

Introduction

Cette étude a été menée dans le but de déterminer les changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et enzymatiques, de deux variétés de blé dur *Triticum durum*, soumises à différents stress : salinité, Zinc, ainsi que leurs additions.

1. Matériels utilisés

1.1. Matériel végétale

L'expérimentation est menée sur des grains de blé dur (*Triticum durum* Desf.). Il s'agit de deux génotypes (*Sémito* et *GTA dur*) fournis par l'OAIC (l'Office Algérien Interprofessionnel des Céréales) de la wilaya d'Annaba, nord est algérien.

Classification du blé dur :

Règne : Plantae
Sous règne : Tracheobionta
Embranchement : spermaphyte.
Sous embranchement : angiosperme.
Classe : monocotylédones.
Ordre : poales.
Sous ordre : comméliniflorales.
Famille : graminaceae ou poaceae.
Genre : *Triticum*
Espèce : *durum*

Sémito : une variété originaire d'Italie, qui se caractérise par un cycle précoce, d'une paille moyenne et d'une période de semis entre le 15 novembre et fin décembre.

GTA dur : d'origine mexicaine qui a été introduite en Algérie par l'ITGC depuis l'année 2000. Le grain est de forme allongée, la paille est moyenne avec une section peu épaisse et l'épi est de couleur blanche. Cette variété présente de bonnes caractéristiques technologiques (ITGC., 2001).

1.2. Protocoles expérimentaux

1.2.1 La désinfection

Les graines de chaque variété ont été stérilisées pendant 30 secondes avec l'éthanol 40%, puis décontaminées avec de l'hypochlorite de sodium (7%) pendant 10 min, ensuite rincées à l'eau distillée pendant 5 min (Léguillon et al., 2003).

1.2.2 La culture de blé

En fonction des objectifs expérimentaux, différents systèmes de cultures ont été utilisés. Après 24 heures d'imbibition dans l'eau distillée, les graines étudiées sont mises en germination dans les boîtes de pétri sur la Gaz stérile humecté à 10 ml d'eau d'irrigation durant 48 heures à l'obscurité, Ensuite les graines ont été exposées à la lumière (**Figure 4**).

La culture est mise dans des boîtes de pétri, ou on a provoqué un stress abiotiques en deux (02) stades différents :

a. Stade de germination

Le traitement se fait dès le premier jour de germination, pour une période de 9 jours dans le but d'observer l'effet de différentes doses sur le taux de germination (**Figure 5**).

b. Stade 2-3 feuilles :

Les graines de blé qui ont germées, sont transplantées dans une autre boîte de pétri contenant une solution nutritive (**Tableau 7**). L'essai est conduit dans une salle consacré à ce type d'étude La température est de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ le jour (16h) et de 20°C la nuit (8h), l'humidité est maintenue à 70% environ (**Figure 6**).

Le traitement se fait après que les plantules atteignent le stade 2-3 feuilles dans les boîtes de pétri (**Figure 5**), pour une période de 3, 6 et 9 jours à différentes doses. Pour ce stade, l'irrigation des plantules se fait comme suite :

- **1^{ère} semaine** : irrigation à l'eau distillée
- **Après 1^{ère} semaine** : irrigation avec solution nutritive
- **Le jour du traitement** : addition des différentes doses de traitement a la solution nutritive.

La récolte a été faite à des périodes différentes d'exposition au stress (3, 6, 9 jours). Les tests ont été effectués au même stade de développement des plantules.

Pour éliminer autant que possible les multiples sources de contaminations, nous avons pris les précautions suivantes :

- désinfecter le plan de germination avec l'eau de javel à 20% chaque jour.
- Stériliser les milieux d'irrigation dans le stérilisateur.

1.3 Le protocole d'application des stress

Les doses utilisées pour le traitement salin ainsi que celui du Zinc ont été choisies parmi une batterie de doses testées préalablement (**Figure 7**).

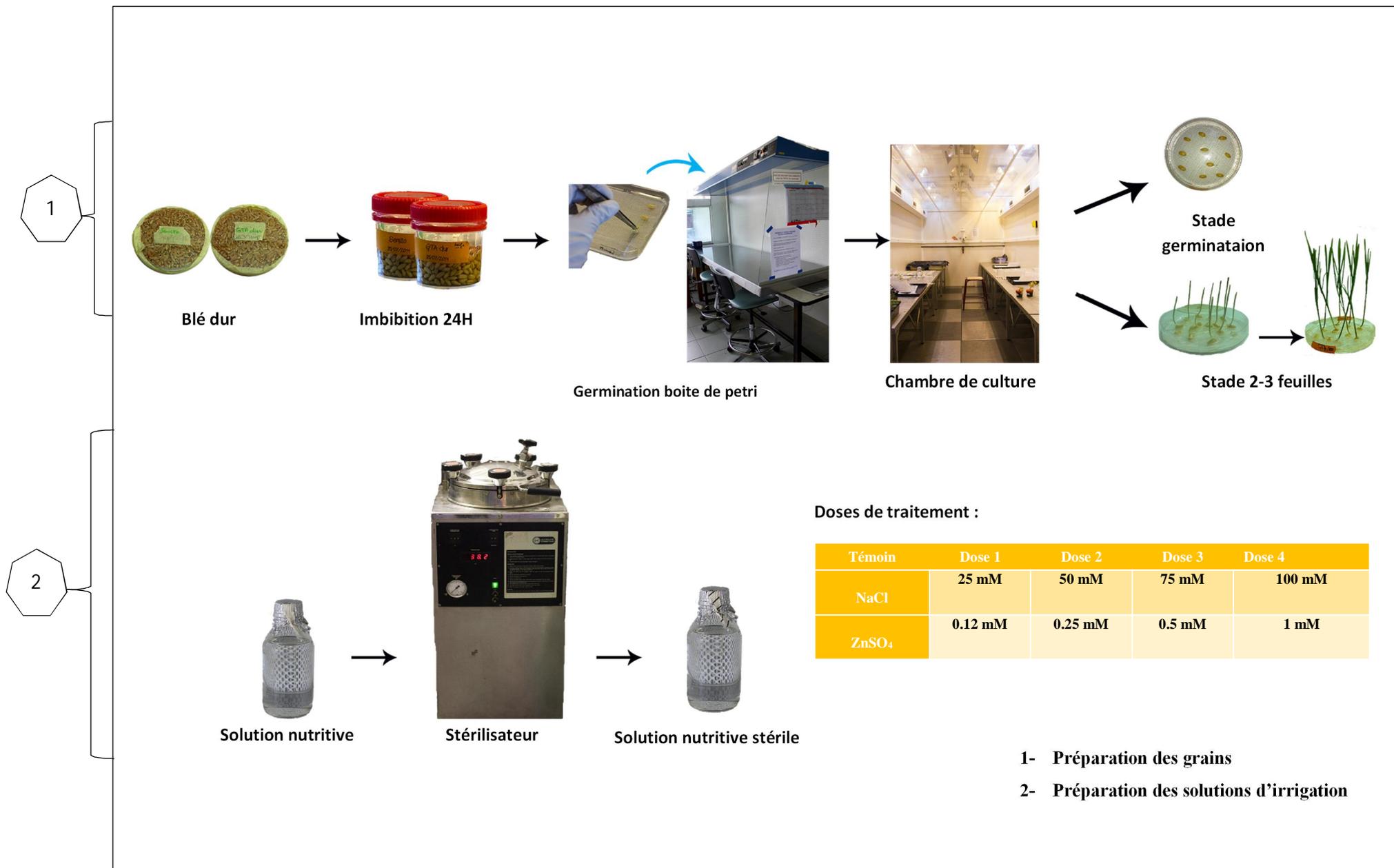
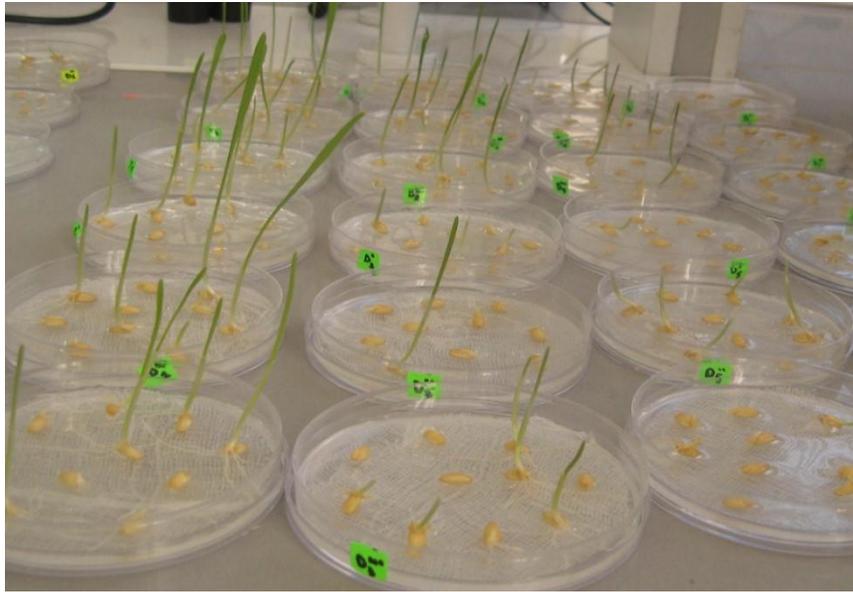


Figure 4. Protocole expérimentale de germination



Stade germination



Stade 2-3 feuilles

Figure 5. Stades de traitements des plantules de blé dur



Figure 6. Serre semi conditionnée

Tableau 7. Préparation solution nutritive

A- Solutions de base	
Macro-elements de Murashige et Skoog (1962) (Solution 1)	Concentration en g en 1,5 L d'eau distillée
NH ₄ NO ₃	20,62
KNO ₃	23,75
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	5,5
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	4,62
KH ₂ PO ₄	2,12
Micro-elements de Murashige et Skoog (1962) (Solution 2)	Concentration en mg en 1L d'eau distillé
H ₃ BO ₃	620
MnSO ₄ , 4H ₂ O	2230
ZnSO ₄ , 4H ₂ O	86
KI	83
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	25
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2,5
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2,5
Fe.EDTA d'après Lin et Staba (1961) (Solution 3)	Concentration en mg/100 ml d'eau distillée
Na ₂ EDTA	74
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	55,7
B- Milieu de culture	
Solution 1 macroéléments	200 ml/l
Solution 2 microéléments	10 ml/l
Solution 3 Fe-EDTA	5 ml/l

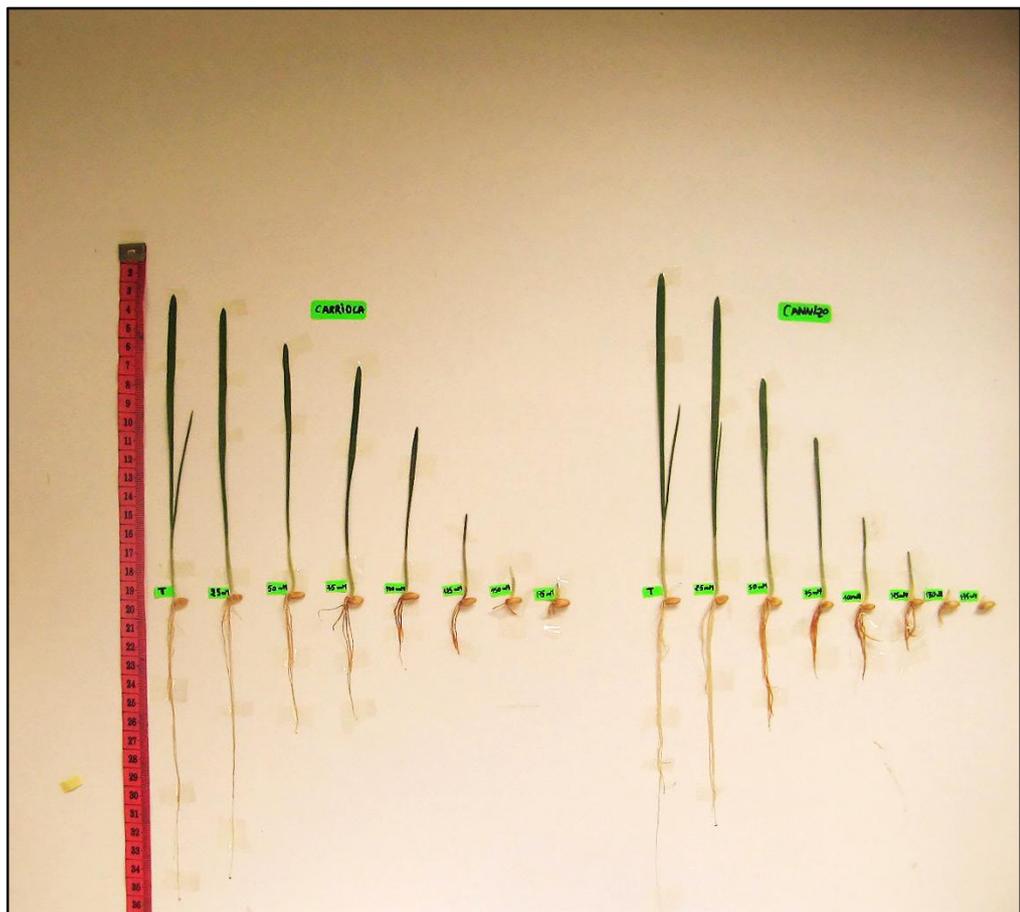


Figure 7. Tests pour les doses

- ❖ Le premier traitement consiste à appliquer les différentes concentrations de NaCl:

S-0 correspond à une concentration de 0 mM de NaCl (témoin)

S-25 correspond à une concentration de 25 mM NaCl

S-50 correspond à une concentration de 50 mM NaCl

S-75 correspond à une concentration de 75 mM NaCl

S-100 correspond à une concentration de 100 mM NaCl

- ❖ Le deuxième traitement consiste à appliquer les différentes concentrations de Zinc :

Zn- 0 correspond à une concentration de 0 mM de ZnSO₄ (témoin)

Zn- 0,12 correspond à une concentration de 0,12 mM de ZnSO₄

Zn- 0,25 correspond à une concentration de 0,25 mM de ZnSO₄

Zn- 0,5 correspond à une concentration de 0,5 mM de ZnSO₄

Zn- 1 correspond à une concentration de 1 mM de ZnSO₄

Nombre de graines utilisées pour chaque stress

5 doses x 3 temps x 2 variétés x 3 répétitions = 90 boîtes de pétri = 900 graines de blé

- ❖ Le troisième traitement consiste à appliquer la combinaison des traitements précédents avec leurs différentes concentrations (NaCl + Zn) (**Tableau 8**).

Nombre de graines utilisées pour chaque stress

17 doses x 3 temps x 2 variétés x 3 répétitions = 306 boîtes de pétri = 3060 graines de blé

- ❖ **Préparation des plantes pour les analyses ultérieures**

Après la période de culture, les plantules sont récoltées, puis elles sont déposées sur un papier filtre. Les plantes sont séparées en deux (02) parties : racines et feuilles.

Tableau 8. Interaction des deux stress salin/ Zinc

<i>Zinc</i> \ <i>NaCl</i>	<i>0 mM NaCl</i>	<i>25mM NaCl</i>	<i>50mM NaCl</i>	<i>75mM NaCl</i>	<i>100mM NaCl</i>
<i>0 mM ZnSO₄</i>	Temoin	25mM NaCl	50mM NaCl	75mM NaCl	100mM NaCl
<i>0,12mM ZnSO₄</i>	0,5mM ZnSO ₄	25+0,12	50+0,12	75+0,12	100+0,12
<i>0,25mM ZnSO₄</i>	1mM ZnSO ₄	25+0,25	50+0,25	75+0,25	100+0,25
<i>0,5 mM ZnSO₄</i>	2mM ZnSO ₄	25+0,5	50+0,5	75+0,5	100+0,5
<i>1 mM ZnSO₄</i>	4mM ZnSO ₄	25+1	50+1	75+1	100+1

2 Méthodes d'analyses

2.2 Paramètres morphologiques

2.2.1 Taux de germination

Ce paramètre constitue le meilleur moyen d'identification de la concentration saline qui présente la limite physiologique de germination des graines. Il est exprimé par le rapport nombre de graines germées sur nombre total de graines (Côme, 1970).

2.2.2 Mesure de la longueur des parties aérienne et souterraine (LPA, LPS)

À la fin du traitement on procède à la mesure de la longueur de la partie aérienne de la partie racinaire des plantules avec une règle graduée (Mammadov, 1999).

2.3 Paramètre physiologiques

2.3.1 La teneur relative en eau (TRE)

La teneur relative en eau (TRE %) a été déterminée à partir de la formule de (Clarck, 1982) :

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

Le pourcentage d'eau présent dans la feuille excisée à la base du limbe et immédiatement pesée (poids frais : **PF**), l'extrémité sectionnée est trempée dans de l'eau distillée et portée à l'obscurité pendant 24 heures afin d'obtenir un taux maximal de réhydratation. La feuille est retirée, passée dans un papier buvard pour absorber l'eau de la surface est pesée (poids de turgescence: **PT**), la feuille est en fin séchée à l'étuve à une température de 75°C pendant 48 heures puis pesée une dernière fois (poids sec: **PS**).

2.3.2 Dosage des cations

Les échantillons sont préalablement séchés au minimum trois (03) jours au four à 80°C. Peser entre 0,5 et 5 mg de matière sèche dans un tube eppendorf 1,5 mL à vis. Après ajouter 77 µL d'acide nitrique et 23 µL de peroxyde d'hydrogène. Centrifuger pendant 5min à 14000 rpm. Laisser le tube fermé sur bloc chauffant (thermomixer compact) à 90°C sous agitation à 1000rpm jusqu'à ce que l'extrait soit clair (1mg DW=3h). Laisser pendant 24h avant l'ouverture des tubes. Centrifuger 5 min à 14000 rpm puis ajouter 950 µL H₂O (=5% concentration finale en acide nitrique). Doser par le MP-AES 4100 (Agilent Technologies, 2011), mais attention pas de particules en suspension. Le plasma micro-ondes-atomique Spectromètre d'émission (MP-AES) est un instrument utilisé pour déterminer de faibles concentrations d'ions métalliques. La technique

utilise le fait que chaque élément nécessite une quantité unique d'énergie pour transférer à un état excité (Simonsen, 2005) et que les différentes longueurs d'onde de la lumière ont des énergies différentes.

2.4 Paramètres biochimiques

2.3.1 Dosage des protéines totales

La méthode retenue pour le dosage des protéines totales est celle de Bradford (1976) qui utilise la BSA (Sérum d'Albumine de Bovin) comme standard. Elle consiste à prendre 10 mg du matériel végétal, chaque échantillon est broyé avec 5 ml d'eau distillée puis filtré et versé dans un tube à essai contenant 5ml d'eau distillée. Pour le dosage on prend 0,2 ml de réactif Bradford avec 0,2 ml de la solution à analyser et 1,6 ml d'eau distillée (bien agiter au vortex). Parallèlement, il est préparé un essai de contrôle en utilisant 0,2 ml d'eau distillée ; après 5min à une heure on procède à la lecture de l'absorbance à 595nm.

2.3.2 Dosage de la chlorophylle

Les teneurs en chlorophylles a et b et caroténoïdes sont déterminées selon le protocole de Lichtenthaler (1987). L'extraction est réalisée à froid par 25 ml d'acétone pour environ 1 g de matière fraîche foliaire. Après 10 min de centrifugation à 5000 g, à 4°C, une mesure de l'absorbance A est effectuée à 470, 662 et 645 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (UV-1605). Les teneurs en pigments, exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, sont calculées à partir des équations suivantes :

$$C_a = 11,24 A_{662} - 2,04 A_{645}$$

$$C_b = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{662}$$

$$C_{a+b} = 7,05 A_{662} + 18,09 A_{645}$$

$$C_{x+c} = \frac{1000 A_{470} - 1,90 C_a - 63,14 C_b}{214}$$

(C_a et C_b : Concentration en chlorophylles a et b ; C_{x+c} : Concentration en caroténoïdes).

2.3.3 Dosage des sucres solubles

Les sucres solubles totaux (saccharose, glucose, fructose, leurs dérivés méthyles et les polysaccharides) sont dosés par la méthode de (Dubois et al, 1956). Elle consiste à prendre 100 mg de matériel végétal, dans des tubes à essai, on ajoute 3 ml d'éthanol à 80% pour faire l'extraction des sucres, puis on laisse à température ambiante pendant 48 heures. Au moment du dosage les tubes sont placés dans l'étuve à 80°C pour faire évaporer l'alcool. Dans des tubes en

verre propres, on met 2 ml de la solution à analyser, on ajoute 1 ml de phénol à 5% on ajoute rapidement 5 ml d'acide sulfurique concentré 96% ($d = 1,86$) en évitant de verser de l'acide contre les parois de tube. On obtient, une solution jaune orange à la surface, on passe au vortex pour homogénéiser la couleur de la solution. On laisse les tubes pendant 10 min et on les place au bain-marie pour 10 à 20 min à une température de 30°C. À ce moment-là l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 485 nm.

2.3.4 Dosage de la proline

La proline est dosée selon la technique utilisée par Troll (1955) simplifiée et mise au point par Dreier (1974) et modifiée par Monneveux (1986). Le principe est la quantification de la réaction proline-ninhydrine par mesure spectrophotométrique. La proline se couple avec la ninhydrine en formant un complexe coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proline dans l'échantillon.

Cette méthode consiste à prendre 100 mg du matériel végétal (1/3) médian de la feuille étandard. Puis à ajouter 2 ml de méthanol à 40% le tout est chauffé à 85°C dans un bain-marie pendant 60 min. Après refroidissement, on prélève 1 ml d'extrait auquel on ajoute :- 1 ml d'acide acétique (CH_3COOH) ;- 25 mg de ninhydrine ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$) et 1 ml de mélange contenant : 120 ml d'eau distillée ; 300 ml d'acide acétique et 80 ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4 , $d=1,7$). Le mélange est porté à ébullition durant 30 min, la solution vire au rouge, après refroidissement, 5 ml de Toluène sont rajoutés à la solution qui est agitée, deux phases se séparent (une phase supérieure et une phase inférieure).

Après avoir éliminé la phase inférieure, la phase supérieure est récupérée et déshydratée par l'ajout d'une spatule de Sulfate de sodium Na_2SO_4 anhydre. On détermine la densité optique à 528 nm.

2.4 Paramètres enzymatiques

- **Préparation de l'extrait enzymatique**

La méthode utilisée afin d'obtenir l'extrait enzymatique est celle de Logguini et *al*, (1999). L'extrait sera utilisé pour la mesure de l'activité ascorbate-peroxydase (APX), gaïcols-peroxydase (GPX) et l'activité catalase (CAT).

Après la période de traitement, (1g) de la matière fraîche des feuilles et des racines de blé dur sont broyées à froid à l'aide d'un mortier dans ml de tampon phosphate (50 mM, $\text{pH} = 7,5$). L'homogénat est ensuite filtré à l'aide d'une toile adéquate avant de procéder à une centrifugation à froid de 12000 g pendant 20 min (centrifugeuse Sigma 3-16K). Le surnageant obtenu sera utilisé comme extrait pour la détermination des différentes activités enzymatiques.

- **La quantification des mesures spectrophotométrique**

La formule suivante est utilisée dans la quantification des différentes mesures spectrophotométriques suite aux dosages enzymatiques de la GPX, APX et CAT (Servais, 2004).

$$Act = \frac{\Delta A. Vt}{\epsilon. \Delta t. L. Ve. p}$$

Act: activité enzymatique en nmol/min/mg de protéines

ϵ : Coefficient d'extinction linéique molaire en M

ΔA : Différence moyenne de l'absorbance

V_t : volume total du mélange réactionnel en ml

V_e : volume de l'extrait enzymatique en ml

L : largeur de la cuve de mesure en cm

T : temps de lecture en min

2.4.1 Dosage de l'activité Catalase (CAT)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase est réalisé suivant la méthode de Cakmak et Horst, 1991. La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes (spectrophotomètre Jenway 6300) pour une longueur d'onde de 240 nm et un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon=39400 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}.$ L .Pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μ l de l'extrait enzymatique brut, 50 μ l de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 0,3% et 2850 μ l de tampon phosphate [50 mM, pH= 7,2]. L'étalonnage de l'appareil se fait en absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

2.4.2 Dosage de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate-peroxydase est réalisé suivant le protocole adopté par Nakano (1987). Le volume réactionnel final est de 3ml contient : 100 μ l d'extrait enzymatique, 50 μ l d' H_2O_2 à 0.3% et 2850 μ l de tampon phosphate NaK-Ascorbate [50mM NaK, 0,5 mM ascorbate, pH=7,2]. L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture est effectuée à 290 nm (spectrophotomètre Jenway 6300) pendant 1min chaque 15sec et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon=2800\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}.$ L'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

2.4.3 Dosage de l'activité Gaïacol-peroxydase (GPX)

L'activité gaïacol-peroxydase (GPX) est déterminée spectrophotométriquement (spectrophotomètre Jenway 6300) à 470 nm suivant la technique de Fielding et *al.* (1978), le coefficient d'extinction linéique molaire utilisé est $\epsilon=2470\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour un volume final de 3ml, le mélange réactionnel contient : 100 μl d'extrait enzymatique, 50 μl d' H_2O_2 à 0,3% et 2850 μl de tampon phosphate NaK-gaïacol [50mM NaK, 8mM gaïacol, pH=7,2]. L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'ajout du peroxyde d'oxygène. L'activité GPX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

2.5 Mesure du potentiel de membrane des cellules corticales de la racine de blé dur (Electrophysiologie)

2.5.2 Préparation des solutions

Les potentiels de la membrane sont mesurés dans des solutions toutes une base de NaCl 50 mM, ou de NaCl 50mM + ZnSO_4 0,1 mM, dans du MES 2 mM, pH 5,7. Le cation K^+ est introduit dans cette base à des concentrations variables (0,1 et 1mM) sous forme de K_2SO_4 à partir de solutions mère 0,5 M.

2.5.3 Préparation des microélectrodes

a. Microélectrode utilisée pour la mesure du potentiel de membrane

La microélectrode intracellulaire est obtenue par étirage d'un capillaire en borosilicate de 2mm de diamètre (GC200F-10, Harvard Apparatus, UK) sur une étireuse verticale (Narishige, Japon) selon les paramètres suivants : courant 20 A, force électromagnétique 6.

Après étirage, l'électrode est remplie par du KCl 3 M et installée par un porte électrode avec un fil d'argent, le tout étant connecté à la sonde (HS-2, gain X0.01, Axon instruments, USA) d'un amplificateur (Axoprobe 1A, Axon instruments, USA).

b. Electrode de référence

L'électrode de référence correspond au canal de référence (Ag/AgCl) d'une électrode combiné de pH, remplie de KCl 3 M. Le pH mètre (MetrOhm 632-Suisse) est connecté à la sonde (HS-2, gain X0.01 Axon instruments, USA) portant la microélectrode intracellulaire.

2.5.4 Dispositif expérimental

La racine excisée est placée sur un portoir en plexiglas à l'horizontale, attaché par une résine fine. Le portoir est placé dans une cuve en plexiglas parcourue par un flux permanent de solution de mesure. La vitesse d'écoulement est constante et égale à $3,2 \text{ ml}.\text{min}^{-1}$ (elle n'est nullement

modifiée au cours de l'expérience). Le volume de cuve est constant aussi, et égal à 3 mL. La cuve est positionnée sur un micro élévateur (IT6D CA1, micro-contrôle, France) semi-automatique géré par un moteur pas à pas permettant d'élever la cuve par pas de $0,1\mu\text{m}$ (**Figure 8 A**)

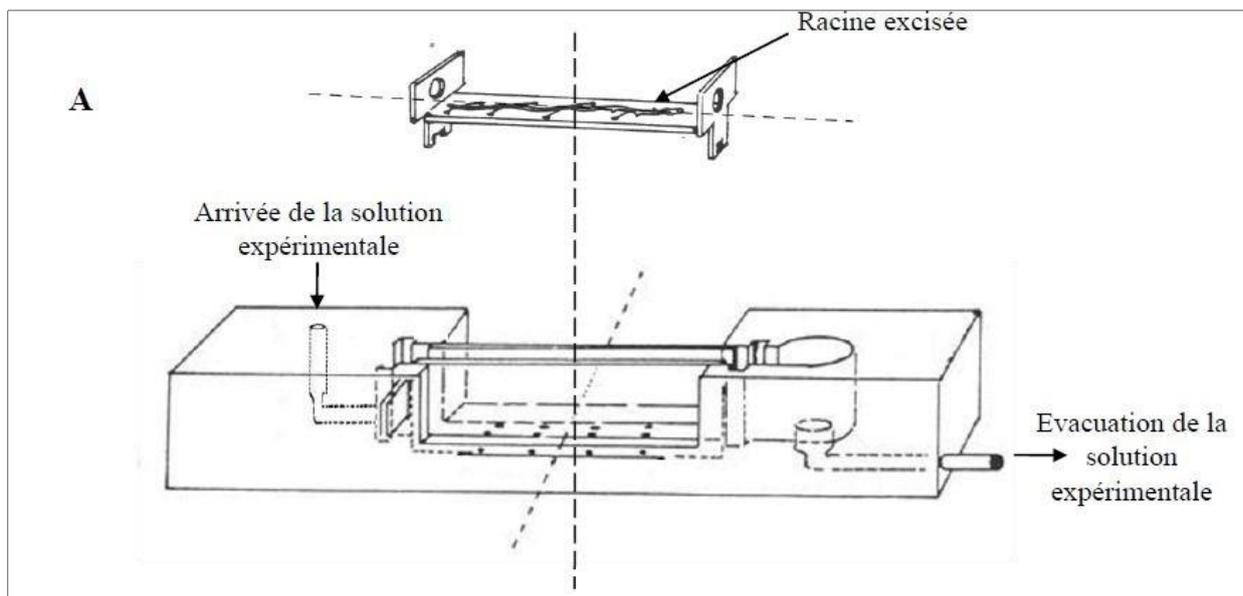
La microélectrode intracellulaire est placée à la perpendiculaire par rapport à l'axe de la racine sur sonde (HS-2, gain X0.01, Axon instruments, USA) elle-même fixée sur un micromanipulateur manuel (Narishige, japon). La position de pointe de microélectrode par rapport à l'épiderme de la racine est suivie en temps réel grâce à un microscope couplé à une caméra CCD permettant de visualiser l'électrode et la racine sur un écran vidéo. La cuve est éclairer l'ensemble du dispositif. Tout le système expérimental (cuve, micoélévateur, microscope, micromanipulateurs) est placé à l'intérieures de rayonnements électromagnétiques et de vibrations.

2.5.5 Mesure du potentiel de membrane

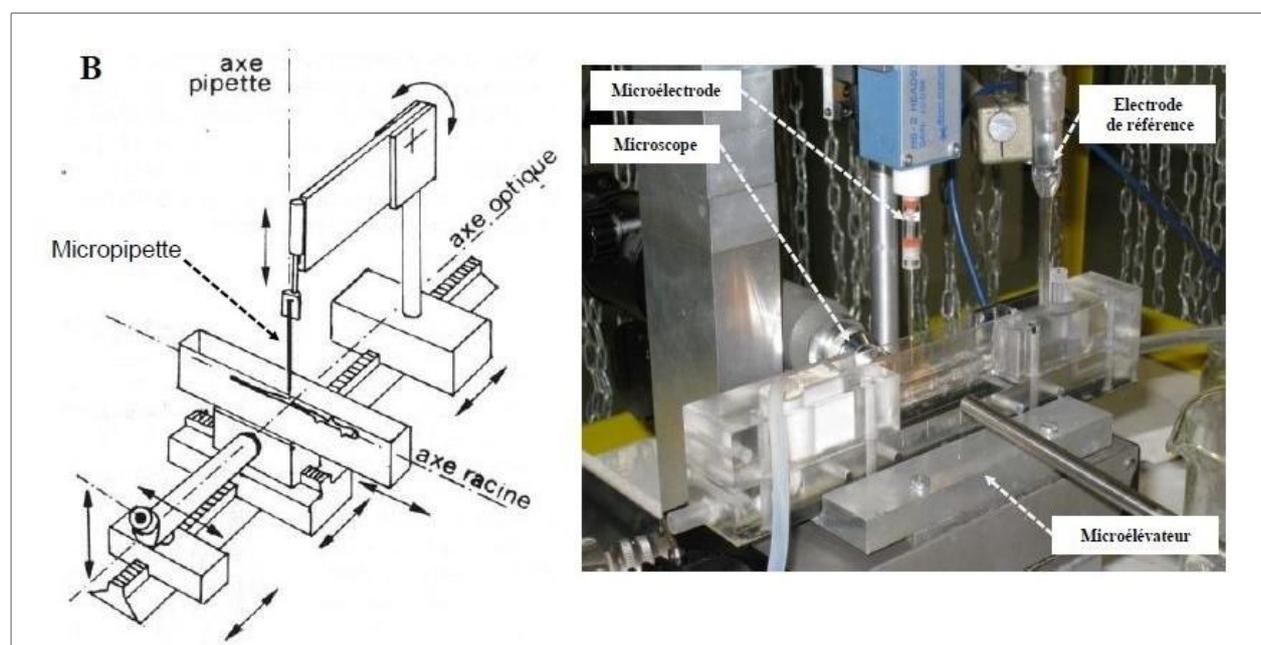
L'électrode intracellulaire est enfoncée dans une des cinq couches de cellules formant le cortex cellulaire (profondeur théorique estimée d'après les coupes histologiques de la racine de blé comprise entre 15 à $120\mu\text{m}$ en plaçant verticalement le système cuve-portoir-racine à l'aide du microélévateur. La racine baigne entretemps dans la solution de base (NaCl 50 mM, MES 2 mM, pH=5,7). une fois que l'électrode est correctement positionnée et qu'un signal stable peut être observé, les solutions de mesure contenant K^+ sont percolées dans la cuve, grâce à un système de perfusion gravitationnel contrôlé par un système de robinets d'arrêt, en introduisant un épisode de lavage avec la solution de base entre les passages de deux solutions contenant le K^+ . L'acquisition des données se fait grâce au programme FETCHEX (version 6.02, Axon Instruments) en mode acquisition continue (Gap-free) exécuté sur un microordinateur interfacé (Interface Digidata 1200A, Axon Instruments, USA) à l'électrode (Axoprobe, Axon Instruments).(**Figure 8 B**).

2.6 Analyse statistique

Les résultats sont soumis à une analyse statistique descriptive et une analyse de la variance à un ou deux facteurs fixes de classification, les histogrammes présentés, rejoignent des valeurs moyennes encadrées par leurs écart- type, les moyennes sont comparées selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1999), en utilisant le logiciel PRISM. On considère que les résultats sont significatifs quand $P \leq 0,05$.



A. Schéma montrant la cuve de percolation et le support (en plexiglas) permettant d'y installer la racine



B. à gauche : schéma montrant le banc de micromanipulation pour la mesure du potentiel de membrane des cellules racinaires.

B. à droite : photo du dispositif expérimental montrant la cuve expérimentale installée sur le microélevateur avec la racine disposée horizontalement sur le portoir. **En haut,** la sonde portant le porte électrode positionné à la verticale de racine.

Figure 8. Dispositif expérimental de mesure du potentiel de membrane de cellules des couches périphériques de la racine.