultivars were grown for 10 days on medium containing NaCl and/or proline (see “Materials and methods”). **a** Maximum length, **b** fresh weight, and **c** dry weight of leaves and roots. Data are averages of $n=12$ plants with error bars indicating standard errors. Within each panel, bars marked with different letters indicate significantly different values ($p < 0.05$) in two-way ANOVA Tukey’s test

Salt stress regulates sodium transporter gene expression

We compared the relative expression of two durum wheat *HKT1* genes *HKT1;4-1* and *-2* (Fig. 5). *HKT1;4-1* was expressed at a low level in leaves (Fig. 5). *HKT1;4-1* was

expressed in roots of control seedlings but this expression was repressed by salt stress (Fig. 5). The *HKT1;4-2* gene was expressed mainly in leaves where it was induced by salt stress in both durum wheat cultivars (Fig. 5). Weaker salt-stress induction of *HKT1;4-2* expression was also observed in MBB roots. The difference in expression between leaves and roots suggests that the transporters encoded by *HKT1;4-1* and *-2* have organ-specific regulation and roles. Although up- or downregulation of *HKT1;4* genes was observed after a few hours of salt stress, longer exposure to salt stress leaves and roots did not sustain the same levels of regulation (Fig. 5). Proline interfered with *HKT1;4-2* gene expression in HD3 cultivar leaves solely, after 8 h in the absence of stress and after 10 days under salt stress (Fig. 5).

Sodium and potassium levels in durum wheat seedlings under salt stress

Sodium content is very low, not more than $15 \mu\text{mol/g DW}$, in control seedlings with or without proline in the growth medium (Fig. 6a). The consequences of salt stress on sodium content were dramatic (Fig. 6b). Sodium content was a 100-fold higher in salt-stressed leaves (more than $1100 \mu\text{mol/g DW}$, Fig. 6b). Sodium was distributed differently in the two salt-stressed cultivars studied here. In HD3, sodium content in leaves and roots was similar. In MBB, more sodium accumulated in leaves (Fig. 6b). Adding proline to salt stress resulted in 50% less sodium in MBB leaves, but 30% more in roots, compared to the salt-stress sample (Fig. 6b). These results suggest that sodium accumulation is sensitive to proline in the MBB cultivar but not in the HD3 cultivar.

Here the HD3 and MBB cultivars, respectively, contained 712 and $987 \mu\text{mol/g DW}$ of potassium in control conditions (Fig. 6c). Surprisingly, when proline was present without salt stress, the potassium content of leaves was much higher,

respectively, 976 and $1887 \mu\text{mol/g DW}$ (Fig. 6c). Salt stress effects on potassium levels differed according to the organ and the cultivar (Fig. 6c). Salt stress caused a 37% reduction in the amount of potassium in MBB leaves but no change in potassium occurred in HD3 leaves. Potassium levels in roots are more affected by salt stress, with roots containing 55–69% less potassium than control. Proline modulates potassium in roots but only slightly (Fig. 6c).

Here we found that in control conditions, the K^+/Na^+ ratios of the two varieties were different, HD3 having lower ratios in both roots and leaves than MBB (Fig. 7). Under salt stress the K^+/Na^+ ratio was at least a 100-fold lower than in the control condition and proline did not significantly improve the K^+/Na^+ ratio under stress (Fig. 7).

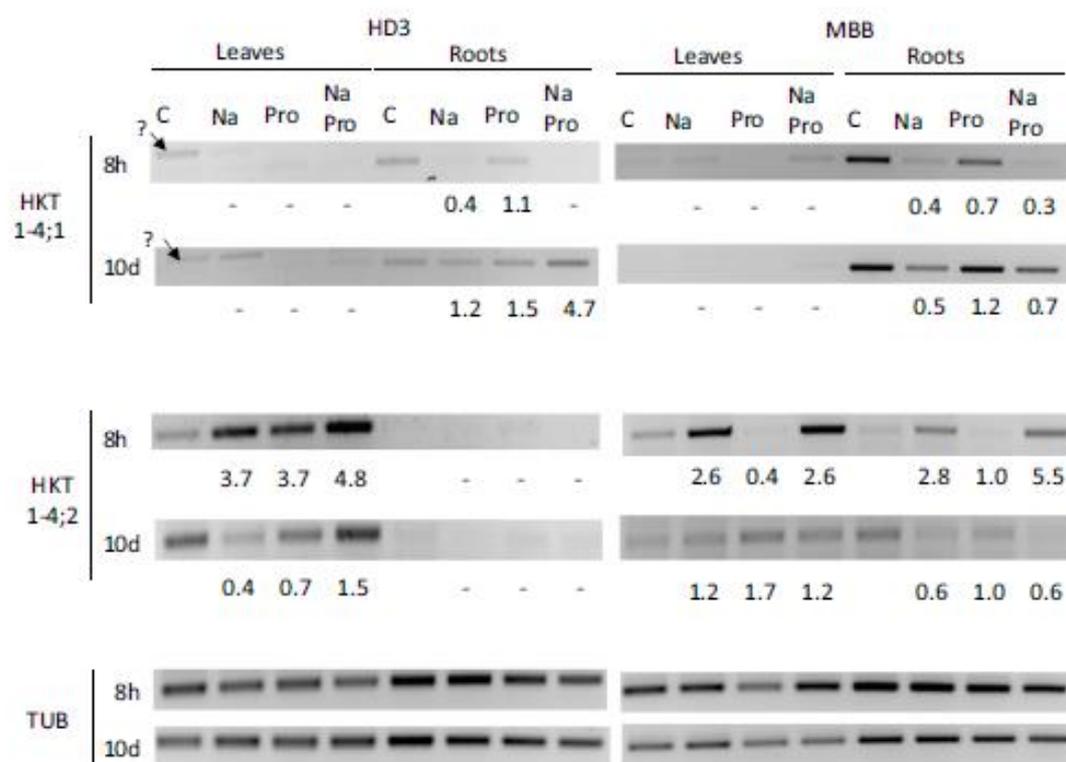


Fig. 5 Sodium transporter gene expression in durum wheat seedlings. Durum wheat seedlings of HD3 and MBB cultivars were subjected to salt stress in the presence or absence of proline in the growth medium for 8 h or 10 days (see "Materials and methods"). RNA was extracted from leaves and roots. Gene expression was analysed by RT-PCR by amplifying transcripts of sodium transporter genes HKT1;4-1 and

HKT1;4-2 and control gene tubulin. Gene expression was analysed by RT-PCR. Expression ratio relative to control is indicated below each panel (there is no figure for control sample). (-) refers to samples with weak signals that did not give a reliable reading. Arrows with question marks indicate spurious bands that do not correspond to the transcript of interest

Discussion

Salt stress affects durum wheat seedling growth

Durum wheat is one of the most salt-sensitive cereal crops. Compared to bread wheat or other *Triticum* species, durum wheat has a relatively low ability to exclude sodium (James et al. 2006; Munns et al. 2006; Rampino et al. 2006), it does not efficiently store sodium in cellular compartments (Wu et al. 2018), and its root meristem is less perceptible to salt stress (Wu et al. 2018). The decrease in leaf RWC in seedlings grown in the presence of NaCl indicates that a hyperosmotic stress is occurring in leaf tissues. The accumulation of sodium ions would also cause ionic stress, which is often also associated with oxidative stress. The deleterious effect of salt stress on durum wheat seedling growth was mitigated by proline, as also reported for bread wheat (Talat et al. 2013), rice (Sobahan et al. 2009), barley (Lone et al. 1987), and other plant species (Butt et al. 2016; Szabados and Savoure 2010; Khedr et al.

2003; Medeiros et al. 2015; Nassef et al. 2007; reviewed by Per et al. 2017).

We found that durum wheat root tissues became disorganized in the presence of salt. Wheat root cells from the division and transition zone have been described as being severely altered by salt stress (Annunziata et al. 2017). Proline might act as a signal molecule by modulating the cell division in root in *Arabidopsis thaliana* (Biancucci et al. 2015). Here proline effect on root growth is weak.

Durum wheat tolerance to salt varies greatly according to the cultivar studied and the method used, including aquaponics and in vitro (Wu et al. 2018). Leaf-growth sensitivity to salt stress is lower for HD3 than for MDD, suggesting a difference in salt stress effect between these two cultivars.

Our results suggest that the responses of MBB leaves and of HD3 roots to added proline can minimize the harmful effects of NaCl stress. The salt-stress alleviation effect of proline, therefore, also depends on the cultivar studied (Per et al. 2017).

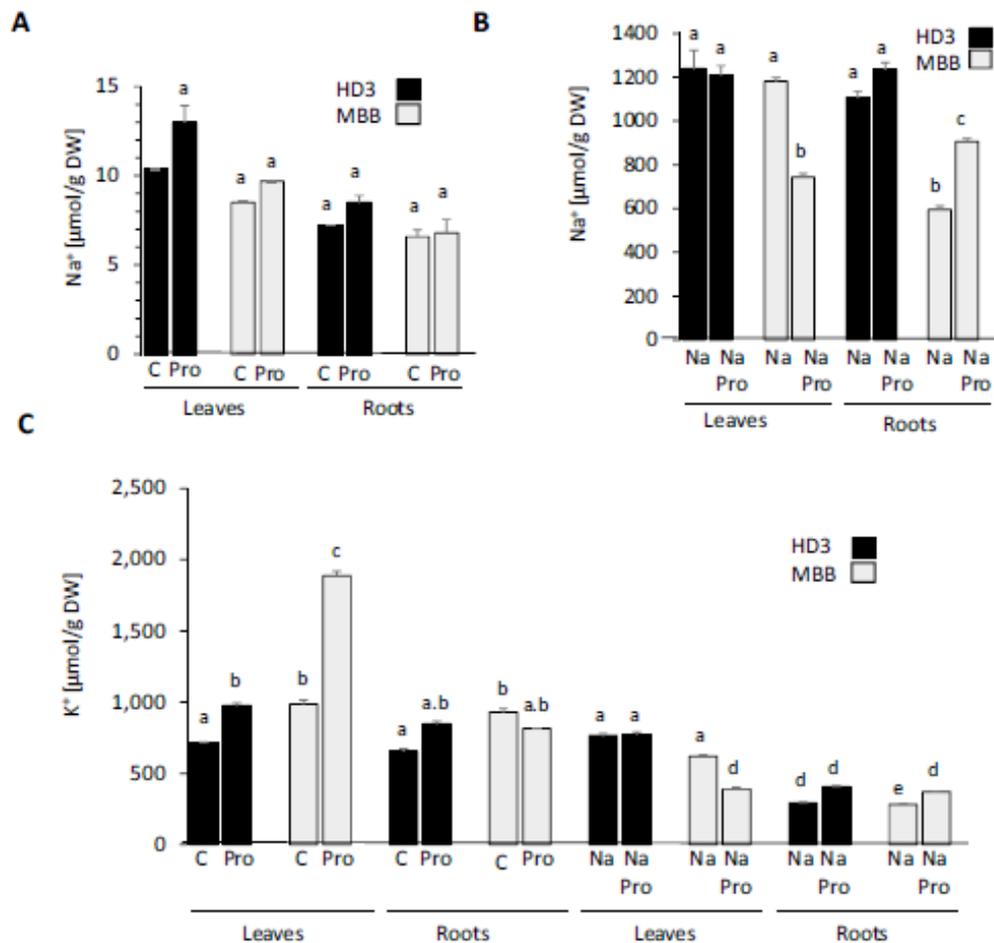


Fig. 6 Sodium and potassium levels in durum wheat seedlings. Durum wheat seedlings of HD3 and MBB cultivars were grown on medium in the presence or absence of NaCl and/or proline (see “Materials and methods”). **a** Sodium ion (Na⁺) levels in leaves and roots of control seedlings. **b** Sodium ion (Na⁺) levels in leaves and roots of salt-stressed seedlings. **c** Potassium ion (K⁺) levels of con-

trol and salt-stressed seedlings. In each panel, histograms marked with different letters indicate significantly different values. Data are averages of $n=12$ plants with error bars indicating standard errors. Within each panel, bars marked with different letters indicate significantly different values ($p < 0.05$) in two-way ANOVA Tukey’s test. C control, Pro proline, Na NaCl

Salt stress and exogenous proline increase proline content and modulate proline biosynthesis gene expression

Proline is a compatible osmolyte with cellular protective properties, and proline accumulation is an indicator of stress such as hyperosmotic and ionic stress (Verslues and Sharma 2010; Szabados and Savoure 2010; Mansour and Ali 2017). The protection provided by accumulated proline was shown to vary according to the genotype and stress intensity (Plazek et al. 2013; Rana et al. 2016). Salt tolerance does not correlate with endogenous proline in durum and bread wheat (Plazek et al. 2013). However, higher levels

of proline accumulation have been reported in more salt-tolerant durum wheat genotypes (Rana et al. 2016). Proline accumulation was found induced by salt stress in leaves of both cultivars with a higher proline concentration in stressed MBB leaves, suggesting that the accumulated proline is a marker of the perceived intensity of stress (Almansouri et al. 1999; Munns 2002) and does not correlate with stress tolerance (Plazek et al. 2013). Proline accumulation in durum wheat is higher when proline is added to the culture medium and even higher in combination of proline and stress. Plants readily uptake and transport proline even under salt stress conditions (Bar-Nun and Poljakoof-Mayber 1977). The highest proline concentration was found in leaves for both

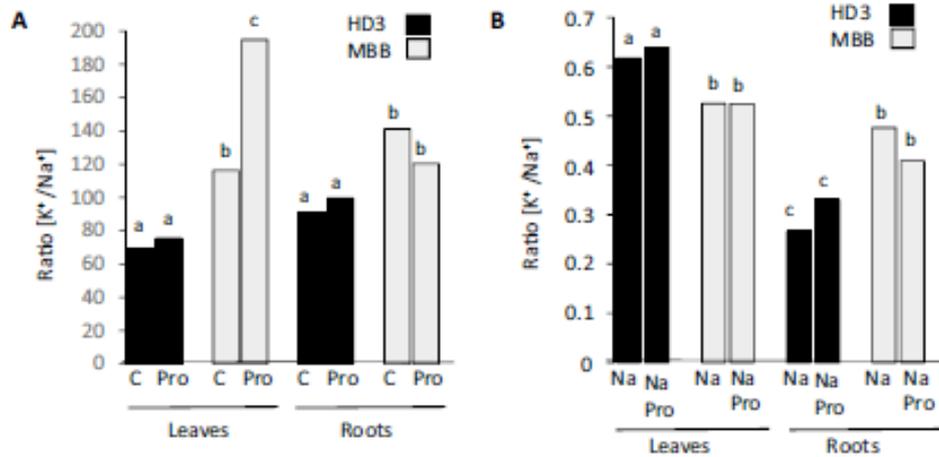


Fig. 7 Potassium to sodium ratio in durum wheat seedlings. Ratio of potassium to sodium ion concentrations in leaves and roots of control (left panel) and salt-stressed (right panel) seedlings (grown as in Fig. 6). Note the different scales on the vertical axes. Data are

averages of at least three independent measurements with error bars indicating standard errors. In each panel, bars marked with different letters indicate significantly different values ($p < 0.05$) in a two-way ANOVA Tukey's test. *C* control, *Pro* proline, *Na* NaCl

cultivars, which suggests that externally added proline is accumulated and transported within the plant organs (Rentsch et al. 1996). Proline accumulated in greater quantities might have provided plants protection against oxidative stress salt stress (Verslues and Sharma 2010; Szabados and Savoure 2010; Mansour and Ali 2017).

P5CS, encoding the enzyme responsible for *P5C*, proline precursor, biosynthesis had been correlated to proline accumulation in durum wheat and possibly to proline synthesis (Annunziata et al. 2017; Amini et al. 2015). We observed *P5CS* mRNA abundance increase of after 8 h of salt stress in leaves. *P5CR*, another gene involved in proline biosynthesis, was not as obviously modulated as *P5CS*, as already shown in durum wheat (Mattioni et al. 1997) and contrasting with the modulation reported in bread wheat (Ma et al.

The apparent higher accumulation of proline in leaves than in roots, could be the combined result of salt-stress induced proline synthesis, inhibition of catabolism and long distance transport from the growth medium to the leaves.

Our results suggest that while proline synthesis is upregulated in durum wheat, it is not sufficient to overcome the deleterious effects of the severe salt stress imposed.

The durum wheat seedlings studied were able to take up exogenous proline provided in medium. Increases in free proline content resulting from uptake of exogenous proline has indeed been observed in plants including wheat, rice and sugarcane (Hur et al. 2004; Mahboob et al. 2016; Medeiros et al. 2015). Proline accumulated in vivo from an exogenous source can complement the low level of proline produced endogenously to counterbalance salt-stress effects.

2008). We found that expression of proline catabolism gene *PRODH* was downregulated by salt stress, as found in many plant species (Peng et al. 1996; Servet et al. 2012). In roots, *PRODH* is repressed after 8-h salt stress in both cultivars. After 10 days of treatment, HD3 and MBB cultivars differ in their gene expression. *PRODH* mRNA abundance is regulated by salt stress in MBB roots not in HD3. Proline content after 10 days of stress does not correlate with low *PRODH* mRNA abundance. Possibly, *PRODH* activity is down-regulated by salt stress, as seen in many plants including durum wheat (Mattioni et al. 1997; Soccio et al. 2010).

PRODH gene expression is known to be up-regulated by proline (Verslues and Sharma 2010; Yoshida et al. 1997; Servet et al. 2012; Cabassa-Hourton et al. 2016). *PRODH* increases two times in HD3 after 10 days of growth with proline. Proline could have been used as a mitochondrial substrate to provide energy (Cabassa-Hourton et al. 2016).

We observed a correlation between proline accumulation and less salt stress, as shown by oxidative stress marker levels. The combination of salt and proline had different effects on ROS detoxification, membrane integrity protection and growth according to the organ and cultivar studied.

Tissue-specific and differential regulation of *HKT1,4-1* and *-2* genes by salt stress

Sodium transporters contribute to lowering otherwise toxic sodium levels in plant tissues (Huang et al. 2006, 2008; James et al. 2006, 2011; Byrt et al. 2014; Wu et al. 2018). High-affinity potassium transporters (*HKT*) class 1 transporters have also been associated with salt stress tolerance in durum wheat (Horie et al. 2009; Byrt et al. 2014), and *HKT* genes are important for sodium tolerance in *Triticum species* (Huang et al. 2006, 2008; James et al. 2006, 2011; Byrt et al.

2014). Here we found that *TdHKT1;4-1* and *TdHKT1;4-2* expression is organ specific and is responsive to short-term salt treatments. Basal expression of *TdHKT1;4-1* in roots is repressed by salt which suggests *TdHKT1;4-1* may be important in regulating ionic balance in the absence of salt stress. By contrast, *TdHKT1;4-2* was induced in response to short-term salt stress. The pattern of *TdHKT1;4-2* expression is similar in both cultivars, with long-term induction observed in HD3 leaves. *TdHKT1;4-2* could be important for regulating salt and balance at early stages of salt stress. The differences in regulation of *TdHKT1;4-1* and *-2* genes in leaves and roots and by salt stress suggest that durum wheat class-I HKT have different physiological roles.

The introduction in durum wheat of *HKT* genes from *T. monococcum* (*TmHKT1;4-A1* and *A2*) confers salt tolerance (James et al. 2006, 2011). Expression of *TmHKT1;4* is salt responsive in *T. monococcum* leaves (Tounsi et al. 2016). *TmHKT1;4-A1* is predominantly expressed in leaves. *TmHKT1;4-A2* is more strongly expressed than *TmHKT1;4-A1* in roots and in leaves (Tounsi et al. 2016). Sodium conductance of *TmHKT1;4-A2* is also higher than that of *TmHKT1;4-A1*. *TmHKT1;4-A2* gene may have a predominant role, possibly representing the active part of the *Nax1* salt tolerance locus (Tounsi et al. 2016). In our study *TdHKT1;4* gene expression was relatively low in prolonged salt stress, suggesting that any role in sodium exclusion is limited. Comparing *HKT1;4* gene expression in *T. durum* and *T. monococcum* thus helps us understand why durum wheat is relatively salt intolerant. Externally added proline

can to some extent protect durum wheat seedlings from the harmful effects of salt, and can modulate gene expression, including *HKT1;4* genes, but it is not sufficient to provide full protection against salt stress. A recent study on hydroponic grown durum wheat stressed with 200 mM NaCl (Wu et al. 2018) suggested that the combination of sodium sensing, root sodium exclusion and sodium accumulation in vacuoles might be key to explaining the difference in salt tolerance between bread wheat and durum wheat (Wu et al. 2018). The *NHX1* sodium transporter might be involved in this process (Wu et al. 2018). Possibly, regulation of *HKT1* gene expression and HKT activity might also be involved in salt tolerance.

Na⁺ and K⁺ accumulation is disturbed by salt stress

Plant tissues readily accumulate potassium (Ashley et al. 2006). The K⁺/Na⁺ ratio can be used as an indicator of the level of salt tolerance in durum wheat cultivars (James et al. 2006). Both durum wheat cultivars accumulated Na⁺ in shoots and roots under salt stress. K⁺ decreased in roots resulting in an ion imbalance, that is a low K⁺/Na⁺ ratio, as seen in numerous salt stress studies in plants (Cuin et al. 2008). Leaves accumulated more Na⁺ than roots, which

reflects the long-distance transport of Na⁺ cations from root tissues to photosynthetic tissues. This result confirmed that durum wheat has limited capacity to control and minimize sodium transport to the shoots compared with other, *Triticaceae* such as *T. aestivum* and *T. monococcum* (Tounsi et al. 2016). Durum wheat cultivar HD3 was able to maintain a slightly higher K⁺ content in leaves which might allow for better cell protection under NaCl stress (Horie et al. 2009). Our results can be compared with those of *T. aestivum* (Talat et al. 2013) and salt-sensitive rice where added proline leads to a decrease in shoot Na⁺ content by lowering apoplastic uptake of Na⁺ (Nounjan et al. 2012; Sobahan et al. 2009). Positive impacts of proline on ion content have also been observed in other monocot species such as sugarcane (Medeiros et al. 2015) and maize (Nassem et al. 2007).

Proline in combination with salt stress led to a decrease in the Na⁺ content of MBB leaves, whose growth was the most responsive to proline (Supplementary Table 2). In MBB roots, which were less responsive to proline, Na⁺ content increased. However, no effect of proline on Na⁺ accumulation was observed in the HD3 cultivar. Proline can help maintain ion homeostasis by limiting K⁺ efflux in several species (Cuin and Shabala 2005, 2007). The proline effect on salt sensitivity, therefore, depends on species and genotype (Plazek et al. 2013; Per et al. 2017; Wu et al. 2018).

Conclusion

The two Algerian durum wheat cultivars studied here have different sensitivities to salt stress and to proline alleviation of this stress. The *in vitro* methods used here could be used to test durum wheat genotypes for their salt and proline sensitivities before field tests for breeding or large-scale experiments, although *in vitro* and field tolerance to salt stress do not necessarily correspond (Munns et al. 2006; Tavakkoli et al. 2012). A comparison of the tested genotypes on salt-contaminated soil would help validate our observation of a beneficial use of proline for salt tolerance in durum wheat.

Author contribution statement KA did most of the experimental work, suggested experiments, analyzed data and contributed to the manuscript writing and revising. SP contributed to most of the experiments set-up and supervised the molecular biology experiments, contributed to the manuscript writing and revising. CC contributed to experiments set-up, supervised the biochemistry experiments, and contributed to the manuscript writing and revising. AG performed the roots anatomy observations and contributed to the manuscript revising. A-AV designed the gene expression studies of HKT genes, revised and improved the manuscript. MK initiated the project and revised the manuscript. RD initiated the project, analyzed the data and revised the

manuscript. OA-B initiated and funded the project, analyzed the data, co-wrote and revised the manuscript. PC supervised the project, set up experiments, analyzed data, wrote, revised and submitted the manuscript.

Acknowledgements KA was the recipient of a grant from the Algerian Ministry of Higher Education for PhD training (PNE program). OAB, RD, SP, CC, PC and KA were funded by the French–Algerian exchange program “Partenariat Hubert Curien” Tassili 12MDU854.

References

- Ali Dib T, Monneveux P (1992) Adaptation à la sécheresse et notion d'idéotype chez le blé dur. I. Caractères morphologiques d'enracinement. *Agronomy* 12:371–379
- Almansouri M, Kinet J-M, Lutts S (1999) Compared effects of sudden and progressive impositions of salt stress in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars. *J Plant Physiol* 154:743–752. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(99\)80253-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(99)80253-3)
- Almeida DM, Oliveira MM, Saibo NJM (2017) Regulation of Na⁺ and K⁺ homeostasis in plants: towards improved salt stress tolerance in crop plants. *Gene Mol Biol* 40:326–345. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0106>
- Amini S, Ghobadi C, Yamchi A (2015) Proline accumulation and osmotic stress: an overview of P5CS gene in plants. *J Plant Mol Breed* 3:44–55. <https://doi.org/10.22058/JPMB.2015.17022>
- Anderson LE (1954) Hoyer's solution as a rapid permanent mounting medium for bryophytes. *Bryologist* 57:242–244
- Annunziata MG, Ciarmiello LF, Woodrow P, Maximova E, Fuggi A, Carillo P (2017) Durum wheat roots adapt to salinity remodeling the cellular content of nitrogen metabolites and sucrose. *Front Plant Sci* 9(7):2035. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02035>
- Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science* 285:1256–1258. <https://doi.org/10.1126/science.285.5431.1256>
- Ashley MK, Grant M, Grabov A (2006) Plant responses to potassium deficiencies: a role for potassium transport proteins. *J Exp Bot* 57:425–436. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj034>
- Bar-Nun N, Poljakoff-Mayber A (1977) Salinity stress and the content of proline in roots of *Pisum sativum* and *Tamarix tetragyna*. *Ann Bot* 41:173–179. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a085265>
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205–207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287
- Beyer WF Jr, Fridovich I (1987) Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analyt Biochem* 161:559–566. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90489-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90489-1)
- Biancucci M, Mattioli R, Moubayidin L, Sabatini S, Costantino P, Trovato M (2015) Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 15:263. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0637-8>
- Butt M, Ayyub CM, Amjad M, Ahmad R (2016) Proline application enhances growth of chilli by improving physiological and biochemical attributes under salt stress. *Pak Agric Sci* 53:43–49
- Byrt CS, Xu B, Krishnan M, Lightfoot DJ, Athman A, Jacobs AK, Watson-Haigh NS, Plett D, Munns R, Tester M, Gilliam M (2014) The Na⁺ transporter, TaHKT1;5-D, limits shoot Na⁺ accumulation in bread wheat. *Plant J* 80:516–526. <https://doi.org/10.1111/tpj.12651>
- Cabassa-Hourton C, Schertl P, Bordenave-Jacquemin M, Saadallah K, Guivarc'h A, Lebreton S, Planchais S, Klodmann J, Eubel H, Crilat E, Lefebvre-De Vos D, Ghelis T, Richard L, Abdely C, Carol P, Braun HP, Savouré A (2016) Proteomic and functional analysis of proline dehydrogenase 1 link proline catabolism to mitochondrial electron transport in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 473:2623–2634. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160314>
- Colmer TD, Flowers TJ, Munns R (2006) Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *J Exp Bot* 57:1059–1078
- Corwin DL, James D, Rhoades SJ (2007) Leaching requirement for soil salinity control: steady-state versus transient models. *Agric Water Manag* 90:165–180. <https://doi.org/10.1016/j.agwat>
- Cuin TA, Shabala S (2005) Exogenously supplied compatible solutes rapidly ameliorate NaCl-induced potassium efflux from barley roots. *Plant Cell Physiol* 46:1924–1933
- Cuin TA, Shabala S (2007) Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Environ* 30:875–885
- Cuin TA, Betts SA, Chalmandrier R, Shabala S (2008) A root's ability to retain K⁺ correlates with salt tolerance in wheat. *J Exp Bot* 59:2697–2706
- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J* 4:215–223
- Dionisio-Sese ML, Tobita S (2000) Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *J Plant Physiol* 157:54–58. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80135-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80135-2)
- Eilthon TE, Stewart CR (1981) Submitochondrial location and electron transport characteristics of enzymes involved in proline oxidation. *Plant Physiol* 67:780–784. <https://doi.org/10.1104/pp.67.4.780>
- Feki K, Quintero FJ, Pardo JM, Masmoudi K (2011) Regulation of durum wheat Na⁺/H⁺ exchanger TdSOS1 by phosphorylation. *Plant Mol Biol* 76:545–556. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9787-8> (epub 2011 May 15)
- Hamamoto S, Horie T, Hauser F, Deinlein U, Schroeder JI, Uozumi N (2015) HKT transporters mediate salt stress resistance in plants: from structure and function to the field. *Curr Opin Biotechnol* 3:113–120
- Hanin M, Ebel C, Ngom M, Laplaze L, Masmoudi K (2016) New insights on plant salt tolerance mechanisms and their potential use for breeding. *Front Plant Sci* 7:1787. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01787>
- Hare PD, Cress WA, Staden JV (1999) Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *J Exp Bot* 50:413–434
- Hayat S, Hayat Q, Alyemeni MN, Wani AS, Pichtel J, Ahmad A (2012) Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav* 7:1456–1466
- Heath RN, Packer H (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198
- Hodges DM, DeLong JM, Forney CF, Prange RK (1999) Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207:604–611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Hoque MA, Okuma E, Banu MNA, Nakamura Y, Shimoishi Y, Murata Y (2007) Exogenous proline mitigates the detrimental effects of salt stress more than exogenous betaine by increasing antioxidant enzyme activities. *J Plant Physiol* 164:553–561

- Horie T, Hauser F, Schroeder JI (2009) HKT transporter-mediated salinity resistance mechanisms in *Arabidopsis* and monocot crop plants. *Trends Plant Sci* 14:660–668
- Horie T, Karahara I, Katsuhara M (2012) Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: an overview with the central focus on rice plants. *Rice* 5:1–18
- Hu CA, Delauney AJ, Verma DP (1992) A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9354–9358. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9354>
- Huang S, Spielmeier W, Lagudah ES, James RA, Platten JD, Dennis ES, Munns R (2006) A sodium transporter (HKT7) is a candidate for Nax1, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiol* 142:1718–1727
- Huang S, Spielmeier W, Lagudah ES, Munns R (2008) Comparative mapping of HKT genes in wheat, barley, and rice, key determinants of Na⁺ transport, and salt tolerance. *J Exp Bot* 59:927–937. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern033>
- Hur J, Jung KH, Lee CH, An GH (2004) Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Sci* 167:417–426
- James RA, Davenport RJ, Munns R (2006) Physiological characterisation of two genes for Na⁺ exclusion in durum wheat: Nax1 and Nax2. *Plant Physiol* 142:1537–1547
- James RA, Blake C, Byrt CS, Munns R (2011) Major genes for Na⁺ exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *J Exp Bot* 62:2939–2947
- Joseph B, Jini D (2010) Insight into the role of antioxidant enzymes for salt tolerance in plants. *Int J Bot* 6(4):456–464
- Julkowska MM, Testerink C (2015) Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci* 20:586–594
- Khedr AHA, Abbas MA, Wahid AAA, Quick WP, Abogadallah GM (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Panicum maritimum* L. to salt-stress. *J Exp Bot* 54:2553–2562
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013) Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal* 19:998–1011
- Lone MI, Kueh JSH, Jones RW, Bright SWJ (1987) Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultured barley embryos. *J Exp Bot* 38:479–490
- Ma L, Zhou E, Gao L, Mao X, Zhou R, Jia J (2008) Isolation, expression analysis and chromosomal location of P5CR gene in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *S Afr J Bot* 74:705–712. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2008.05.003>
- Mahboob W, Khan MA, Shirazi MU (2016) Induction of salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings through exogenous application of proline. *Pak J Bot* 48:861–867
- Mansour MMF, Ali EF (2017) Evaluation of proline functions in saline conditions. *Phytochemistry* 140:52–68
- Mattioni C, Lacerenza NG, Troccoli A, De Leonardi AM, Fonzo ND (1997) Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiol Plant* 101:787–792
- Medeiros MJL, De-A-Silva MM, Granja MMC, De-Souza-E-Silva-Júnior G, Camara T, Willadino L (2015) Effect of exogenous proline in two sugarcane genotypes grown in vitro under salt stress. *Acta Biol Colomb* 20(2):57–63. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.42830>
- Mekhlouf A, Bouzerzour H, Benmahammed A, Hadj Sahraoui A, Harkati N (2006) Adaptation des variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) au climat semi-aride: Science et changements planétaires. *Sécheresse* 17:507–513. <https://doi.org/10.1684/sec.2006.0054>
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33:453–467. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02041.x>
- Monneveux P, Nemmar M (1986) Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.): étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agro EDP Sci* 6:583–590
- Munns R (2002) Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239–250. <https://doi.org/10.1046/j.0016-8025.2001.00808.x>
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol* 59:651–681. <https://doi.org/10.1146/annurev.arpla.59.032607.092911>
- Munns R, James RA, Lauchli A (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J Exp Bot* 57:1025–1043
- Munns R, Wallace PA, Teakle NL, Colmer TD (2010) Measuring soluble ion concentrations (Na⁺, K⁺, Cl⁻) in salt-treated plants. In: Sunkar R (ed) *Plant stress tolerance: methods and protocols*. Humana Press, London, pp 371–382. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0> (Series ISSN 1064-3745)
- Munns R, James RA, Xu B, Athman A, Conn SJ, Jordans C, Byrt CS, Hare RA, Tyerman SD, Tester M, Plett D, Gilliam M (2012) Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na transporter gene. *Nat Biotechnol* 30:360–366
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Planta* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nassem MG, Hussein MA, Moussa AA (2007) The effects of irrigation water salinity, potassium nitrate fertilization, proline foliar application and leaching fraction on the growth and chemical composition of corn grown in calcareous soil. *Egypt J soil Sci* 47:233–251
- Nounjan N, Nghia PT, Theerakulpisut P (2012) Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. *J Plant Physiol* 169:596–604. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.004>
- Pang CH, Wang BS (2008) Oxidative stress and salt tolerance in plants. In: Lüttge U, Beyschlag W, Murata J (eds) *Progress in botany: gene physio system ecol*. Springer, Berlin, pp 231–245
- Peng Z, Lu Q, Verma DPS (1996) Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes control levels during and after osmotic stress in plants. *Mol Gen Genet* 253:334341
- Per TS, Khan NA, Reddy PS, Masood A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA (2017) Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant Physiol Biochem* 115:126–140. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.018>
- Platten JD, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very AA, Zhu JK, Dennis ES, Tester M (2006) Nomenclature for HKT genes, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends Plant Sci* 11(8):372–374
- Plazek A, Tatrzańska M, Maciejewski M, Koscielniak J, Gondek K, Bojarczuk J, Dubert F (2013) Investigation of the salt tolerance of new polish bread and durum wheat cultivars. *Acta Physiol Plant* 35:2513–2523. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1287-9>
- Ramezani A, Niazi A, Abolmoghdam AA, Zamani Babgohari M, Deihimi T, Ebrahimi M, Akhtardanesh H, Ebrahimi E (2013) Quantitative expression analysis of TaSOS1 and TaSOS4 genes in cultivated and wild wheat plants under salt stress. *Mol Biotechnol* 53:189–197. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9513-z>
- Rampino P, Pataleo S, Gerardi C, Mita G, Perrotta C (2006) Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. *Plant Cell Environ* 29:2143–2152

- Rana V, Ram S, Nehra K, Sharma I (2016) Expression of genes related to Na⁺ exclusion and proline accumulation in tolerant and susceptible wheat genotypes under salt stress. *Cereal Res Commun* 44(3):404–413. <https://doi.org/10.1556/0806.44.2016.009>
- Rentsch D, Hirner B, Schmelzer E, Frommer WB (1996) Salt stress induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* 8:1437–1446. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.8.1437>
- Roy D, Basu N, Bhunia A, Banerjee SK (1993) Counteraction of exogenous L-proline with NaCl in salt-sensitive cultivar of rice. *Biol Plant* 35:69–72
- Saibi W, Brini F (2018) Superoxide dismutase (sod) and abiotic stress tolerance in plants: an overview. In: Magliozzi S (ed) *Superoxide dismutase*. Nova Science Publishers Inc, New York, pp 101–142
- Servet C, Ghelis T, Richard L, Zilberstein A, Savoure A (2012) Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis. *Front Biosci* 17:607–620. <https://doi.org/10.2741/3947>
- Shabala S, Wu H, Bose J (2015) Salt stress sensing and early signalling events in plant roots: current knowledge and hypothesis. *Plant Sci* 241:109–119
- Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu J-K (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci* 97:6896–6901
- Shi H, Quintero FJ, Pardo JM, Zhu JK (2002) The putative plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter *SOS1* controls long-distance Na⁺ transport in plants. *Plant Cell* 14(2):465–477
- Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro AE, Reyes-Agüero JA, Aguado-Santacruz GA, Jiménez-Bremont JF (2008) Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol Biochem* 46:82–92
- Sobahan MA, Arias CR, Okuma E, Shimoishi Y, Nakamura Y, Hirai Y, Mori IC, Murata Y (2009) Exogenous proline and glycinebetaine suppress apoplastic flow to reduce Na(+) uptake in rice seedlings. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:2037–2042
- Soccio M, Laus MN, Spera GP, Trono D, Pompa M, Flagella Z, Pastore D (2010) Mitochondrial proline oxidation is affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings. *Ann Appl Biol* 157:1–11
- Szabados L, Savoure A (2010) Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 15:89–97
- Talat A, Nawaz K, Hussain K, Bhatti KH, Siddiqi EH, Khalid A, Anwer S, Sharif MU (2013) Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Appl Sci J* 22:547–554
- Tavakkoli E, Fatehi F, Rengasamy P, McDonald GK (2012) A comparison of hydroponic and soil-based screening methods to identify salt tolerance in the field in barley. *J Exp Bot* 63:3853–3867. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers085>
- Tounsi S, Ben Amar S, Masmoudi K, Sentenac H, Brini F, Véry A-A (2016) Characterization of Two HKT1;4 transporters from *Triticum Monococcum* to elucidate the determinants of the wheat salt tolerance *Nax1* QTL. *Plant Cell Physiol* 57:2047–2057. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw123>
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35:753–759
- Verbruggen N, Villarroel R, Montagu MV (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 103:771–781
- Verslues PE, Sharma S (2010) Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *Am Soc Plant Biol*. <https://doi.org/10.1199/tab.0140>
- Waters S, Gilliam M, Hrmova M (2013) Plant high-affinity potassium (HKT) transporters involved in salinity tolerance: structural insights to probe differences in ion selectivity. *Int J Mol Sci* 14:7660–7680
- Wu H, Shabala L, Azzarello E, Huang Y, Pandolfi C, Su N, Wu Q, Cai S, Bazihizina N, Wang L, Zhou M, Mancuso S, Chen Z, Shabala S (2018) Na⁺ extrusion from the cytosol and tissue-specific Na⁺ sequestration in roots confer differential salt stress tolerance between durum and bread wheat. *J Exp Bot* 69:3987–4001. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery194>
- Yoshida Y, Kiyosue T, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1997) Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant Cell Physiol* 38:1095–1102
- Zhang L, Becker DF (2015) Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Front Plant Sci* 6:1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00552>
- Zhang Y, Liu Z, Khan AA, Lin Q, Han Y, Mu P, Liu Y, Zhang H, Li L, Meng X, Ni Z, Xin M (2016) Expression partitioning of homeologs and tandem duplications contribute to salt tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep* 6:1–10. <https://doi.org/10.1038/srep21476>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.