

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة عبد الحميد بن باديس مستغانم . كلية علوم الطبيعة و الحياة

Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie قسم البيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Magister en biologie

Option : Sciences du Sol et Environnement.

Présenté par : Mr. ZITOUNI Mohammed Arezki

Thème

**Etude du contenu polyphénolique de la fève (*Vicia faba* L.) et évaluation de son activité antioxydante en conditions de stress salin**

Laboratoire de biodiversité et conservation des eaux et des sols, université de Mostaganem.  
Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale, université de Mostaganem.

**La composition du jury de soutenance:**

Nom et prénom	Grade	Qualité	Appartenance administrative
Mr DJIBAOUI Rachid	M.C.A	Président	Université de Mostaganem.
Mr. BELKHOUIJA Moulay	Prof.	Examineur	Université d'Oran.
Mr. CHIBANI Abdelouahab	M.C.A.	Examineur	Université de Mostaganem.
Mr. MEKHALDI Abdelkader	Prof.	encadreur	Université de Mostaganem.
Mr. REGUIEG YSSAAD Houcine abdelhakim.	Prof.	Co-encadreur	Université de Mostaganem.

*Année universitaire : 2014-2015*

# *Dedicaces*

*Je dédie ce travail*

*A la mémoire de ma Mère, de mon Père et de ma sœur Fatma*

*A mes Sœurs Fatima et Baya pour leur patience et soutien*

*A tous mes amis et proches*

*A tous ceux qui m'ont aidé dans ce travail*

*Et à tous ceux qui œuvrent pour la science et le progrès dans  
notre très cher pays Algérie*

*thanks شڪرا Merci ٲ٠١٤٤٠ٲ*

## *Remerciements*

Mes remerciements vont d'abord à Mr le Professeur MEKHALDI Abdelkader, mon promoteur, Professeur à la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem pour avoir proposé le présent sujet de recherche et dirigé ce travail, qu'il trouve ici, l'expression de ma profonde reconnaissance, mon immense gratitude et mon grand respect, pour tous ses efforts, son savoir, ses idées, sa confiance et ses encouragements.

Mes sincères remerciements vont également à Mr REGUIEG Yssaad Houcine Abdelhakim, mon co-encadreur, Professeur à la Faculté des sciences de la Nature et de la Vie, Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem d'avoir précieusement participé à affiner la problématique de recherche et contribué par ses conseils à l'aboutissement de ce travail. Qu'il trouve ici ma reconnaissance et mon respect les plus sincères.

Mes remerciements s'adressent aussi vivement à tous les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail. Je cite Mr DJIBAOUI Rachid maître de conférences à la faculté des sciences à l'université de Mostaganem qui m'a fait l'honneur de présider le jury, je lui exprime ma profonde gratitude. Mr BELKHODJA Moulay Professeur à la faculté de biologie de l'université Essenia D'Oran et Mr CHIBANI Abdelwaheb maître de conférences à la faculté des sciences à l'université de Mostaganem, pour leur participation comme membres de jury et contribué ainsi par leur critiques au raffinement de mon écrit. C'est avec sincérité que je leur exprime ma gratitude et mon profond respect.

Je n'oublie pas aussi d'exprimer mes remerciements à tous mes amis et à toute personne ayant participé de près ou de loin pour le bon achèvement de ce travail. Je cite le personnel du laboratoire de microbiologie et de biologie végétale notamment Mme HAMED Djahira, celui du laboratoire de biodiversité et conservation des eaux et des sols et celui du laboratoire de protection des végétaux surtout Nabil pour son assistance.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous le personnel du Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants (CNCC), surtout mes collègues de travail de l'antenne Ouest sise à Sidi Bel Abbes, sans eux je n'aurai pu mener à bien et agréablement ce projet.

## Résumé

La salinité est l'un des stress abiotiques majeurs qui affecte la production végétale. Le stress oxydant qui lui est souvent associé est causé par la formation excessive d'espèces oxygénées réactives. L'un des mécanismes de défense non enzymatiques contre ce stress que les plantes adoptent est la production de composés phénoliques considérés comme antioxydants.

La présente investigation est réalisée dans l'objectif d'étudier la variabilité des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes chez la fève (*Vicia faba* L.) en réponse à un stress salin induit par l'irrigation avec des solutions à salinités croissantes à base d'une combinaison de sels NaCl et CaCl<sub>2</sub> (25, 50, 75 et 100 mM . L<sup>-1</sup>) dans un essai de culture en pots et dans des conditions semi-contrôlées.

Pour la teneur totale en polyphénols des extraits méthanoliques des parties aériennes (tiges + feuilles), les résultats ont montré que, en stade 1 ils varient d'une manière non significative à l'élévation du taux de sels. Ils montrent une augmentation maximale de 18% en T<sub>1</sub>. En stade 2, nous avons enregistré des augmentations aux échantillons T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> avec une différence significative en T<sub>4</sub> (+ 29%) par rapport au témoin T.

Les contenus en flavonoïdes diminuent par l'élévation du taux de sels et présentent des variations significatives en T<sub>2</sub> (-56%) pour le stade1, et des taux de baisse de -38% et -27% en T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> respectivement pour le stade 2.

Le test antioxydant au DPPH a révélé que l'IC<sub>50</sub> des extraits diminue avec l'augmentation de la concentration en sels. En stade1, des diminutions significatives sont enregistrées en T<sub>2</sub> (-68%), T<sub>3</sub> (-56%) et T<sub>4</sub> (-52%). En stade 2, les baisses sont significatives en T<sub>3</sub> (-37%) et T<sub>4</sub> (-36%). Donc globalement le potentiel antioxydant augmente avec l'élévation du stress salin.

**Mots clés:** Stress salin ; Polyphénols totaux ; Flavonoïdes ; Potentiel antioxydant ; *Vicia faba*.

## Abstract

Salinity is a major abiotic stress affecting crops and plants production. Oxidative stress associated with it is often caused by excessive generation of reactive oxygen species. One of the mechanisms of non-enzymatic defense against stress that plants adopt is the production of phenolic compounds considered as antioxidants.

This investigation is carried out with the aim to study the variability of the levels of total polyphenols and flavonoids in bean (*Vicia faba* L.) in response to salt stress induced by irrigation with solutions of increasing salinity based on combination of NaCl and CaCl<sub>2</sub> salt (25, 50, 75 and 100 mM . L<sup>-1</sup>) in plastic pots under semi-controlled conditions.

The results showed that, in stage1 the total polyphenol content of the aerial parts methanolic extracts (stems and leaves) vary non-significantly with the rate of salts with a maximum increase of 18% in T<sub>1</sub>. In stage 2, we recorded an increase in T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> with a significant difference in T<sub>4</sub> (+ 29%) compared to the control T.

The content of flavonoids reduced by the elevated levels of salts and exhibit significant variations in T<sub>2</sub> (-56%) for the stage1, and rate of decline of -38% and -27% in T<sub>2</sub> and T<sub>3</sub> respectively for the stage 2.

The antioxidant DPPH test revealed that the IC<sub>50</sub> extracts decreases with increasing salt concentration. In stage 1, significant decreases were recorded in T<sub>2</sub> (-68%), T<sub>3</sub> (56%) and T<sub>4</sub> (-52%). In stage 2, the decreases are significant in T<sub>3</sub> (-37%) and T<sub>4</sub> (-36%). So overall, antioxidant potential increases with increasing salt stress.

**Keywords:** Salt stress; Total polyphenols; Flavonoids; Antioxidant potential; *Vicia faba*

## ملخص:

تعتبر الملوحة إحدى أنواع الإجهاد اللاحيوي الرئيسي الذي يؤثر على إنتاج المحاصيل، و غالبا ما يتسبب الإجهاد التأكسدي - المرتبط بالملوحة - في الإنتاج المفرط لأنواع الأوكسجين النشطة (ROS). كما يمثل إنتاج المركبات الفينولية - التي هي بمثابة مضادات للأكسدة - أحد آليات الدفاع الغير إنزيمية ضد الإجهاد التي يعتمد عليها النبات.

تهدف هذه الدراسة إلى تقييم الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي باستخدام طريقة إزالة الجذر الحر (DPPH) لنبات الفول (*Vicia faba* L.) المعرض لظروف الإجهاد الملحي المتكون من مزيج (CaCl<sub>2</sub> + NaCl) بتركيزات متدرجة (25 ، 50 ، 75 ، 100 ميلي مول / لتر)، و قد تم ذلك في تجربة استخدمت فيها أصص بلاستيكية تحت ظروف شبه متحكم فيها . في بادئ الأمر تم تقدير محتوى المستخلص النباتي من المركبات متعددة الفينول التي تم تحديدها بطريقة كاشف Folin-Ciocalteu و الفلافونويدات و التي 'قُدرت باستخدام طريقة AlCl<sub>3</sub>. و قد بينت النتائج أن المستخلص الميثانولي غني بهذه المركبات، إلا أن نتائج محتوى المركبات متعددة الفينول في المستخلص الميثانولي للأجزاء الهوائية أظهر تباينا واضحا مع الإرتفاع المتدرج في تركيز الأملاح و ذلك بالنسبة للمرحلة الأولى من عمر النبات (مرحلة النمو الخضري) حيث 'قُدرت نسبة الزيادة بـ 18٪ كحد أقصى و ذلك بالنسبة للعينة T<sub>1</sub> ، أما في المرحلة الثانية فقد تم تسجيل زيادات في كل من العينات T<sub>2</sub> ، T<sub>3</sub> ، T<sub>4</sub> مع اختلاف محسوس في T<sub>4</sub> (+29٪) و ذلك مقارنة بالشاهد T. كما أظهرت النتائج انخفاضاً في محتوى الفلافونويدات بارتفاع تركيز الأملاح مع تسجيل تغيرات محسوسة بالنسبة للعينة T<sub>2</sub> (-56٪) و ذلك بالنسبة للمرحلة الأولى من النمو ، كما 'سجلت نسبة انخفاض بالنسبة للمرحلة الثانية من النمو لكل من العينتين : T<sub>2</sub> و T<sub>3</sub> (-38٪ ، -27٪) على التوالي.

كشف اختبار مضادات الأكسدة DPPH أن IC<sub>50</sub> للمستخلصات الميثانولية يتناقص مع زيادة تركيز الأملاح، و قد 'سجل في الفترة الأولى من النمو انخفاض محسوس في كل من العينات: T<sub>2</sub> ، T<sub>3</sub> ، T<sub>4</sub> (-68٪ ، -56٪ ، -52٪) على التوالي. و نفس الشيء بالنسبة للفترة الثانية حيث تم تسجيل انخفاض محسوس في كل من العينتين T<sub>3</sub> و T<sub>4</sub> (-37٪ ، -36٪) على التوالي. و عليه، فإنه يمكن أن نستخلص أن التأثير ضد التأكسد يزداد مع زيادة الإجهاد الملحي.

**الكلمات المفتاحية:** الإجهاد الملحي ، المركبات المتعددة الفينول ، الفلافونويدات ، النشاط المضاد للأكسدة ،

*Vicia Faba*

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Les différentes parties de la fève .....	5
Figure 2: Rendement relatif de la fève selon la salinité du sol .....	8
Figure 3 : Divisions pour le classement des tolérances des cultures à la salinité .....	8
Figure 4 : Processus de dégradation des sols suite à l'irrigation .....	12
Figure 5 : Les trois aspects de la tolérance au sel chez les plantes.....	16
Figure 6 : Mécanismes proposés pour le transport du Na <sup>+</sup> et Cl <sup>-</sup> .....	17
Figure 7 : Biosynthèse de la proline .....	19
Figure 8 : Nomenclature de quelques osmolytes chez les végétaux.....	20
Figure 9 : L'équilibre entre les ROS et antioxydants(AOX) .....	22
Figure 10 : Stress abiotiques et formation des ROS .....	23
Figure 11 : ROS, messagers dans des réponses hormonales aux stress chez les plantes .....	24
Figure 12 : Les effets délétères des ROS sur les cellules. ....	25
Figure 13 : Les mécanismes antioxydants chez les plantes.....	26
Figure 14 : stabilisation des radicaux lipidiques par les tocophérols et caroténoïdes .....	29
Figure 15 : La voie de shikimate .....	32
Figure 16: La voie de phénylpropanoïde .....	33
Figure 17: Biosynthèse des flavonoïdes .....	34
Figure 18 : les principaux acides phénoliques.....	35
Figure 19: Structure de base des flavonoïdes .....	36
Figure 20 : Structures des sub-classes des flavonoïdes .....	37
Figure 21 : Les trois principaux points d'intervention des antioxydants phénoliques dans la protection des lipides contre la dégradation oxydative.....	39
Figure 22 : Schéma du dispositif expérimental .....	42
Figure 23 : Etapes d'extraction.....	45
Figure 24 : Structure du DPPH avec sa forme libre et réduite. ....	50
Figure 25 : Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux réalisée à l'aide de l'acide gallique.....	54
Figure 26 : Variation des CPT des extraits méthanoliques du stade 1 .....	55
Figure 27 : Variation des CPT des extraits méthanoliques du stade 2 .....	56
Figure 28 : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes réalisée à l'aide de la quercitine .....	56
Figure 30 : Variation du contenu en flavonoïdes (CF) au stade 1. ....	58
Figure 31 : Variation du contenu en flavonoïdes (CF) au stade 2. ....	59
Figure 33 : Variation des IC <sub>50</sub> des extraits en fonction de la salinité au stade 1 .....	60
Figure 34 : Variation des IC <sub>50</sub> des extraits en fonction de la salinité au stade 2.....	61

## LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : a- plantes âgées de 30 jours, b- plantes âgées 55 jours .....	43
Photo 2: Rota vapeur utilisé pour le séchage des filtrats après l'extraction. ....	46
Photo 3 : Spectrophotomètre UV-vis PRIM SECOMAM .....	47
Photo 4 : polyphenols stade 1 .....	47
Photo 5 : polyphenols stade 2 .....	47
Photo 6 : flavonoïdes stade 1 .....	49
Photo 7 : flavonoïdes stade 2 .....	49
Photo 8 : Exemple de dilutions d'une solution méthanolique d'un extrait. ....	51
Photo 9 : Exemple d'une plaque de tubes d'un échantillon, les dilutions et les réactions avec DPPH en triplicata.....	51

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Classement des pays par production en fève graine 2012 .....	6
Tableau 2 : Limites permmissibles pour les classes des eaux d'irrigation .....	12
Tableau 3 : Classification des sols basée sur l'analyse des extraits de pate saturée ...	13
Tableau 4 : Les traitements salins appliqués .....	41
Tableau 5 : variation des CPT des extraits méthanoliques pour le stade 1 .....	54
Tableau 6 : Variation des CPT des extraits méthanoliques pour le stade 2 .....	55
Tableau 7 : Variation des CF des extraits méthanoliques pour le stade 1 .....	57
Tableau 8 : Variation des CF des extraits méthanoliques pour le stade 2 .....	58
Tableau 9 : Variation des IC <sub>50</sub> des extraits méthanoliques pour le stade 1 : .....	60
Tableau 10 : Variation des IC <sub>50</sub> des extraits méthanoliques pour le stade 2 : .....	61

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABA	:	Abscisic acid
Abs	:	Absorbance
ABTS	:	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ADN	:	Acide Désoxyribonucleique.
AOX	:	Antioxydant
APX	:	Ascorbate Peroxydase
AsA	:	Ascorbic acid
ATP	:	Adénosine Tri Phosphate
CaCl <sub>2</sub>	:	Calcium Chloride
CAM	:	Crassulacean Acid Metabolism
CAT	:	Catalase
CEC	:	Capacité d'Echange Cationique
CF	:	Contenu en Flavonoïdes
CO <sub>2</sub>	:	Dioxyde de carbone
CPT	:	Contenu en Polyphénols Totaux
CuZn SOD	:	Superoxide Dismutase à cuivre et zinc
DHAR	:	Déhydro Ascorbate Reductase
DPPH	:	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl
EAG	:	Equivalent Acide Gallique
EQ	:	Équivalent Quercitine
ES	:	Erreur Standard
FAO	:	Food and Agriculture Organization
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Peroxyde d'hydrogène
IC <sub>50</sub>	:	Concentration d'Inhibition de 50 % du DPPH
ICARDA	:	International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
INSID	:	Institut National des Sols, de l'Irrigation et du Drainage
M	:	mole
MAPK	:	Mitogen-activated protein kinase
MDA	:	Malondialdehyde
MDHA	:	Mono Déhydro Ascorbate
MDHAR	:	Mono Déhydro Ascorbate Réductase
MeOH	:	Méthanol

MnSOD	:	Manganese Superoxide Dismutase
NaCl	:	Sodium Chloride
NAD (P)	:	Nicotinamide Adenine Dinucléotide phosphate
NADH (P)	:	Nicotinamide Adenine Dinucléotide réduite phosphate
NADP	:	Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate
$O_2^{2-}$	:	Ion peroxyde
$O_2$	:	Dioxygène
$OH^-$	:	Anion hydroxyle
$OH^\bullet$	:	Radical hydroxyle
POX	:	Peroxydase
PSII	:	Photo Système II
ROS	:	Reactive Oxygen Species
SAR	:	Sodium Adsorption Ratio
SOD	:	Super Oxide Dismutase
SOS	:	Salt Overly Sensitive
TRAP	:	Total Radical-trapping Antioxidant Parameter
UV	:	Ultraviolets
XOD	:	Xanthine Oxydase

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA FEVE ET FABACEES</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Description de la famille des fabacées</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Description de l'espèce étudiée la fève: <i>Vicia faba</i> L.</b>	<b>3</b>
1.2.1 Classification	3
1.2.2 Aspect et particularités botaniques	4
<b>1.3 Production et importance de la fève</b>	<b>5</b>
1.3.1 Valeur alimentaire	5
1.3.2 Aperçu sur la production de la fève	5
1.3.3 Intérêt agronomique	6
<b>1.4 Exigences agro écologiques de la fève</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE 2 : SALINITE DES SOLS ET STRESS SALIN CHEZ LES PLANTES</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Notions générales sur la salinité des sols</b>	<b>10</b>
2.1.1 La salinisation des sols	11
2.1.2 Types de sols salés.	13
<b>2.2 Effets du stress salin sur les plantes.</b>	<b>13</b>
2.2.1 Stress osmotique : perturbation de la nutrition minérale et hydrique	13
2.2.2 Effets sur la nutrition carbonée (photosynthèse)	14
<b>2.3 Mécanismes de résistance et d'adaptation</b>	<b>15</b>
2.3.1 Mécanismes anatomiques d'adaptation	15
2.3.2 Mécanismes physiologiques d'adaptation à la salinité.	16
<b>CHAPITRE 3 : LE STRESS OXYDATIF</b>	<b>22</b>
<b>Introduction</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Formation des ROS chez les végétaux</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Rôles et effets des ROS dans le stress des plantes</b>	<b>24</b>
3.2.1 Rôle bénéfique des ROS comme messagers de stress	24
3.2.2 Les ROS et leurs dommages oxydatifs sur les biomolécules	24

<b>3.3</b>	<b>Les mécanismes de défense anti-oxydatifs</b>	<b>25</b>
3.3.1	Les systèmes enzymatiques	26
3.3.2	Les systèmes non enzymatiques	28
<b>CHAPITRE 4 : LES COMPOSES PHENOLIQUES :</b>		<b>31</b>
<b>Introduction</b>		<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>Notions Générales</b>	<b>31</b>
<b>4.2</b>	<b>Biosynthèse des composés phénoliques</b>	<b>31</b>
4.2.1	La voie de Shikimate	31
4.2.2	La voie des phénylpropanoïdes	32
4.2.3	La voie de biosynthèse des flavonoïdes	33
<b>4.3</b>	<b>Principales classes des polyphénols</b>	<b>34</b>
4.3.1	Les acides phénoliques simples	34
4.3.2	Les tannins	36
4.3.3	Les flavonoïdes	36
<b>4.4</b>	<b>Rôles et fonctions des polyphénols</b>	<b>38</b>
4.4.1	Quelques propriétés des flavonoïdes	39
<b>CHAPITRE 5 : MATERIEL ET METHODES</b>		<b>41</b>
<b>5.1</b>	<b>Conditions de l'expérimentation et réalisation</b>	<b>41</b>
5.1.1	Lieu de l'expérimentation	41
5.1.2	Choix du matériel végétal	41
5.1.3	Protocole expérimental	41
5.1.4	Dispositif expérimental utilisé	42
5.1.5	Mise en place et conduite de l'essai	42
5.1.6	Application du stress salin	43
<b>5.2</b>	<b>Méthodes d'extraction et de dosages</b>	<b>43</b>
5.2.1	Extraction des composés polyphénoliques et flavonoïdes	43
5.2.2	Quantification des polyphénols totaux	46
5.2.3	Dosage des flavonoïdes	48
5.2.4	Potentiel antioxydant des extraits (test DPPH)	49
5.2.5	Analyse statistique des résultats.	51

## **CHAPITRE 6: RESULTATS ET DISCUSSION \_\_\_\_\_ 53**

**Introduction \_\_\_\_\_** Erreur ! Signet non défini.

### **6.1 Résultats obtenus \_\_\_\_\_ 53**

6.1.1 Variation des contenus en polyphénols totaux (CPT) : \_\_\_\_\_ 53

6.1.2 Variation des contenus en flavonoïdes (CF) : \_\_\_\_\_ 56

6.1.3 Variation du pouvoir antioxydant des extraits (test DPPH) : \_\_\_\_\_ 59

6.1.4 Corrélation entre les paramètres mesurés (CPT, CF et IC<sub>50</sub>) \_\_\_\_\_ 62

### **6.2 Discussion \_\_\_\_\_ 62**

6.2.1 Contenus en polyphénols totaux (CPT) \_\_\_\_\_ 62

6.2.2 Contenus en flavonoïdes (CF) \_\_\_\_\_ 64

6.2.3 Potentiel antioxydant (test DPPH) \_\_\_\_\_ 64

## **Conclusion générale et perspectives \_\_\_\_\_ 66**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES \_\_\_\_\_ 69**

# INTRODUCTION GENERALE

## INTRODUCTION GENERALE

La salinité est devenue un problème pertinent, surtout en régions semi arides où l'irrigation est souvent pratiquée en vue de rendements meilleurs. Dans ces zones, les précipitations limitées, une évapotranspiration importante, une température élevée et la gestion inadéquate de l'eau contribuent chacune de sa part à l'augmentation de la salinité du sol. La salinité est considérée comme le plus menaçant des facteurs pour l'environnement naturel et elle est responsable de limitations croissantes des productions végétales, spécialement des cultures sensibles comme les légumes (Munns & Tester 2008).

En Algérie, une grande part des eaux destinées à l'irrigation sont chargées en sels, ce qui engendre une réduction de la croissance des plantes et des rendements des variétés sensibles (Halitim, 1973). La recherche de plantes adaptées à des seuils élevés de salinité devient un impératif pour la production agricole. Le stress salin des plantes est principalement dû à un déséquilibre nutritionnel engendrant la diminution de l'activité photosynthétique au profit de la photorespiration qui est source d'espèces réactives oxygénées (reactive oxygen species: ROS). Leur accumulation dans les tissus végétaux provoque le stress oxydatif (Asada, 1999 ; Ivanov and Khorobrykh, 2003).

Pour faire face à ce fléau, Les végétaux utilisent des mécanismes enzymatiques et non enzymatique très variés et complexes. L'investigation de ces mécanismes responsables de la tolérance au stress est indispensable (Munns, & Tester, 2008). La variation de la synthèse des polyphénols dans les plantes comme antioxydants en réponse aux stress abiotiques et particulièrement au stress salin varie selon l'espèce de plante, la variété, la sévérité du stress et les types de sels.

Dans ce travail, nous nous intéressons à une espèce qui est certainement l'un des premiers légumes que l'homme a cultivé. Il s'agit d'une légumineuse alimentaire, la fève (*Vicia faba* L.).

L'objectif de notre présente étude consiste à déterminer la teneur en polyphénols et évaluer l'activité antioxydante de *Vicia faba* stressée à la salinité croissante.

Pour bien cerner le sujet de cette investigation, nous avons divisé notre travail en deux grandes parties : dans la première nous avons rassemblé l'essentiel des recherches effectuées sur le stress salin et oxydatif ainsi que le rôle des composés phénoliques dans les mécanismes

de résistance non enzymatique chez les végétaux. La seconde partie est scindée en deux principaux chapitres : le premier est réservé au matériel et méthodes pour expliquer les conditions expérimentales dans lesquelles est réalisée notre essai ainsi que les différentes méthodes d'analyses utilisés pour quantifier les divers paramètres mesurés : polyphénols totaux, flavonoïdes et potentiel antioxydant. Le dernier chapitre est consacré à l'exposition des résultats et leur discussion en confrontation avec ceux d'autres précédentes études et recherches qui ont abordé cette problématique et enfin dégager certaines autres perspectives de recherche et d'investigation possibles pour le futur.

---

# PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

# CHAPITRE I

GENERALITES SUR LA FEVE  
ET FABACEES

## **CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA FEVE ET FABACEES**

### **1.1 Description de la famille des fabacées**

Les fabacées constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (Wojciechowski et *al.*, 2004). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Dupont et Guignard, 2007). La grande famille des fabacées (de faba, la fève) doit son unité à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de légumineuses sous laquelle cette famille est plus connue. La gousse est un follicule déhiscent qui s'ouvre par deux fentes longitudinales en deux valves portant chacune une rangée de graines exalbuminées. Les feuilles sont composées alternes, parfois stipulées, à pétiole épaissi à sa base, dialypétales, souvent zygomorphes et papilionacées, toujours monocarpellées.

Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (Wojciechowski et *al.*, 2004).

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois ou leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie (Wojciechowski et *al.*, 2004).

### **1.2 Description de l'espèce étudiée la fève: *Vicia faba* L.**

#### **1.2.1 Classification**

Décrite par Linné en 1753, la fève *Vicia faba* L. (Broad Bean en anglais) est une plante dicotylédone herbacée originaire d'Asie ou du Moyen-Orient. Sa culture est très ancienne et pratiquée dans le monde entier (Foltete, 2010).

Sa classification systématique est la suivante (Cronquist, 1981) :

- Règne: Plantae
- Sous-règne: Tracheobionta
- Division: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Sous-classe: Rosidae
- Ordre: Fabales
- Famille: Fabaceae
- Genre: *Vicia*
- Espèce: *faba* L.

Selon (Gallais et Bannerot, 1992), il en existe deux sous-espèces, *paucijuga* et *eu-faba* dans la sous-espèce *eu-faba* qui nous intéresse, on dénombre trois variétés différentes:

- ***Vicia faba major***, la fève maraîchère à grosses graines destinée à la consommation humaine ;
- ***Vicia faba minor***, la petite fève ou féverole utilisée pour l'alimentation du bétail ;
- ***Vicia faba equina***, la fève à cheval à grains moyens aussi appelée féverole ou févette dans certaines régions. Comme son nom l'indique elle est également destinée à l'alimentation du bétail.

### 1.2.2 Aspect et particularités botaniques

La Figure 1 représente l'aspect des feuilles, fleurs et fruits de *Vicia faba* L. Il s'agit d'une plante robuste, qui peut atteindre plus d'un mètre. Ses feuilles, composées de 2 à 7 folioles, sont alternes sur la tige de section carrée. Ses fleurs, disposées en racème (grappe), sont blanches avec un point noir sur les ailes, zygomorphes (à symétrie axiale) et hermaphrodites, à pollinisation entomophile (Figure 1). Sa floraison dépend de la photopériode et de la température. Ses fruits sont des gousses, caractéristiques de la famille des *Fabacées* (Foltete, 2010).



**Figure 1:** Les différentes parties de la fève (Foltete, 2010).

### **1.3 Production et importance de la fève**

#### **1.3.1 Valeur alimentaire**

La fève (*Vicia faba* L.) est un aliment important et un nourrissant légume en raison de la haute valeur nutritionnelle de ses graines, qui sont riches en protéines et en amidon. Les graines sont consommées secs, frais, surgelés ou en conserve.

Les fèves contiennent de bonnes quantités de nombreuses vitamines B, en particulier l'acide folique, de petites quantités de pro-vitamine A, des caroténoïdes, du zinc et du fer. La fève est une excellente source de protéines et sont une très bonne source de fibres. Les fèves ne contiennent que de très petites quantités de caroténoïdes avec un peu de  $\beta$ -carotène, et contrairement au pois pas de lutéine ou la zéaxanthine. Toutefois, ils contiennent un certain nombre de composés phénoliques, y compris flavonols, la quercitine et la myricétine et un groupe de flavonoïdes supplémentaire appelé catéchines (Lister, 2006).

#### **1.3.2 Aperçu sur la production de la fève**

Malgré son importance alimentaire, l'Algérie demeure loin de ses capacités de production pour la fève graine (neuvième rang au niveau mondial selon la FAO). Une grande partie de la production est consommé comme légume frais.

La partie de la récolte en vert est difficile à estimer. Ainsi, les rendements obtenus à partir de graines sèches ne donnent pas une véritable estimation de la production de la fève en Algérie.

La culture de la fève *Vicia faba* L. est pratiquée surtout dans les plaines côtières et de l'intérieur : Chlef, Skikda, Ain Témouchent et Biskra (Maatougui, 1996).

**Tableau 1:** Classement des pays par production en fève graine (2012) [<http://faostat.fao.org/>]

Position	Région	Production (1000\$ Int)	Symbole	Production (T)	Symbole
1	Éthiopie	319210	*	943964	
2	Chine	248794	*	1400000	*
3	Australie	94763	*	425000	*
4	France	91104	*	273539	
5	Royaume-Uni	30924	*	87000	*
6	Pérou	24986	*	73359	
7	Maroc	24396	*	147993	
8	Italie	13861	*	95996	
9	Algérie	10730	*	40507	
10	Mexique	7935	*	23073	
11	Syrie	7829	*	23553	
12	Guatemala	7393	*	22000	
13	Tunisie	5811	*	71800	

\* : données officielles

Les variétés de la fève comme 'Aguadulce' et 'Séville' cultivées en Algérie ont été introduites à partir de l'Espagne. La variété "Sidi Moussa précoce" a été sélectionnée en 1965 à El Harrach en Algérie. Ces variétés conviennent à la totalité des zones de culture de fève.

Toutes ces variétés sont récoltées à la fois pour des gousses vertes et grains secs. Une variété de fève très connue cultivée en Algérie est «Sidi Aïch». Toutes ces variétés sont sensibles aux maladies fongiques (*botrytis*), les insectes (pucerons), les plantes parasites (*Orobanche* sp.) et les nématodes (Zaghouane, 1991).

### 1.3.3 Intérêt agronomique

Les fèves sont connues pour avoir une forte capacité à fixer l'azote sur une large gamme de climats et de conditions de croissance. La tolérance au nitrate disponible du sol peut jouer un rôle plus important en taux de fixation de N<sub>2</sub>. Les résultats d'une étude à long terme menée en Espagne ont montré que la fève a eu le plus grand effet de rotation sur les

rendements de blé par rapport au pois chiche, tournesol, les jachères, et le blé en continu. (Mwengi, 2011).

#### 1.4 Exigences agro écologiques de la fève

En plus de son intérêt alimentaire et économique pour notre pays la fève est une excellente plante utilisée dans les rotations en régions céréalières. La fève est avérée être une culture de rotation supérieure pour la production de blé en pluvial sous précipitations limitées.

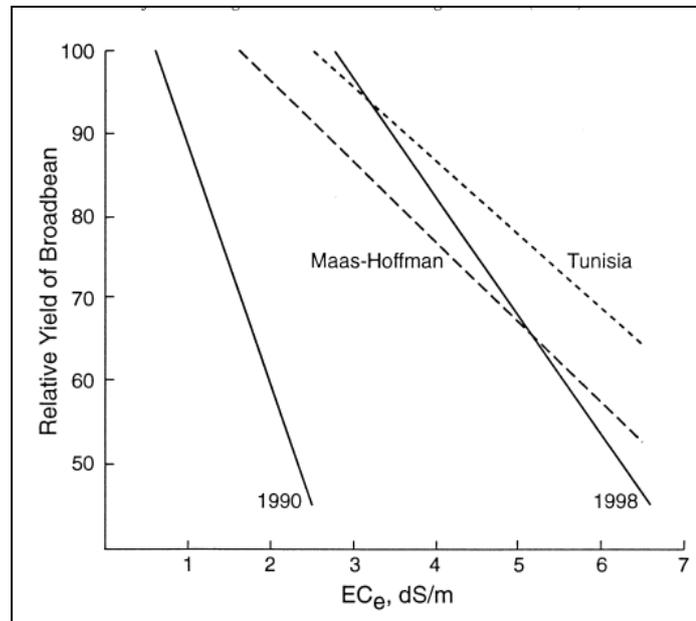
La région méditerranéenne est affectée par la salinité principalement dans les systèmes de cultures en irrigué : un système de culture très adapté pour la fève. Les plantes de fève sont plus sensibles au stress hydrique que les autres espèces de céréales et légumineuses (Amede and Schubert, 2003; Khan et *al.*, 2010). Cette légumineuse annuelle pousse mieux dans des conditions fraîches et humides. Le temps chaud et sec est préjudiciable à la culture, donc la plantation précoce est importante. La fève tolère le gel. Des précipitations de 650 à 1000 mm par an répartie uniformément sont idéales pour la fève (Gasim and Link, 2007; Abdel, 2008).

Puisque cette culture nécessite un bon approvisionnement en eau pour des rendements optimaux, un apport d'eau modéré est nécessaire. La fève ne tolère pas l'eau stagnante. Son besoin en eau est plus élevé: d'environ 9 à 12 semaines après l'établissement (Subash & Priya., 2012). Elle est cultivée comme une annuelle d'hiver dans les régions tempérées chaudes et les zones subtropicales; les cultivars rustiques dans la région méditerranéenne tolèrent des températures hivernales de -10 °C sans blessures graves alors que les plus hardis cultivars européens peuvent tolérer jusqu'à -15 °C.

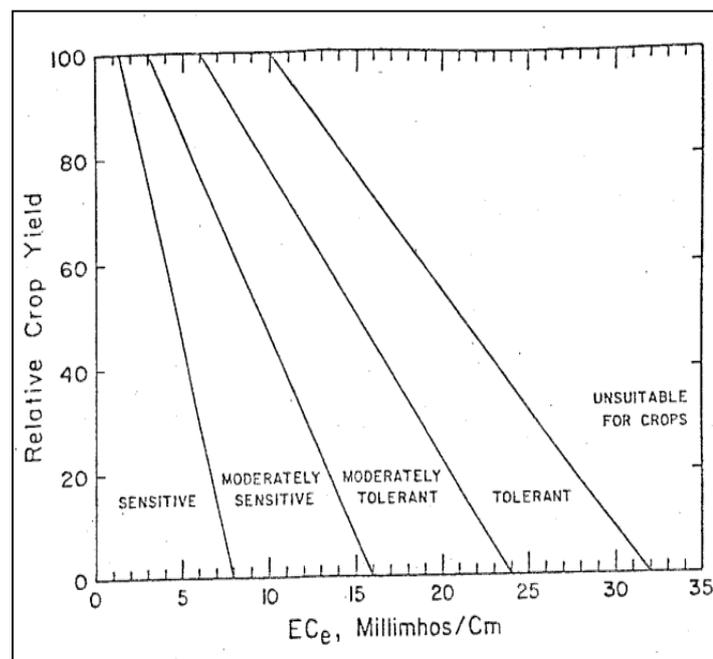
Les fèves sont lentes à émerger et prennent 20 à 25 jours. Les graines doivent être en contact permanent avec l'humidité jusqu'à ce que les plants soient bien établis. Le temps du semis à la récolte varie de 80 à 120 jours selon les cultivars et les conditions climatiques.

Les sols à texture moyenne sont parfaitement adaptés pour la production de la fève. Elle préfère les types de sol avec un pH allant de neutre à alcalin (pH de 6,5 à 8,0) (Rajan et *al.*, 2012). La fève est plus tolérante aux conditions de sol acide que la plupart des légumineuses (Singh et *al.*, 2010). Elle tolère presque tout type de sol ; mais pousse mieux sur des limons riches. Les fèves sont considérées comme les moins résistantes à la sécheresse parmi les légumineuses ; Cependant, des cultivars plus efficaces en terme d'utilisation de l'eau ont été mis au point à l'ICARDA (Subash et *al.*, 2012).

En termes de sa résistance à la salinité, et d'après la figure 2 qui représente la synthèse de quelques études sur la variation relative des rendements de la fève en fonction de la salinité présenté par (Katerji et *al.*, 2000) et la figure 3 qui représente le classement des tolérances des cultures à la salinité d'après (Maas et *al.*, 1977), la fève est considérée comme moyennement sensible à la salinité.



**Figure 2:** Rendement relatif de la fève selon la salinité du sol (Katerji et *al.*, 2000)



**Figure 3 :** Divisions pour le classement des tolérances des cultures à la salinité (Maas et *al.*, 1977).

La fève, en dépit de sa grande importance dans plusieurs régions semi-arides comme le bassin méditerranéen, elle est plutôt susceptible à la sécheresse. Son principal mécanisme pour faire face à ce stress est sa sensibilité et une fermeture très précoce des stomates (Link et *al.*, 2008). Cette sensibilité de la fève a été favorable pour son utilisation depuis plusieurs années comme plante modèle dans la perspective d'étudier les effets de la salinité sur le métabolisme des plantes et leurs variations biochimiques résultantes.

Plusieurs enzymes et osmolytes ainsi que d'autres types de métabolites secondaires comme les composés polyphénoliques varient pour permettre aux plantes de lutter contre divers stress environnementaux.

La capacité des substances phénoliques des légumineuses, notamment des flavonoïdes et des acides phénoliques à jouer le rôle de puissants antioxydants, a été largement étudiée (Rice-Evans et *al.*, 1996). L'hétérogénéité dans les variétés des légumineuses et de leur complexité dans les différentes compositions phytochimiques conduit au besoin pour de nouvelles recherches sur leurs composés bioactifs et les propriétés biologiques, parce que les mécanismes par lesquels les composés polyphénoliques présents dans les légumineuses exercent leurs propriétés biologiques ont tout juste commencé à être évalués (Yahia et *al.*, 2013).

# CHAPITRE II

SALINITE DES SOLS ET STRESS

SALIN CHEZ LES PLANTES

## **CHAPITRE 2 : SALINITE DES SOLS ET STRESS SALIN**

### **CHEZ LES PLANTES**

La salinité est un des facteurs les plus graves qui limitent la productivité des cultures, avec des effets négatifs sur la germination, la vigueur des plantes et le rendement des cultures (Munns et *al.*, 2008). La salinisation affecte de nombreuses zones irriguées principalement en raison de l'utilisation de l'eau saumâtre. Dans le monde, plus de 45 millions d'hectares de terres irriguées ont été endommagés par le sel, et 1,5 millions d'hectares sont retirées de la production chaque année en raison de niveaux élevés de salinité dans le sol (Munns et *al.*, 2008). La forte salinité affecte les plantes de plusieurs façons : stress hydrique, la toxicité des ions, des troubles nutritionnels, stress oxydatif, altération des processus métaboliques, la désorganisation de la membrane, la réduction de la division cellulaire et l'expansion, la génotoxicité (Hasegawa et *al.*, 2000 ; Munns, 2002). Ensemble, ces effets réduisent la croissance des plantes, leur développement et même leur survie.

#### **2.1 Notions générales sur la salinité des sols**

Les terres émergées représentent 13,5 milliard d'ha. Mais, quand on a retiré les déserts, les hautes montagnes, l'Antarctique, le Groenland, il reste 3 milliards d'ha cultivables, soit 22% du total; c'est seulement 50 fois la France (Nahon, 2008) et, la moitié de ces 3 milliards d'ha cultivables sont déjà cultivés. Comme on prévoit à court terme le doublement des populations humaines, il est plus que temps de se préoccuper de la sauvegarde du capital sol. Ce capital est inextensible et menacé (Legros, 2009).

La salinisation des terres est un problème majeur à l'échelle du globe. Selon la FAO et les estimations les plus récentes, elle affecte déjà au moins 400 millions d'ha et en menace gravement une surface équivalente. Elle est donc très importante quantitativement puisque, encore une fois, nous n'avons qu'un milliard et demi d'ha cultivés sur la Terre.

En Algérie, plus de 20% des sols irrigués sont concernés par des problèmes de salinité (Douaoui et Hartani, 2008). Dans cet ordre d'idée, l'expansion du phénomène de salinisation des sols en Algérie constitue un domaine d'investigation qu'il faut à tout prix privilégier car il représente une menace certaine et «sournoise» qui risque d'hypothéquer à terme l'avenir économique et social de certaines régions du pays (INSID, 2008).

### 2.1.1 La salinisation des sols

D'après (Mermoud, 2006), la salinisation des sols est le processus d'accumulation de sels à la surface du sol et dans la zone racinaire, qui occasionne des effets nocifs sur les végétaux et le sol; il s'ensuit une diminution des rendements et, à terme, une stérilisation du sol. La salinisation se produit généralement lorsque la quantité d'eau perdue par le sol par évapotranspiration dépasse celle provenant de l'infiltration des précipitations.

Souvent, la perte des terres à haut potentiel risque de compromettre les aptitudes et les capacités de production d'une région. Ce problème a été observé dans plusieurs régions du pays (Chellif, Relizane, Mohammadia, Sig, Ain Témouchent, Hautes-plaines de Sétif et de Constantine). La situation grave dans laquelle se trouve certains périmètres irrigués de l'Oranie, illustre parfaitement les dimensions du phénomène (Kessiran, 2003).

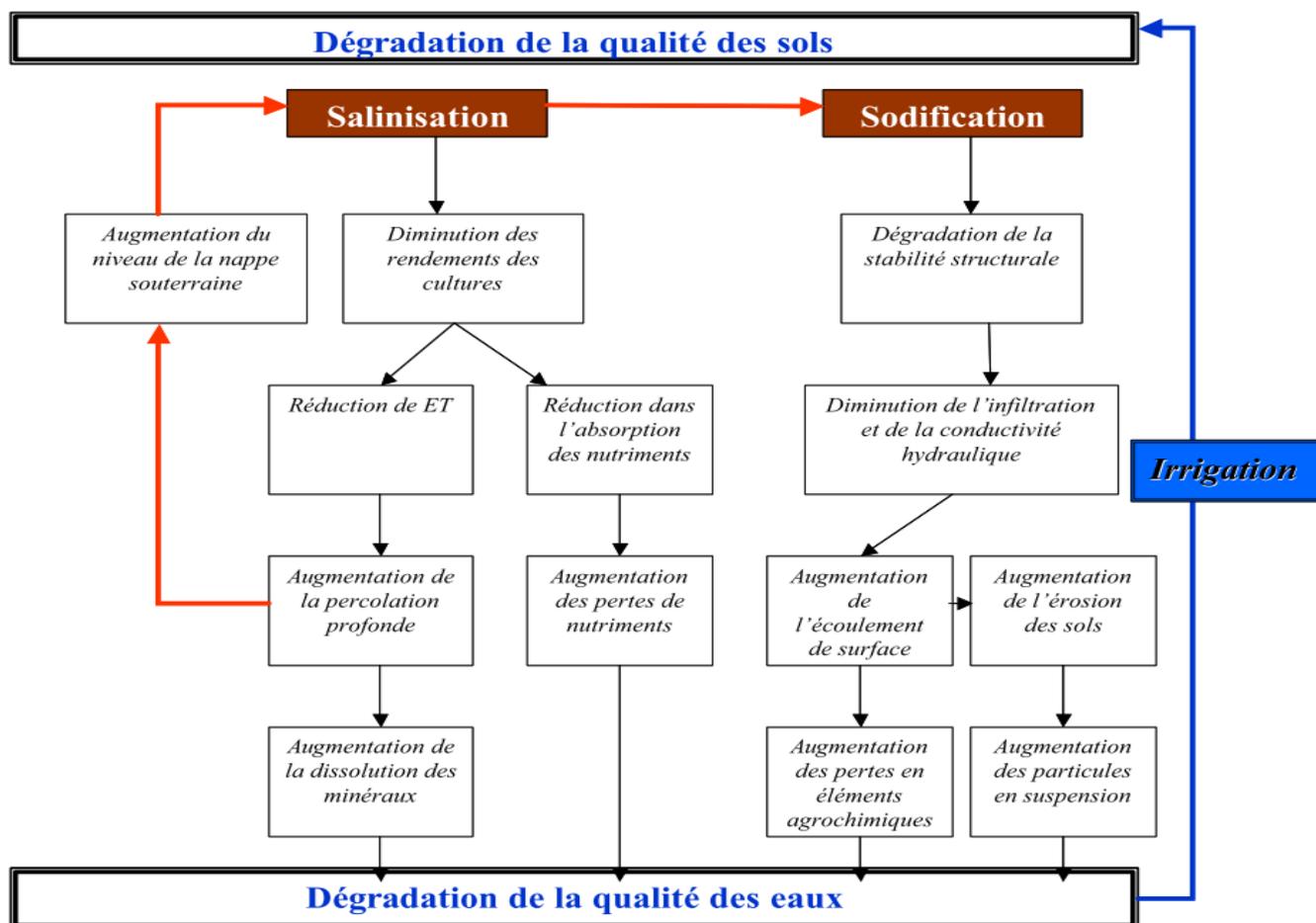
On distingue en général :

- la salinisation primaire, liée à la présence naturelle relativement concentrée de sels (proximité de mers ou d'océans, présence de dépôts de sels...),
- et la salinisation secondaire, dont le développement apparaît étroitement lié à l'irrigation. D'après (Szabolcs, 1994) à moyen terme, près de la moitié des surfaces irriguées dans le monde apparaîtraient menacées de salinisation secondaire.

Comme signalé par (Rasool et *al.*, 2013), La salinisation secondaire est due principalement aux activités humaines comme :

- l'irrigation sans un système d'irrigation adéquat.
- Effluents industriels
- Utilisation abusives de fertilisants
- Enlèvement du couvert végétal naturel
- Inondation avec des eaux riches en sels
- Niveau de nappe élevé avec utilisation d'eaux de qualité médiocre (chargée) pour l'irrigation.

Nous considérons que l'irrigation est la principale cause anthropique de la salinisation des sols. Une eau de mauvaise qualité est souvent utilisée pour l'irrigation, de sorte que finalement le sel s'accumule dans le sol à moins que la gestion du système d'irrigation soit telle que les sels soient lessivés de la surface du sol. La Figure 4 suivante récapitule ce processus.



**Figure 4 :** Processus de dégradation des sols suite à l'irrigation (Lahlou et al., 2000)

Les eaux sont donc classées en fonction de leur concentration en sels comme le montre le tableau suivant.

**Tableau 2 :** Limites permmissibles pour les classes des eaux d'irrigation (Fipps, 2003).

Classes des eaux d'irrigation	Concentration total des sels dissouts	
	C.E. $\mu\text{mhos}^*$	Gravimétrique ppm
Classe 1, Excellente	250	175
Classe 2, bonne	250-750	175-525
Classe 3, permmissible <sup>1</sup>	750-2000	525-1400
Classe 4, douteuse <sup>2</sup>	2000-3000	1400-2100
Classe 5, non souhaitable <sup>2</sup>	> 3000	2100

\* : Micromhos/cm a 25 °C  
 1 : besoin de drainage si elle est utilisée  
 2 : besoin de bon drainage, les plantes sensibles ont des difficultés de nutrition.

### 2.1.2 Types de sols salés

Les sols sont classés selon leur conductivité électrique mais aussi selon le SAR qui représente le pourcentage du sodium échangeable de la CEC totale (Tableau 3).

**Tableau 3** : Classification des sols basée sur l'analyse des extraits de pate saturée (James et al., 1982).

Critère	Normale	Salin	Sodique	Salin-Sodique
ECe (mmhos/cm)	<4	>4	<4	>4
SAR	<13	<13	>13	>13

La salinité cause diverses perturbations sur les plantes que nous avons essayé de synthétiser ci après.

## 2.2 Effets du stress salin sur les plantes.

Il y a une corrélation étonnante entre le degré de salinité d'un sol (appréciée globalement tous sels confondus par sa conductivité électrique) et le rendement agricole. Au-delà d'un seuil de conductivité assez bas, la récolte va diminuer régulièrement avec la salinité. Cela permet d'établir des tables prévisionnelles de rendement (Legros, 2009).

Le stress salin, comme beaucoup d'autres stress abiotiques, inhibe la croissance des plantes. Le ralentissement de la croissance est une fonction adaptative pour la survie des plantes sous stress. Dans la nature, l'étendue de la tolérance à la sécheresse ou au sel semble souvent être inversement liée à la vitesse de croissance (Zhu, 2001).

Les plantes croissant sur sols salés subissent un stress osmotique qui affecte négativement leur nutrition minérale et du coté des perturbations métaboliques et une baisse de l'activité photosynthétique source de production du végétal. Les plantes sous stress adoptent plusieurs mécanismes de résistance et d'adaptation (Calu, 2006).

### 2.2.1 Stress osmotique : perturbation de la nutrition minérale et hydrique

L'eau est une ressource indispensable pour les végétaux. Sa présence est une condition incontournable pour que toute plante puisse se développer et assurer ses fonctions physiologiques vitales. Cependant, suivant le milieu naturel, cette ressource n'est pas toujours facile d'accès dans le sol. Ainsi les plantes présentes sur des surfaces sèches et salées vont se retrouver exposées à un stress hydrique important, contre lequel elles devront lutter pour survivre. Dans le cas d'un stress salin, une double problématique se pose à l'organisme végétal : d'un côté, la présence de sels, en abaissant le potentiel hydrique du sol,

menace l'approvisionnement en eau de la plante et de l'autre, l'absorption de sel dans les tissus menace le bon fonctionnement physiologique des cellules (Calu, 2006).

Les effets nutritionnels de la salinité incluent les deux actions primaires du sel sur les plantes : la toxicité directe due à l'accumulation excessive des ions dans les tissus et un déséquilibre nutritionnel provoqué par l'excès de certains ions. Des concentrations salines trop fortes dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale des plantes (Levigneron, et *al.*, 1995). La toxicité du sodium ( $\text{Na}^+$ ) est due aux diverses interactions avec les autres cations cellulaires, et notamment le potassium ( $\text{K}^+$ ) et le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), causant des déséquilibres tel que la réduction du rapport ( $\text{K}^+$ ) / ( $\text{Na}^+$ ) et la déficience des plantules en ( $\text{Ca}^{2+}$ ), donc affecter plus loin leur croissance et leur productivité (Greenway and Munns, 1980 ; Essah, 2000).

La diminution de l'absorption d'azote dans des conditions salines est due à l'interaction entre  $\text{Na}^+$  et  $\text{NH}_4^+$  et / ou entre  $\text{Cl}^-$  et  $\text{NO}_3^-$  qui réduisent finalement la croissance et le rendement de la récolte (Rozeff, 1995). De nombreuses études ont montré que le stress salin réduit dramatiquement la fixation de l'azote  $\text{N}_2$  et l'activité nitrogénase des nodosités chez les légumineuses herbacées examinées par (Räsänen, 2002).

De plus, plusieurs rapports ont montré que le stress salin pourrait produire l'accumulation de composés toxiques telle que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les plantes (Allen et *al.*, 1995 ; Smirnoff, 1999) et qui induit un autre type de stress dit oxydant.

### **2.2.2 Effets sur la nutrition carbonée (photosynthèse)**

Le sel peut également provoquer la modification de la densité des stomates, du nombre et du diamètre des vaisseaux du xylème chez les halophytes, ou accélérer le cycle biologique avec changement de la voie métabolique de fixation du carbone (Levigneron et *al.*, 1995).

La fermeture des stomates est un processus qui diminue la disponibilité de  $\text{CO}_2$ , donc la photosynthèse et augmente la probabilité de formation de ROS. Dès que la concentration de  $\text{CO}_2$  dans le chloroplaste diminue par suite de la fermeture des stomates, il s'ensuit également une faible disponibilité de NADP pour accepter des électrons du photosystème PSI, initiant ainsi la réduction d' $\text{O}_2$  à la génération simultanée des espèces réactives de l'oxygène (Sudhakar et *al.*, 2001). Cela génère un autre type de stress dit oxydant.

## 2.3 Mécanismes de résistance et d'adaptation

Face à ce fléau, toutes les plantes ne sont pas égales. Certaines, sont nommées glycophytes, elles ne sont pas capables de supporter la présence des taux de sel élevés. Les halophytes, au contraire, développent des réponses physiologiques pour assurer leur approvisionnement en eau et minéraux tout en préservant leur métabolisme.

Une plante cultivée sur sol riche en sel doit faire face à sa pénétration dans ses tissus celui là est rejeté ou accumulé par les différents organes, tissus, cellules et compartiments cellulaires.

Les ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et sodium ( $\text{Na}^+$ ) pénètrent via les racines, transportés par la sève xylémique jusqu'aux tiges et feuilles. Là ils sont soit :

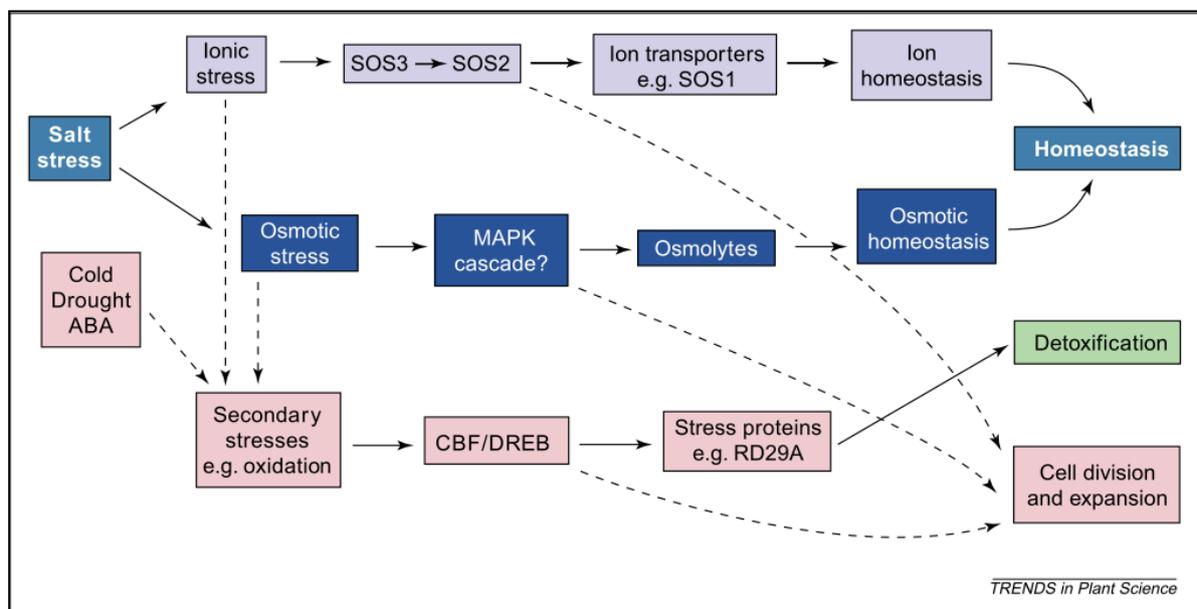
- stockés ( plantes de type ***Includer***), les feuilles sont riche en ( $\text{Na}^+$ ) que les tiges et les racines et le mécanisme de tolérance au sel est dû à la compartimentation des ions toxiques en particulier l'ion sodium dans la vacuole ;
- soit au contraire ils sont très peu retenus dans leurs feuille ( plantes de type ***Excluder***) et cette accumulation décroît selon la séquence racines-tiges feuilles et ces ions sont alors revéhiculés par la sève phloémique jusqu'aux racines (Levigneron et *al.*, 1995).

### 2.3.1 Mécanismes anatomiques d'adaptation

Ces mécanismes sont surtout adoptés par les plantes halophytes (tolérantes), qui peuvent survivre sur des sols de haute salinité. Se sont surtout de type *includer*. Des adaptations à long terme s'opèrent avec des modifications morphologiques au niveau des racines, tiges et feuilles. Pour cette fin, les halophytes facultatives comme *Mesembryanthemum crystallinum* L. changent leur mode de photosynthèse de  $\text{C}_3$  en CAM (Cushman et *al.*, 1989). Ce changement permet aux plantes de réduire la perte de l'eau par l'ouverture des stomates la nuit, donc réduire la perte de l'eau par la transpiration sous des conditions de salinité prolongée. Il y a aussi changement du mode  $\text{C}_3$  au mode  $\text{C}_4$  en réponse à la salinité chez les espèces tolérantes à la salinité comme *Atriplex lentiformis* (Zhu and Meinzer, 1999).

### 2.3.2 Mécanismes physiologiques d'adaptation à la salinité

Le stress salin a des effets complexes qui impliquent deux paramètres majeurs. Le stress osmotique entraîne un déficit hydrique, tandis que le déséquilibre ionique induit d'une part une toxicité ionique en raison de l'accumulation de  $\text{Cl}^-$  et  $\text{Na}^+$ , et d'autre part une toxicité indirecte en raison de la difficulté de l'absorption des nutriments essentiels. Toutes ces contraintes sont perçues et envoyées au génome qui active les mécanismes appropriés pour rétablir le transport de l'eau, limite l'absorption de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  ou diminue leur concentration dans le cytoplasme et permettant l'absorption d'ions indispensables à la croissance. La tolérance dépend d'une série d'adaptations physiologiques, biochimiques et moléculaires activés par le génome de survivre dans un milieu salin (Zhu, 2001) (figure 5).



**Figure 5** : Les trois aspects de la tolérance au sel chez les plantes (Zhu, 2001)

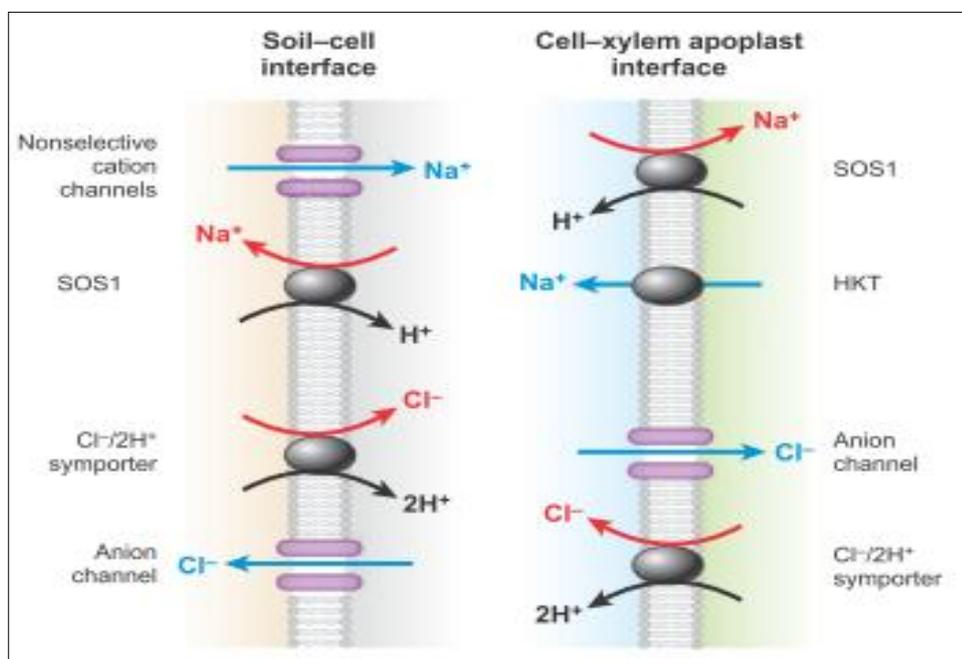
#### 2.3.2.1 Restauration de l'homéostasie ionique

La restauration de l'homéostasie ionique dans les plantes perturbées par le stress salin est une réponse essentielle et cruciale. Pour faire face au stress ionique causé par le stress salin, les plantes doivent restreindre l'absorption du sel, augmenter l'extrusion, la compartimentation et le control du transport tout au long des parties aériennes. Aussi, pour éviter le dommage cellulaire et la déficience nutritionnelle, les cellules végétales doivent maintenir une nutrition adéquate en  $\text{K}^+$  et un ratio favorable  $\text{K}^+ / \text{Na}^+$  dans le cytosol (Jabnoue, 2008).

Les glycophytes limitent l'absorption ou font la translocation du sodium dans les tissus âgés qui servent de compartiments de stockage qui sont éventuellement sacrifiés (Parida *et al.*, 2005). La suppression du sodium du cytoplasme ou la compartimentation dans les vacuoles est réalisée par des enzymes induites par le sel: le transporteur membranaire (antiport)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Apse *et al.*, 1999).

Chez *Arabidopsis*, on suggère qu'une protéine captatrice du signal du calcium induit par la salinité est "Ca<sup>++</sup> binding protein SOS 3". Une perte de la fonction de cette protéine par mutation rend les plantes hypersensibles au stress salin. L'extrusion du sodium est réalisée par un antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  SOS1 localisé dans la membrane plasmique. Une mutation dans SOS1 rend les plantes sensibles au  $\text{Na}^+$ . Un autre mécanisme pour réduire l'accumulation de  $\text{Na}^+$  cytoplasmique est réalisé par l'action des antiports  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sur le tonoplaste. Le gradient qui conduit l'antiport est produit par le  $\text{H}^+$  ATPase et les pyrophosphatases du tonoplaste.

Quelque soit le mécanisme de réponse des plantes aux stress abiotiques, une augmentation transitoire du  $\text{Ca}^{++}$  cytosolique doit être ajoutée aux événements de signalisation descendants pour être un intermédiaire dans l'adaptation au stress. Chez *Arabidopsis*, dans le cas d'un stress salin, le signal du  $\text{Ca}^{++}$  est perçu par la calcineurine- $\beta$ -like, un capteur du  $\text{Ca}^{2+}$ : SOS 3 (Jabnoune, 2008).



**Figure 6 :** Mécanismes proposés pour le transport du  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Munns *et al.*, 2008)

### 2.3.2.2 Ajustement osmotique

L'ajustement osmotique est un processus par lequel le potentiel hydrique de la plante peut être diminué sans être accompagné d'une baisse de la turgescence.

L'ajustement osmotique est défini comme une accumulation active de solutés par la plante en réponse au déficit hydrique croissant dans le sol et/ou plante, en maintenant la turgescence ou en réduisant le taux de perte de celle-ci, comme réponse à la baisse du potentiel hydrique. L'ajustement osmotique se produit alors à travers une compartimentation d'ions toxiques loin du cytoplasme dans la vacuole et/ou à travers l'accumulation de solutés organiques, tel que les solutés compatibles dans le cytosol (Hasegawa et *al.*, 2000).

Les osmolytes sont appelés métabolites compatibles apparemment parce qu'ils ne gênent pas le métabolisme cellulaire normal de la cellule (Ahmad and Sharma, 2008 ; Ahmad and Prasad, 2012a ; Ahmad and Prasad, 2012b). La fonction principale de solutés compatibles (osmolytes) est de maintenir la turgescence de la cellule et fournissant ainsi le gradient osmotique pour l'absorption d'eau.

Des études récentes indiquent que les solutés compatibles peuvent également agir comme capteurs de radicaux libres ou chaperons chimiques par des membranes directement de stabilisation et/ ou de protéines (Mc Neil et *al.*, 1999 ; Diamant et *al.*, 2001). On a découverts par des méthodes empiriques que Le Glycérol et le saccharose aident à la protection des macromolécules biologiques contre les effets néfastes de la salinité (Rasool et *al.*, 2013).

#### A- Glycine-Bétaine :

Les plantes synthétisent la Glycine-Bétaine, un osmolyte majeur qui a été largement observé dans diverses espèces végétales, conférant une tolérance au sel. La Glycine-Bétaine est synthétisé à partir de la choline en deux étapes, la première étant catalysée par la choline mono-oxygénase qui conduit à la synthèse de la Bétaine aldéhyde, qui est ensuite oxydé par la Bétaine aldéhyde déshydrogénase (Ahmad and Sharma, 2008 ; Chen and Murata, 2011 ; Koyro et *al.*, 2012). Les espèces très tolérantes, à savoir, *Spartina* et *Distichlis* , montrent une plus forte accumulation, quant aux moins tolérantes, et aux plus sensibles, elles montrent des faibles niveaux d'accumulation de glycine Bétaine (Rhodes et *al.*, 1989).

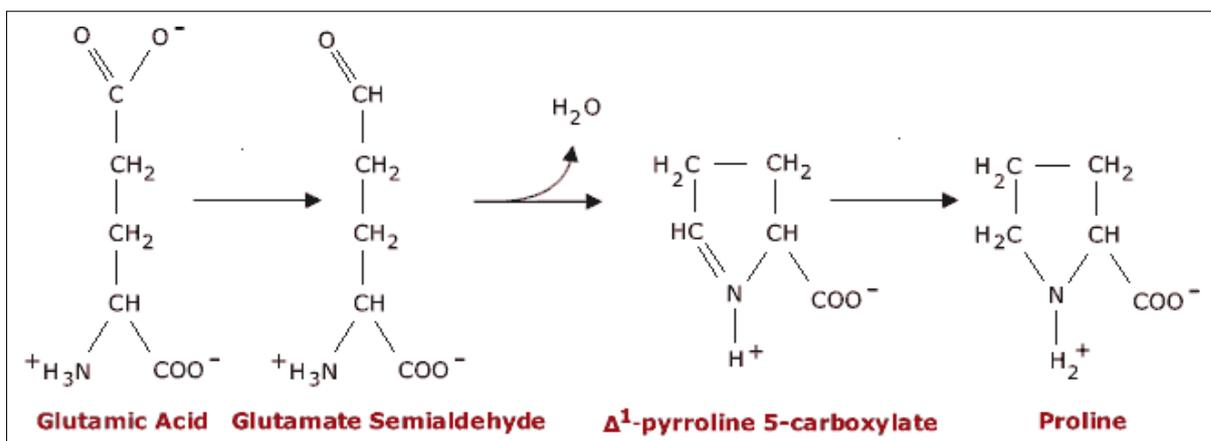
### B- Polyamines :

Tout facteur de stress comme le stress osmotique, pH bas, carence en potassium, d'éléments nutritifs ou de la carence de lumière conduit à l'accumulation de polyamines. Les polyamines telles que la spermine et la spermidine sont dérivés de la méthionine et de l'ornithine tandis que la putrescine de l'arginine. Les polyamines et leurs activités enzymatiques correspondantes sont sensiblement renforcées pendant le stress salin et hydrique (Lefevre *et al.*, 2000). En outre plusieurs polyamines stimulent la biosynthèse des protéines et jouent également un rôle clé dans la stabilisation des membranes biologiques.

### C- Proline :

L'accumulation de la proline est une des stratégies adaptatives déclenchées par la plante face aux contraintes de l'environnement (Belkhdja et Benkabilia, 2000). La Proline joue un rôle clé dans la régulation osmotique chez les plantes soumises aux stress hyper osmotiques, principalement la sécheresse et le stress salin (Ahmad and John, 2005; Ahmad *et al.*, 2006; Ahmad and Prasad, 2012a). La proline agit comme chaperon moléculaire en protégeant l'intégrité de la protéine et accroître ainsi les activités de nombreuses enzymes. (Rasool *et al.*, 2013).

La proline serait synthétisée à partir de l'acide glutamique *via* l'acide 5 carboxylique 1 pyrroline (PC5) mais également *via* l'arginine et l'ornithine.



**Figure 7** : Biosynthèse de la proline (Delauney and Verma, 1993).

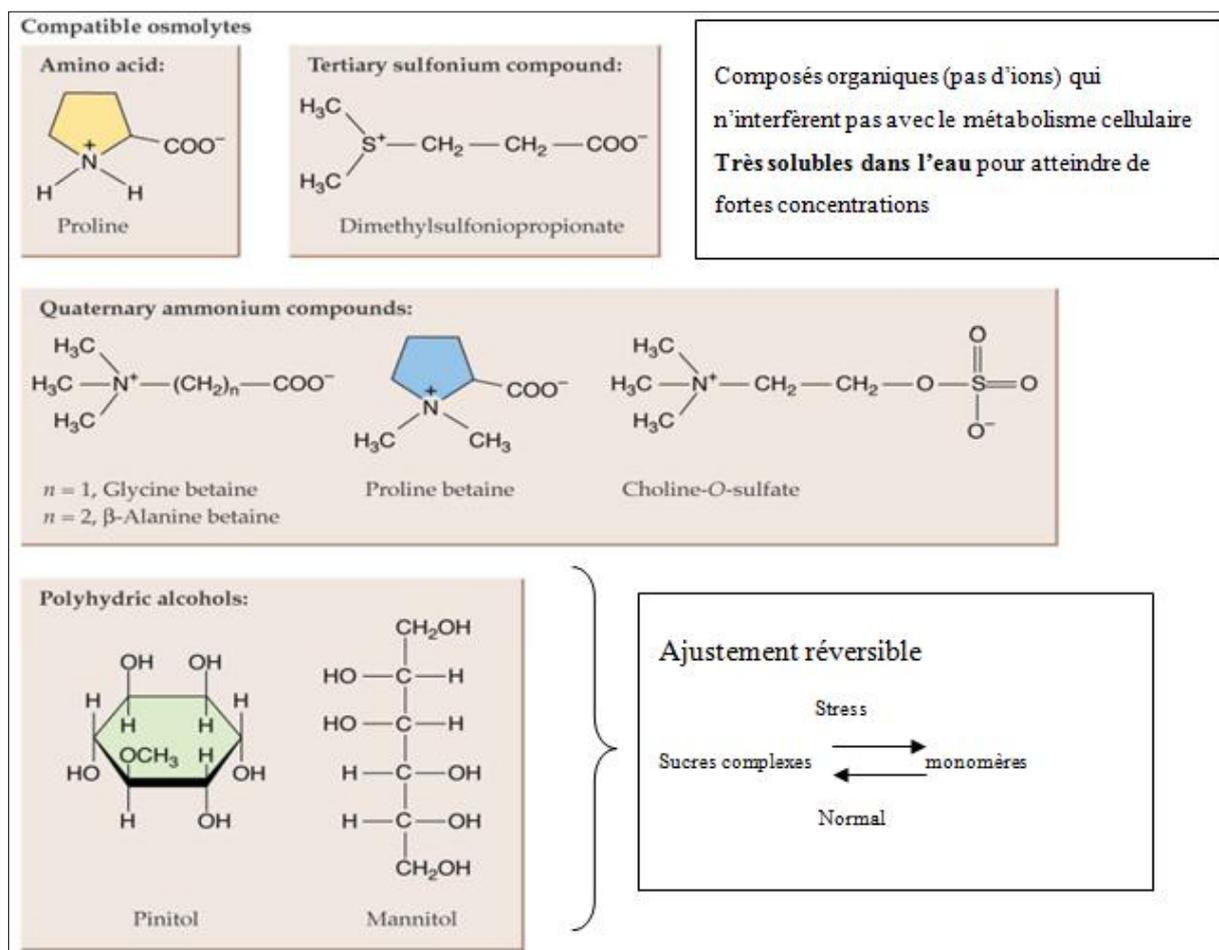
### D- Carbohydrates :

L'accumulation d'hydrates de carbone joue un rôle central dans l'osmoprotection, l'ajustement osmotique, le stockage du carbone et le piégeage des radicaux sous stress salin (Ahmad *et al.*, 2008 ; Koyro *et al.*, 2012). Le rôle des sucres dans l'adaptation des plantes à la

salinité ont été conclus à être universellement associée à une tolérance au sel (Rasool *et al.*, 2013).

### E- Les protéines :

Les protéines induites par le sel dans les plantes ont été classifiées en deux grands groupes (Mansour, 2000), à savoir, les protéines de stress de sel, qui s'accumulent seulement à cause du stress salin et les protéines de stress associé, qui s'accumule en réponse à divers stress abiotiques comme la chaleur, le froid, la sécheresse, l'excès d'eau et les déficiences ou carences des nutriments minéraux. L'accumulation des protéines fournit également une réserve de stockage d'azote pour être réutilisée par la suite et également un rôle clé dans l'ajustement osmotique (Singh *et al.*, 1987).



**Figure 8 :** Nomenclature de quelques osmolytes chez les végétaux (Vinocur & Altman, 2005)

#### 2.3.2.3 Mécanismes hormonaux

Les hormones végétales sont classées comme des substances organiques spécifiques qui à très faible concentration agissent sur les tissus cibles en tant que régulateurs de croissance et de développement (Kaya *et al.*, 2009). Ceux-ci comprennent l'acide abscissique,

l'acide jasmonique, l'acide salicylique et de l'éthylène modifiant la réaction physiologique des plantes exposées à un stress salin. L'acide abscissique (ABA) -une hormone végétale lipophile- est omniprésent dans les plantes inférieures et supérieures et participe aux processus complexes tout au long du cycle de vie des plantes.

Parmi les réponses physiologiques aux stress abiotiques, l'hormone végétale : acide abscissique - une sesquiterpénoïde avec un (C-1) de carbone asymétrique joue un rôle important. L'accumulation de l'ABA en réponse à un stress hydrique ou salin est un processus de signalisation cellulaire, qui englobe la perception du signal initial du stress, la traduction du signal cellulaire et la régulation de l'expression de gènes codant pour des enzymes clés de la synthèse et catabolisme d'ABA. Cette phytohormone joue un double rôle dans sa régulation physiologique. Il présente des fonctions inhibitrices quand il est accumulé en quantité importante sous des stress pour aider à la survie des plantes par l'inhibition de processus tels que l'ouverture stomatique et l'expansion de la taille de la plante. En outre l'ABA est impliqué dans l'inhibition de la production d'éthylène, qui est un inhibiteur de croissance sous stress (Waśkiewicz et *al.*, 2013).

#### **2.3.2.4 Synthèse d'antioxydants**

L'adaptation de la cellule végétale à la forte salinité implique l'ajustement osmotique et la compartimentation des ions toxiques. Un nombre croissant de preuves suggère que la forte salinité induit également la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le stress oxydatif (Parida et *al.*, 2005 ; Munns et *al.*, 2008 ; Ahmad and Sharma, 2008 ; Ahmad and Prasad, 2012a). Le taux réduit de photosynthèse augmente la formation des ROS, et augmente l'activité des enzymes qui détoxifient ces espèces (Logan, 2005).

Pour faire face à ce stress associé à la salinité et à divers autres stress environnementaux, Les cellules végétales ont développé une gamme complète de défense antioxydante pour limiter les effets néfastes des espèces réactives de l'oxygène.

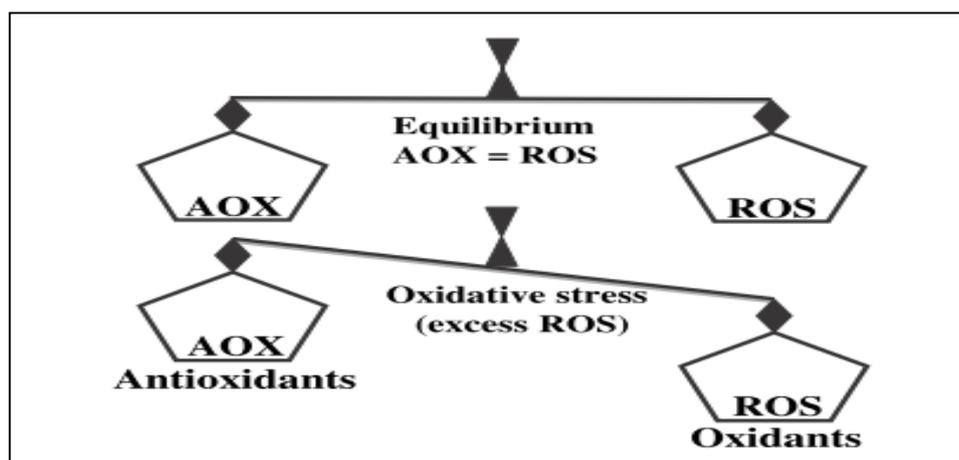
# CHAPITRE III

## LE STRESS OXYDATIF

## **CHAPITRE 3 : LE STRESS OXYDATIF**

### **Introduction**

Le stress oxydatif se définit comme le résultat d'un déséquilibre de la balance entre les ROS (Reactive Oxygen Species) et les systèmes de défense (antioxydants), avec comme conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule.



**Figure 9** : L'équilibre entre les ROS et antioxydants (Gill and Tuteja , 2010).

### **3.1 Formation des ROS chez les végétaux**

Les ROS sont un groupe de radicaux libres, des molécules réactives et d'ions dérivés à partir d' $O_2$ . Il a été estimé qu'environ 1% de l' $O_2$  consommé par les plantes est dévié pour produire des ROS (Krieger-Liszkay et al., 2008) dans différents *loci* subcellulaire, comme les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes (Gill and Tuteja , 2010).

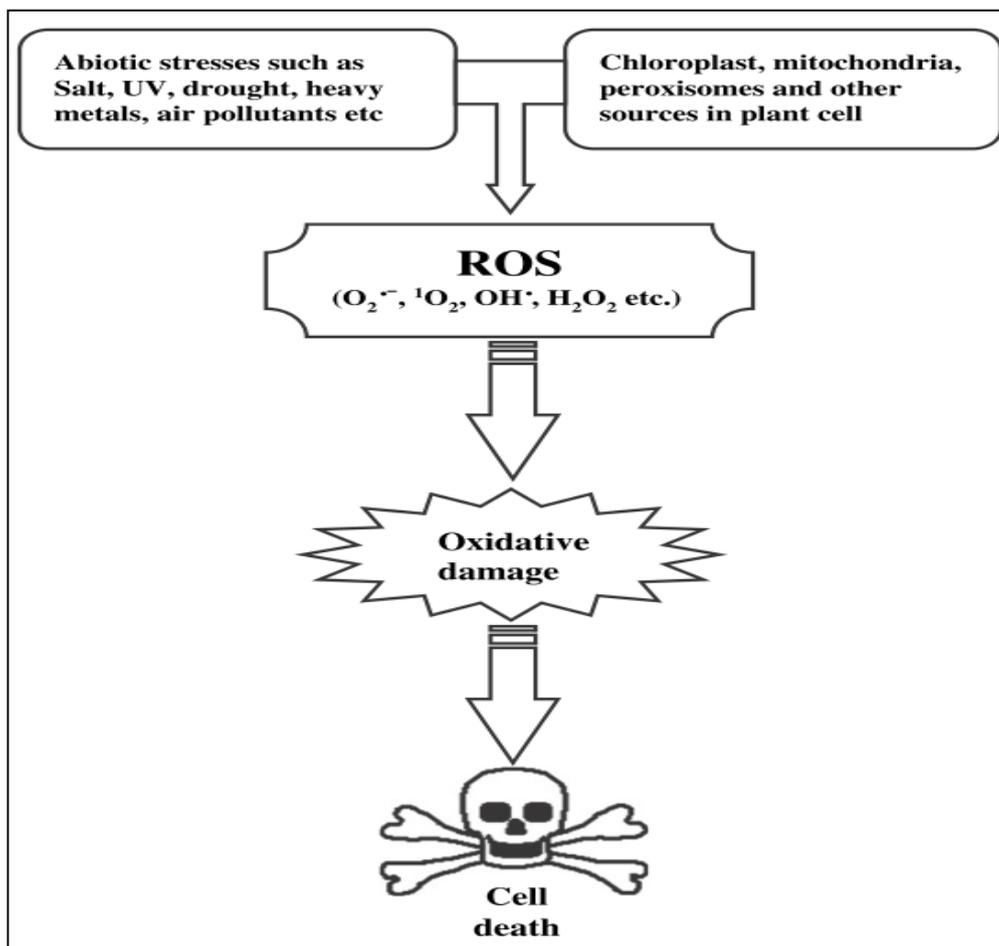
La tolérance au stress salin a souvent été associée au stress oxydatif, puisque l'une des conséquences de l'exposition à la salinité est la production des ROS, tels que les radicaux superoxydes ( $\cdot O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et des radicaux hydroxyles ( $\cdot OH$ ) (Asada, 2006).

#### **Dans quelles conditions les ROS sont elles produites ?**

En général la production des ROS est fortement augmentée lorsqu'il y a trop de lumière par rapport à la capacité de transport des électrons photosynthétiques (surexcitation des photosystèmes).

L'enzyme Rubisco peut réagir avec l' $O_2$  plutôt que le  $CO_2$ . Le produit de l'oxygénation (phosphoglycolate) est exporté dans les peroxysomes et impliqué dans des réactions qui entraînent la production de  $H_2O_2$ . Parmi les causes on peut citer :

- La lumière en excès:
- Sécheresse et salinité : la fermeture des stomates baisse la concentration de  $CO_2$  et donc le transport des électrons.
- Froid: limite la mobilité de la plastoquinone à cause de la baisse de fluidité de la membrane et baisse la vitesse de réaction des enzymes de la phase obscure.
- Pollution: Métaux lourds et pollution atmosphérique augmentent la production des ROS.



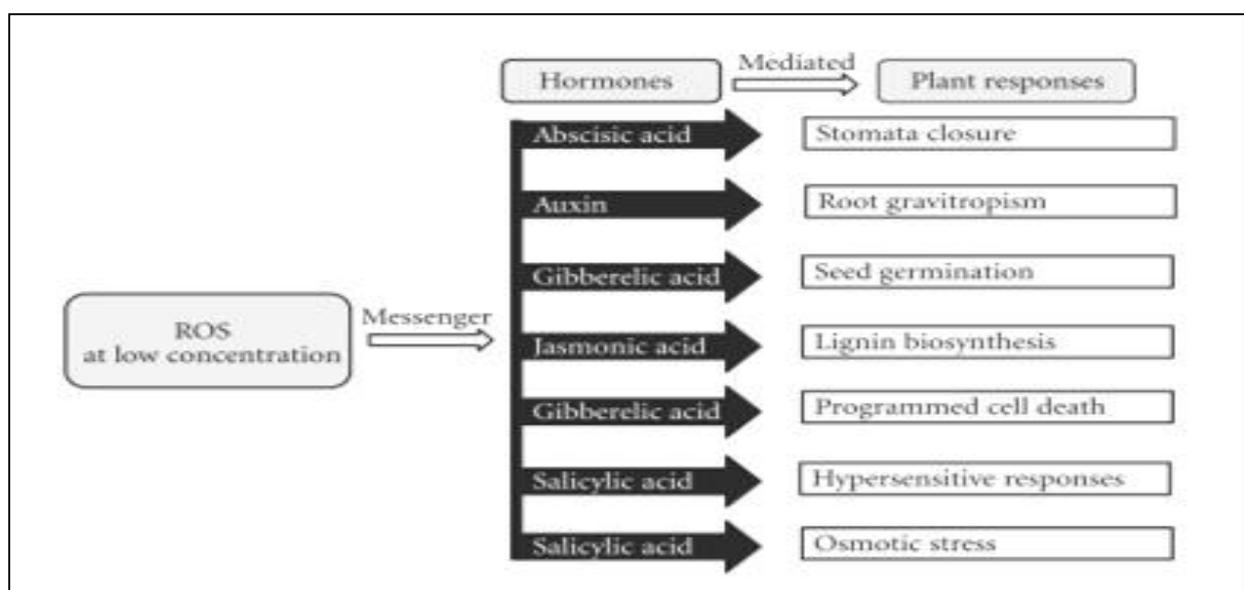
**Figure 10** : Stress abiotiques et formation des ROS (Gill and Tuteja, 2010).

## 3.2 Rôles et effets des ROS dans le stress des plantes

### 3.2.1 Rôle bénéfique des ROS comme messagers de stress

A concentration faible et/ou modérée, les ROS ont été impliqués en tant que seconds messagers dans les cascades de signalisation intracellulaire qui assurent la médiation de plusieurs réactions de la plante dans ces cellules, y compris la fermeture des stomates (Mittler, 2002), la mort cellulaire programmée, gravitropisme et l'acquisition de la tolérance aux stress biotiques et abiotiques (Miller *et al.*, 2008).

Sharma *et al.* (2012) montre le rôle des ROS comme second messenger dans les réponses cellulaires à médiation hormonale chez les plantes.



**Figure 11** : ROS, messagers dans des réponses hormonales au stress chez les plantes

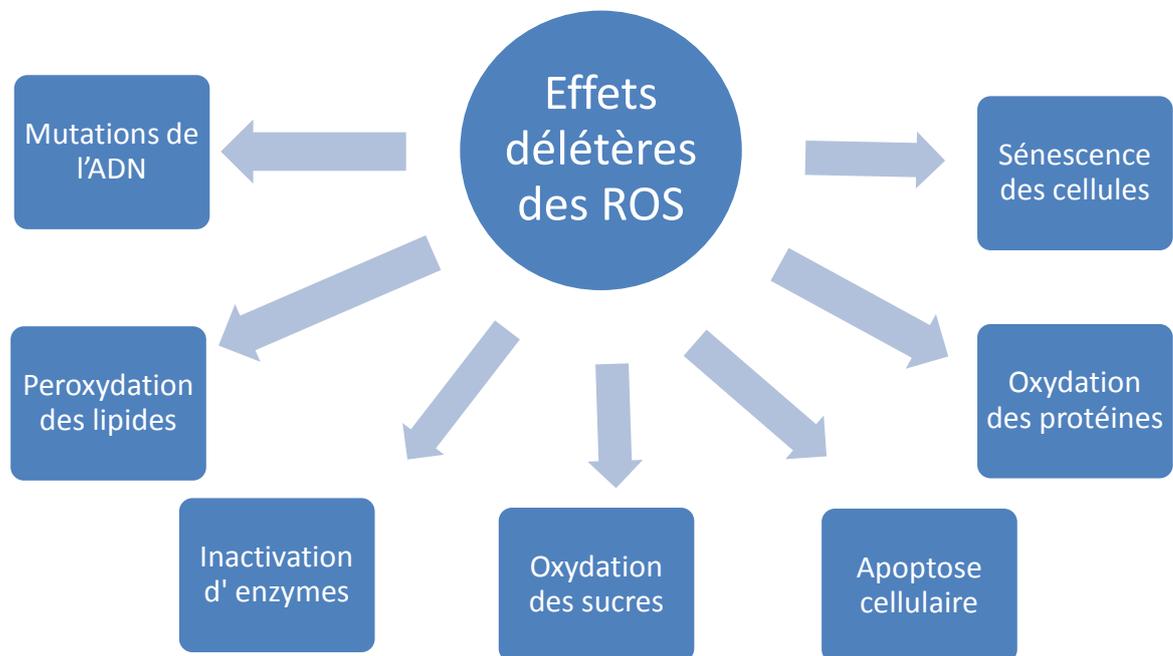
(Sharma *et al.*, 2012)

### 3.2.2 Les ROS et leurs dommages oxydatifs sur les biomolécules

La production et l'élimination des ROS doit être strictement contrôlée afin d'éviter le stress oxydatif. Lorsque le niveau des ROS dépasse les mécanismes de défense, la cellule est dite être dans un état de "stress oxydatif". Cependant, l'équilibre entre la production et le balayage des ROS est perturbé sous un certain nombre de conditions stressantes comme la salinité, la sécheresse, la lumière élevée, la toxicité due aux métaux, les agents pathogènes, et ainsi de suite. La haute teneur en ROS peut causer des dommages à des biomolécules telles que les lipides, les protéines et l'ADN. Ces réactions peuvent modifier les propriétés intrinsèques de la membrane comme la fluidité, le transport ionique, la perte de l'activité

enzymatique, la réticulation des protéines, l'inhibition de la synthèse des protéines, des dommages de l'ADN, et ainsi, en définitive résulte la mort cellulaire. (Sharma et *al.*, 2012).

La **Figure 12** ci-après résume les principaux dommages des ROS.



**Figure 12** : Les effets délétères des ROS sur les cellules

La signalisation par les ROS a été montrée comme faisant partie intégrante de la réponse d'acclimatation à la salinité. Les ROS jouent, en fait, un double rôle dans la réponse des plantes à des stress abiotiques, fonctionnant comme des sous-produits toxiques du stress métabolique, ainsi que comme d'importantes molécules de transduction de signal intégré dans des réseaux de réponse au stress en médiation avec le calcium, phosphorylation hormonale et protéique (Miller et *al.*, 2010).

### 3.3 Les mécanismes de défense anti-oxydatifs

Les plantes produisent des espèces réactives d'oxygène nommées ROS : Reactive Oxygen Species (à citer les radicaux superoxyde  $O_2^-$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  et les radicaux hydroxyles  $OH$ ) en réponse à un stress salin (Gardès-Albert et *al.*, 2003). Les ROS causent d'importants dommages aux lipides membranaires, protéines et acides nucléiques. La détoxification des ROS constitue un élément clé de défense des plantes contre les stress abiotiques dont le stress salin.

Autrement dit le stress induit la chute du taux d'assimilation du  $CO_2$  dans les feuilles. Cette limitation de la photosynthèse provoque une réduction de la chaîne d'électrons

photosynthétiques, ce qui favorise la production des dérivés réactifs de l'oxygène nuisibles à la croissance des plantes. Afin de réduire les dommages de cette oxydation résultante du stress salin, les plantes ont différents mécanismes pour se protéger:

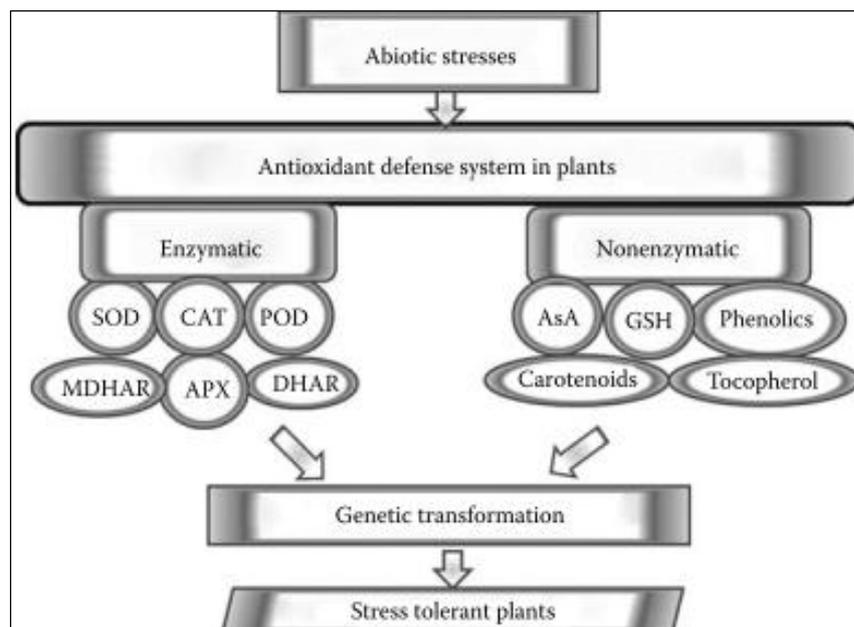
- Dissipation thermique de l'énergie en excès (surtout au PSII)
- Dissipation photochimique de l'énergie en utilisant l'O<sub>2</sub> comme accepteur de la chaîne de transport électronique lorsque la concentration [CO<sub>2</sub>] est faible.
- Utilisation de toute une série d'enzymes et molécules antioxydantes pour détoxifier les espèces réactives de l'oxygène produites.

Parmi les molécules antioxydantes, les composés polyphénoliques jouent un rôle important en piégeant les radicaux libres (Apel and Hirt , 2004; Ksouri *et al.*, 2007; Parvaiz *et al.*, 2009)

Les ROS ont une chimie très étendue, et sont à l'origine d'effets mutagènes et entraînent des altérations sur les protéines et les lipides. Pour faire face à ces inconvénients, les cellules vivantes se sont dotées de plusieurs armes efficaces pour éliminer ces ROS. Ces mécanismes peuvent être divisés en deux catégories selon qu'ils impliquent des enzymes de façon directe ou indirecte (Sofa *et al.*, 2004).

### 3.3.1 Les systèmes enzymatiques

Les enzymes responsables de cette détoxification incluent le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) (figure 13), et des enzymes du cycle ascorbate-glutathion.



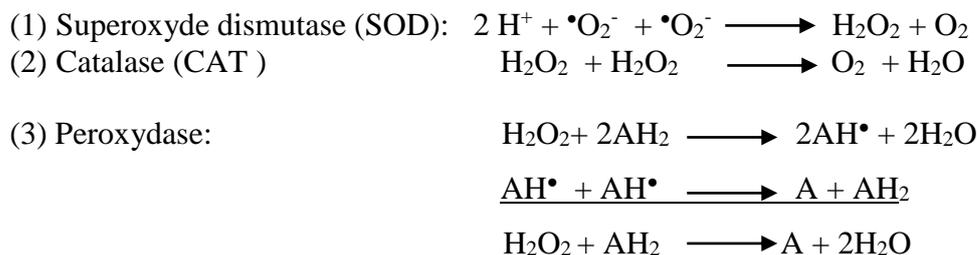
**Figure 13** : Les mécanismes antioxydants chez les plantes (Sharma *et al.*, 2011).

Les mécanismes normaux de défense cellulaire qui protègent contre les dommages des radicaux libres commencent par la cascade d'enzymes antioxydants. Les SOD occupent la première étape cruciale de cette fonction de protection par la détoxification du superoxyde ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) Voir formule (1) et est catalysée par les trois principaux superoxyde dismutase :

Cu/Zn SOD, Mn SOD et la SOD extracellulaire (Sharma et *al.*, 2012).

**Les enzymes du cycle ascorbate-glutathion :** Le changement dans le rapport de l'AsA de DHA et GSH en GSSG est crucial pour la cellule de sentir le stress oxydatif et réagir en conséquence. Le cycle AsA-GSH aussi appelée voie Halliwell-Asada est la voie de recyclage de l'AsA et de régénération du GSH qui détoxifie également le  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le cycle AsA-GSH implique l'oxydation successive et la réduction de l'AsA, GSH et NADPH catalysée par les enzymes APX, MDHAR, DHAR, et GR. Le cycle AsA-GSH est présent dans au moins quatre endroits subcellulaires différents, y compris le cytosol, chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes (Jiménez et *al.*, 1997).

Selon Pelmont (1995), la voie enzymatique de détoxification des ROS est basée sur les enzymes ci-dessous.



AH<sub>2</sub>: Substrat organique

La salinité induisant un stress oxydatif, et une relation éventuelle entre l'état des composants du système de défense antioxydant et la tolérance au sel chez les génotypes du riz (*Oryza sativa* L.) ont été étudiés par (Mishra et *al.*, 2013). Des semis d'un cultivar sensible au sel ont montré une augmentation substantielle du taux de production de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , des niveaux élevés de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , MDA, des bas niveaux de thiol, AsA et GSH et la baisse d'activité des enzymes antioxydantes par rapport aux semis tolérants au sel. Il a été suggéré qu'un statut plus élevé d'antioxydants AsA et GSH et une plus grande activité coordonnée des enzymes SOD, CAT, GPX, APX, et GR peuvent servir les principaux déterminants dans le modèle pour représenter la tolérance au sel chez les plants de riz (Mishra et *al.*, 2013).

Un cultivar tolérant au sel de *Plantago maritima* a montré un niveau bas de MDA et un meilleur mécanisme de protection contre les dommages oxydatifs causés par le stress salin par l'accroissement des activités de la SOD, CAT, GR, et APX par rapport à *Plantago média*

sensible au sel. Les NADP-déshydrogénases et peroxydase ont été suggérés comme des enzymes antioxydantes clés chez les plants d'olivier dans des conditions de stress salin (Valderrama et *al.*, 2006).

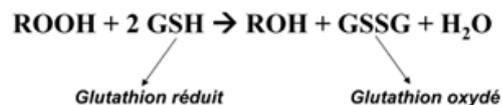
Mittal (1991) à observé une corrélation entre l'activité de la peroxydase et la tolérance au sel chez des semis de riz.

### 3.3.2 Les systèmes non enzymatiques

**L'ascorbate** : l'ascorbate ou acide ascorbique (AsA) est le plus abondant antioxydant à faible poids moléculaire qui joue un rôle clé dans la défense contre le stress oxydatif causé par une augmentation de niveau des ROS. L'AsA est considéré comme un puissant antioxydant en raison de sa capacité de donner des électrons dans un certain nombre de réactions enzymatique et non enzymatique. L'AsA a été montré jouer un rôle important dans plusieurs processus physiologiques des plantes, y compris la croissance, la différenciation et le métabolisme (Gardès-Albert et *al.*, 2003).

**Le glutathion** : Tripeptide ( $\gamma$ glu-cys-gly) ; GSH est l'une des métabolites majeures qui est considéré comme le plus important dans la défense intracellulaire contre les dommages oxydatifs induits par les ROS dans les plantes. Il se produit en abondance sous forme réduite (GSH) dans les tissus végétaux et est localisée dans tous les compartiments cellulaires comme cytosol, réticulum endoplasmique, vacuole, les mitochondries, les chloroplastes, les peroxysomes ainsi que dans l'apoplaste et joue un rôle central dans plusieurs processus physiologiques, y compris la réglementation du transport des sulfates, le signal trans-production, la conjugaison des métabolites, la désintoxication des xénobiotiques et l'expression de gènes sensibles au stress (Haleng et *al.*, 2008).

Les lipides hydroperoxydes peuvent être stabilisés par des glutathion peroxydases:



**La proline**: Autre que comme une osmolyte, elle peut être considérée comme l'un des antioxydants non enzymatiques dont les microorganismes, les animaux et les plantes ont besoin pour atténuer les effets néfastes des ROS. La proline contribue à stabiliser les structures subcellulaires (par exemple, les membranes et les protéines), piégeant les radicaux libres, et tamponner le potentiel redox cellulaire dans des conditions de stress.

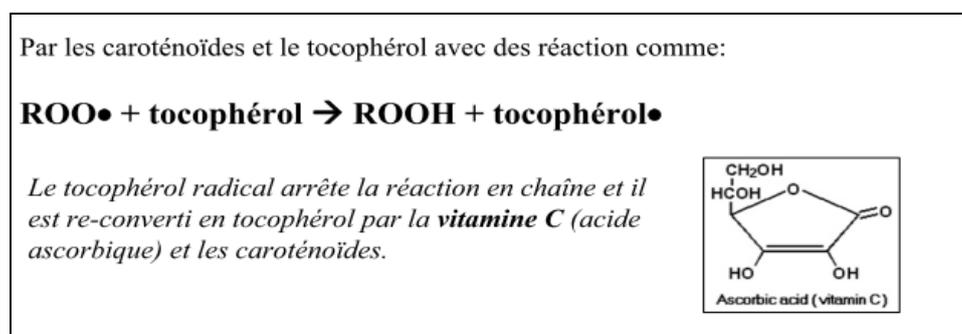
Carillo *et al.* (2011) ont rapporté que la proline peut également fonctionner comme un hydrotrope de protéines compatible, contribuer à la réduction de l'acidose cytoplasmique, et le maintien de ratios NADP<sup>+</sup> / NADPH appropriées compatibles avec le métabolisme. En outre, la dégradation rapide de la proline à l'amont du stress peut fournir des agents réducteurs suffisants qui soutiennent la phosphorylation oxydative mitochondriale et la production de l'ATP pour la récupération et la réparation des dommages causés par le stress.

En outre, la proline est connue pour induire l'expression de gènes de sensibilité au stress salin (Chinnusamy *et al.*, 2005; Ashraf and Foolad, 2007).

**Les tocophérols :** Les tocophérols comme la vitamine E, sont solubles dans les lipides. Les tocophérols sont considérés comme des antioxydants majeurs dans les membranes biologiques, où ils jouent à la fois des fonctions antioxydantes et non antioxydantes. Les tocophérols sont considérés comme des antioxydants généraux pour la protection de stabilité de la membrane, y compris de trempe ou de balayage des ROS comme <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (Fryer, 1992).

Dans les plantes, les tocophérols sont localisés dans la membrane des thylakoïdes des chloroplastes. Des quatre isomères de tocophérols ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) trouvés dans les plantes,  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) a l'activité antioxydante la plus élevée en raison de la présence de trois groupes méthyles dans sa structure moléculaire (Singh *et al.*, 2010).

**Les caroténoïdes :** Les plantes ont adopté plusieurs mécanismes pour se débarrasser de l'excès de l'énergie dans les membranes photosynthétiques, dont certaines impliquent des composés iso-prenoides. Dans tous les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes  $\beta$ -carotène et la zéaxanthine et de tocophérols jouent un rôle photo protecteur important, soit par de dissipation de l'excès l'énergie sous forme de chaleur ou œuvre par balayage des ROS (Sharma *et al.*, 2012). Avec les tocophérols, les caroténoïdes peuvent neutraliser des radicaux libres produits lors de la peroxydation des lipides) figure 14.



**Figure 14 :** Stabilisation des radicaux lipidiques par les tocophérols et caroténoïdes (Yu *et al.*, 2005).

**Les polyphénols :**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires divers (flavonoïdes, tanins, esters, hydroxycinnamate et lignine) qui possèdent des propriétés antioxydantes. Ils ont été abondamment trouvés dans les tissus végétaux. Les polyphénols contiennent un cycle aromatique avec les substituants OH ou OCH<sub>3</sub> qui contribuent ensemble à leur activité biologique, y compris une action antioxydante (Waśkiewicz et *al.*, 2013)

Ils sont des antioxydants variés assurant la protection des constituants cellulaires des lésions oxydatives. Chez les plantes, la synthèse et l'accumulation des polyphénols est généralement stimulé en réponse aux stress biotiques et/ou abiotiques telle que la salinité (Navarro et *al.*, 2006). En effet les composés polyphénoliques participent à la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont inévitablement produites lorsque le métabolisme aérobie ou photosynthétique est entravé par des stress environnementaux telle que la salinité.

**Les flavonoïdes :** Parmi les polyphénols, Les flavonoïdes sont parmi les métabolites secondaires des plantes les plus bioactifs. Les flavonoïdes servent comme des balayeurs des ROS en localisant et en neutralisant les radicaux avant qu'ils endommagent la cellule, donc importants pour les plantes dans des conditions environnementales défavorables. Le chapitre suivant aborde en détail les polyphénols et flavonoïdes et leurs rôles chez les plantes surtout dans les conditions de stress environnementaux (Petruzza et *al.*, 2013).

# CHAPITRE IV

LES COMPOSÉS PHENOLIQUES

## **CHAPITRE 4 : LES COMPOSES PHENOLIQUES :**

### **Introduction**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des plantes, les plus répandus dans la nature et étudiés depuis très longtemps. Le groupe contient plus de 9000 composés différant par la structure, la masse moléculaire, et les propriétés physico-chimiques et biologiques résultantes. Ils sont synthétisés dans les plantes par voie métabolique de l'acide shikimique (et manolate dans le cas des flavonoïdes et stilbènes), ce qui est un processus endogène contrôlé pendant la différenciation de développement, ou qui peut être régulé par des facteurs exogènes tels que la lumière, la température, la blessure ou divers autres stress (Crozier et *al.*, 2006).

### **4.1 Notions Générales**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires) par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal. Cependant, ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement (Crozier et *al.*, 2006)

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées (Cheynier et *al.*, 2013).

### **4.2 Biosynthèse des composés phénoliques**

#### **4.2.1 La voie de Shikimate**

C'est souvent la voie de biosynthèse des composés aromatiques (Figure 15), elle joue un rôle critique pour contrôler le métabolisme de la voie de phénylpropanoïde (Yao et *al.*, 1995 ; Floss, 1997)

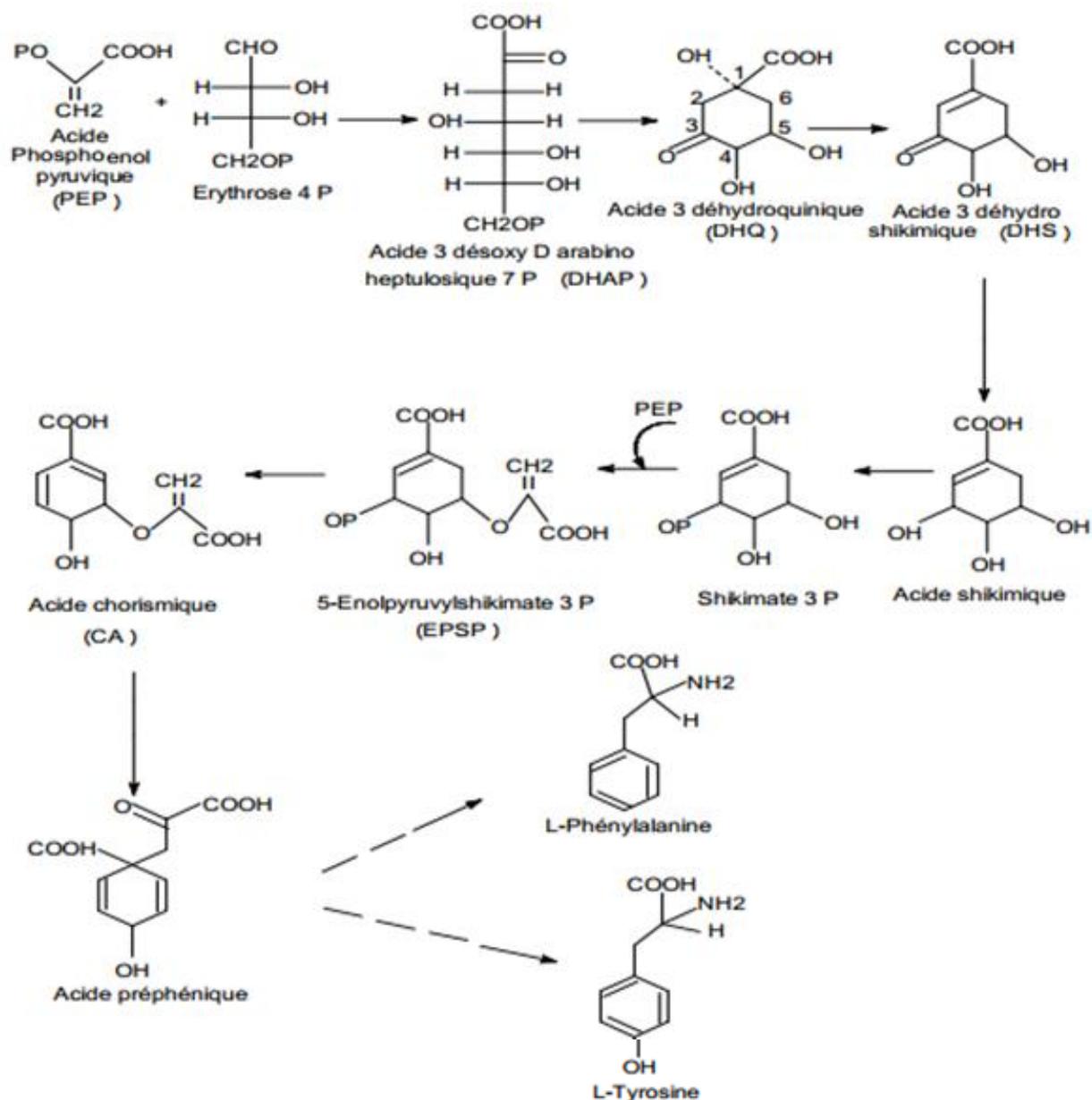


Figure 15 : La voie de shikimate (Floss, 1997)

#### 4.2.2 La voie des phénylpropanoïdes

La voie de phénylpropanoïde commence par la phénylalanine (Phe) qui fournit en plus des principaux acides phénoliques simples, coumarines, isoflavonoïdes, flavonoïdes, acide salicylique, des précurseurs de lignine, qui est quantitativement le second biopolymère le plus important après la cellulose ( Figure 16).

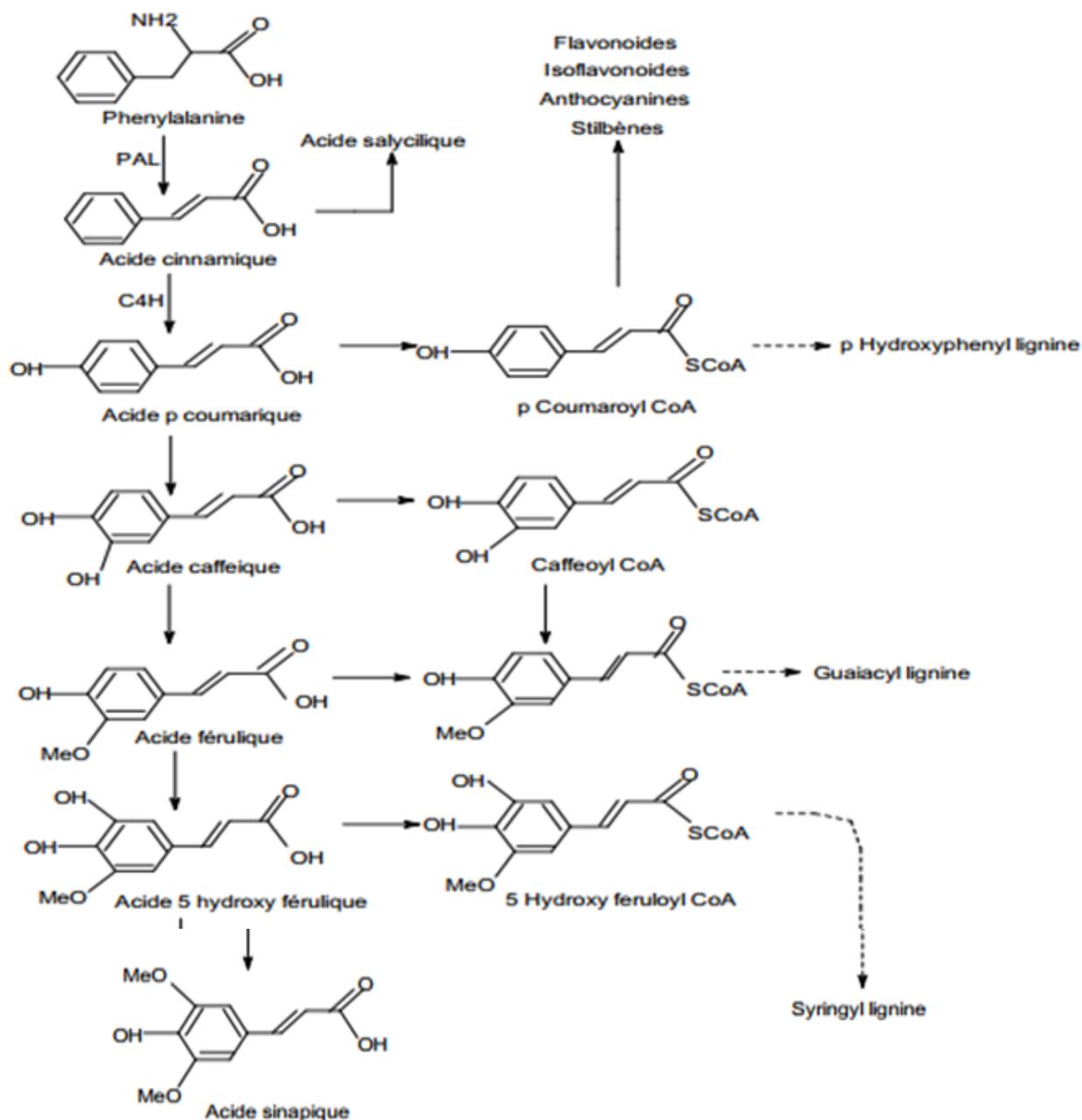


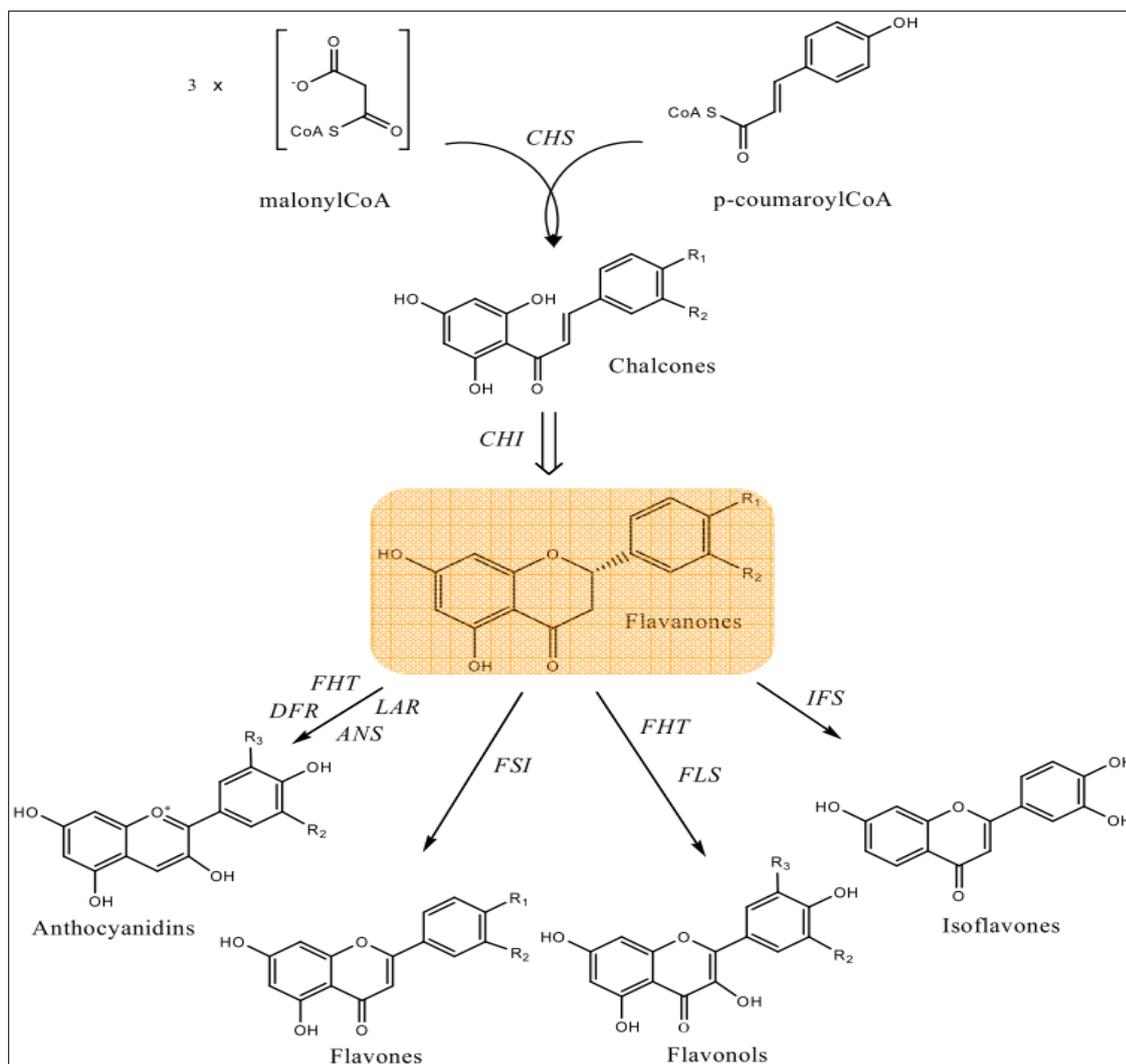
Figure 16: La voie de phénylpropanoïde (Hoffmann et *al.*, 2004).

### 4.2.3 La voie de biosynthèse des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et, de ce fait, possèdent le même élément structural de base, L'étape clé de la formation des flavonoïdes est la condensation, catalysée par la chalcone synthase, d'une unité phényle propanoïde avec trois unités malonyl-CoA (R est généralement OH, mais d'autres substitutions peuvent occuper ces positions).

CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; FHT: Flavanone 3 hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol 4'-reductase; LAR: Leucoanthocyanidine 4-reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; FSI: Flavone synthase; FLS: Flavonol synthase; IFS: 2-Hydroxyisoflavone synthase.

Figure 17). Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des divers flavonoïdes (Bruneton, 1999).



R est généralement OH, mais d'autres substitutions peuvent occuper ces positions.

CHS: Chalcone synthase; CHI: Chalcone isomerase; FHT: Flavanone 3 hydroxylase; DFR: Dihydroflavonol 4'-reductase; LAR: Leucoanthocyanidine 4-reductase; ANS: Anthocyanidin synthase; FSI: Flavone synthase; FLS: Flavonol synthase; IFS: 2-Hydroxyisoflavone synthase.

**Figure 17:** Biosynthèse des flavonoïdes (Khan, 2010).

### 4.3 Principales classes des polyphénols

#### 4.3.1 Les acides phénoliques simples

##### 4.3.1.1 Acides hydroxycinnamiques

Ces acides dérivent de l'acide cinnamique et ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques. Les degrés d'hydroxylation et de méthylation du cycle benzénique, conduisent à une réactivité chimique importante de ces molécules.

### 4.3.1.2 Acides hydroxybenzoïques

Sont des dérivés de l'acide benzoïque et ont une structure générale de base de type (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>). Ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides. Les acides hydroxybenzoïques les plus abondants sont répertoriés dans la Figure 18.

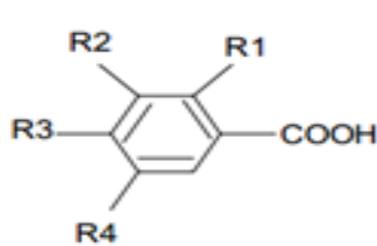
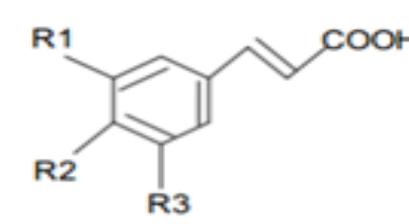
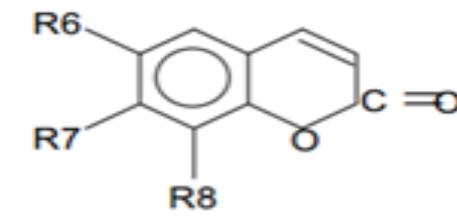
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>Acides phénoliques</b>
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide p hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
OH	H	H	OH	Acide gentisique	
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>Acides phénoliques</b>	
	H	H	H	Acide cinnamique	
	H	OH	H	Acide p coumarique	
	OH	OH	H	Acide caféique	
	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Acide férulique	
OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	Acide sinapique		
	<b>R6</b>	<b>R7</b>	<b>R8</b>	<b>Acides phénoliques</b>	
	H	OH	H	Umbelliférol	
	OH	OH	H	Aescultol	
	OCH <sub>3</sub>	OH	H	Scopolétol	
	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	Fraxétol	
H	OH	OH	Daphnétole		

Figure 18 : les principaux acides phénoliques (Li et al, 2010)

### 4.3.1.3 Coumarines

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique.

### 4.3.2 Les tannins

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinité (Harborne, 1997)

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes.

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

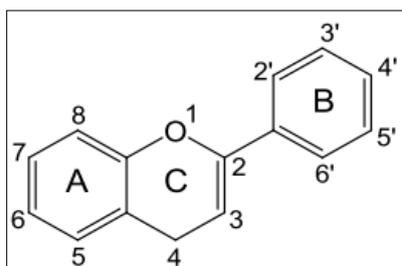
### 4.3.3 Les flavonoïdes

#### 4.3.3.1 Généralités

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange, cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus = jaune). Les travaux relatifs aux flavonoïdes sont multiples depuis la découverte du célèbre "french paradox" correspondant à un bas taux de mortalité cardiovasculaire observé chez les habitants des régions méditerranéennes, associant une consommation de vin rouge à une prise importante de graisses saturées, Près de 4000 flavonoïdes ont été décrits (Ghedira, 2005).

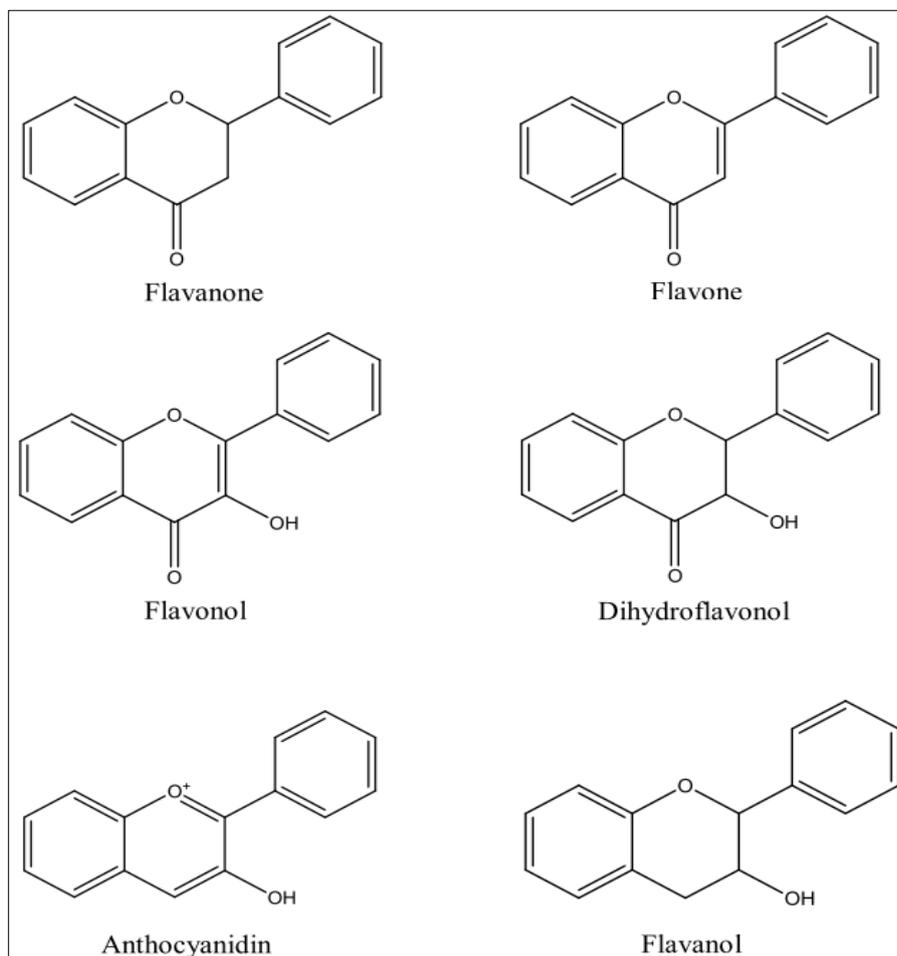
#### 4.3.3.2 Structure chimique et classification

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- $\gamma$ -pyrane) mais de point de vue classification, le groupe des flavonoïdes peut être divisé en plusieurs catégories. Cette division dépend de l'hydroxylation du noyau du flavonoïde aussi bien que du sucre lié.



**Figure 19:** Structure de base des flavonoïdes (Rania, 2007).

Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane (figure 20). Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (Krishna *et al.*, 2001).



**Figure 20** : Structures des sub-classes des flavonoïdes (Khan, 2010).

#### 4.3.3.3 Localisation et distribution des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation dans la plante est caractéristique : En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels (Remsy *et al.*, 1996).

Une des caractéristiques des composées phénoliques, qu'ils partagent avec l'ensemble des métabolites secondaires ; est de montrer une répartition très inégale chez les différentes espèces, et, pour une même espèce, selon la variété et le stade d'évolution physiologique.

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles (Bruneton, 1993 et 1999).

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont abondants dans les légumes feuillés (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans de nombreuses plantes médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri (Bronner, 1995)

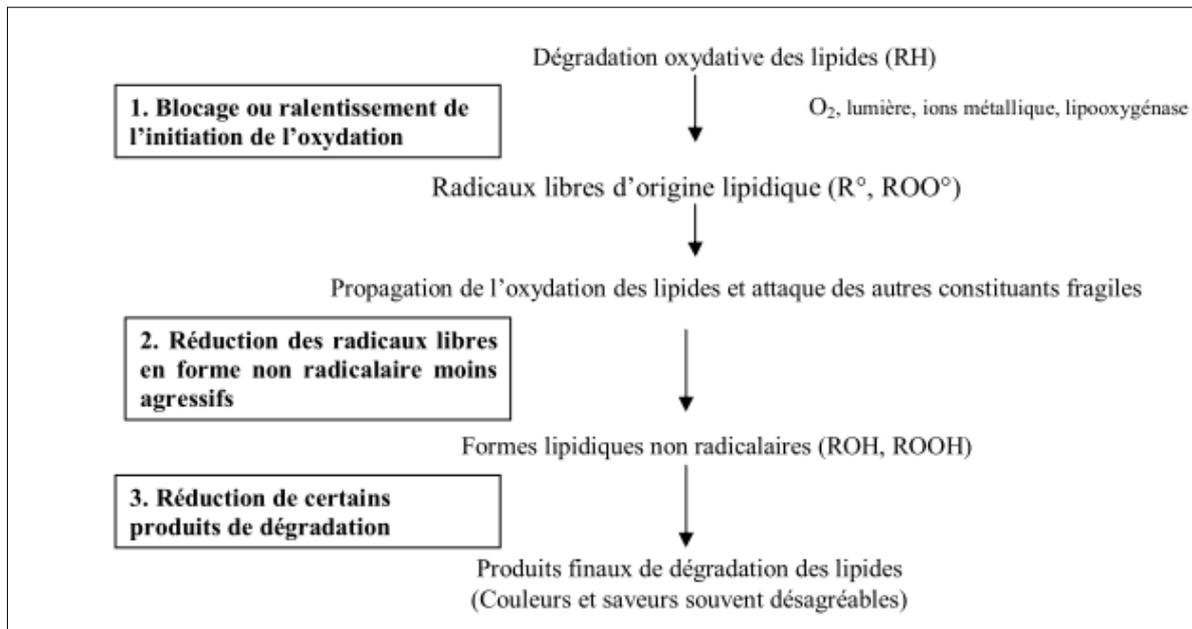
La distribution des isoflavones dans le règne végétal est en grande partie limitée à la famille des légumineuses, le soya étant la nourriture humaine primaire riche en ces composés, les fèves et le trèfle rouge sont également des sources d'isoflavones mais à des niveaux beaucoup plus faibles (Reinli & Block, 1996).

#### **4.4 Rôles et fonctions des polyphénols**

Les composés polyphénoliques participent de manière très efficace à l'adaptation des plantes dans le milieu naturel et les aident dans leurs mécanismes de tolérance à des stress environnementaux très variés. Ils peuvent jouer un rôle de molécules de signalisation, la protection contre la lumière UV et les agents pathogènes, attirer les pollinisateurs, stimuler la résistance aux maladies et / ou la protection contre des espèces réactives d'oxygène générées lorsque le métabolisme aérobie ou photosynthétique est affaibli par de variables stress environnementaux tels que le stress salin. Les ROS sont connues pour être responsables de la peroxydation lipidique des membranes cellulaires (Jean-Jacques et *al.*, 2005).

Le caractère antioxydant des composés phénoliques se manifeste à différents niveaux de cette dégradation oxydative par leur action réductrice, leur capacité à piéger et neutraliser les formes toxiques de l'oxygène, et les formes radicalaires des lipides par la chélation possible des ions métalliques. Par ailleurs, certains d'entre eux peuvent également inhiber la lipooxygénase : une enzyme qui catalyse l'oxydation des acides gras. Les composés phénoliques peuvent constituer des signaux de reconnaissance entre les plantes

leur permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes (Jean-Jacques et *al.*, 2005).



**Figure 21** : Les trois principaux points d'intervention des antioxydants phénoliques dans la protection des lipides contre la dégradation oxydative. (Shahidi et *al.*, 1992)

#### 4.4.1 Quelques propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes ont la capacité d'absorber les longueurs d'onde les plus énergétiques solaires (c.-à-dire UV-B et UV-A), inhiber la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou les neutraliser une fois qu'elles sont formées (Agati et *al.*, 2012). Les flavonoïdes protègent les plantes contre les radiations UV, elles sont également impliquées dans les processus de défense de la plante contre les infections bactériennes et virales, agissent comme des pigments ou des co-pigments, peuvent moduler la distribution d'auxine, et elles fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire. Ils agissent sur la régulation de l'élongation des tiges et interviennent dans la maturité des fruits. Ils sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux herbivores (Subramanian et *al.*, 2007)

Les flavonoïdes servent d'une multiplicité de fonctions dans les cellules eucaryotes, non seulement en raison de leur emplacement dans les différentes cellules et des compartiments subcellulaires, mais également en raison de leurs structures chimiques.

Les flavonoïdes sont sensibles au stress, et présentent un grand potentiel de réduction des formes diverses d'espèces réactives de l'oxygène, une condition commune à laquelle les plantes sont confrontés en éprouvant les divers stress abiotiques et biotiques (Brunetti et *al.*, 2013).

# PARTIE II

PARTIE EXPERIMENTALE

# CHAPITRE V

MATERIEL & METHODES

## **CHAPITRE 5 : MATERIEL ET METHODES**

### **5.1 Conditions de l'expérimentation et réalisation**

#### **5.1.1 Lieu de l'expérimentation**

L'expérimentation est réalisée en conditions semi contrôlées dans une serre vitrée à la ferme expérimentale de l'université de Mostaganem sise à la commune de Mazagran, Wilaya de Mostaganem.

Les coordonnées géographiques de la serre sont: (x : 35°53'31,9''N ; y : 0°5'7,4''E ; alt. :132m). L'expérimentation a duré 90 jours à partir de 4 Novembre 2013 sous conditions environnementales semi contrôlées avec une température moyenne sous la serre de 28 °C le jour et 23°C pendant la nuit, et une hygroscoPie: de 55 à 75%.

#### **5.1.2 Choix du matériel végétal**

La plante choisie est la fève ; *Vicia faba* L. la variété est *Aguadulce* espagnole très utilisée par les agriculteurs algériens procurée à un grainetier local. Le choix est dicté par la sensibilité de cette espèce au facteur étudié : le stress salin.

#### **5.1.3 Protocole expérimental**

L'objectif de la présente étude est d'évaluer la variation de la teneur en polyphenols et en flavonoïdes dans la fève en réponse à un stress salin provoqué par des irrigations avec des solutions salines croissantes (25, 50, 75 et 100 mM /litre) en combinant des sels de NaCl et CaCl<sub>2</sub> dans un rapport molaire de 50/50 ajoutées aux solutions nutritives Hoagland. Deux essais de 25 unités expérimentales chacun (pots) ont été réalisés sur deux stades phénologiques distincts (stade végétatif et stade floraison) des plants de fève *Vicia faba* L.

Les traitements utilisés sont énumérés au tableau ci-dessous.

Tableau 4 : les traitements salins appliqués

Traitement	T témoin	T <sub>1</sub> : 25 mM	T <sub>2</sub> : 50 mM	T <sub>3</sub> : 75 mM	T <sub>4</sub> : 100 mM
Equivalent ( g /L)	NaCl : 0 CaCl <sub>2</sub> : 0	NaCl : 0.73 CaCl <sub>2</sub> : 1.387	NaCl : 1.46 CaCl <sub>2</sub> : 2.77	NaCl : 2.19 CaCl <sub>2</sub> : 4.16	NaCl : 2.92 CaCl <sub>2</sub> : 5.55

- Facteur étudié : la salinité.
- Espèce mise en essai : *Vicia faba* L. la variété aguadulce sensible à la salinité et très utilisée par les agriculteurs algériens et disponible est procuré à un grainier local de Mostaganem.

➤ Les paramètres mesurés :

- La teneur en polyphénols totaux
- La teneur en flavonoïdes
- Pouvoir antioxydant : test DPPH

#### 5.1.4 Dispositif expérimental utilisé

Le dispositif expérimental utilisé dans la présente étude est le dispositif en blocs randomisés de Fischer avec cinq répétitions comme illustré dans la Figure 22 :

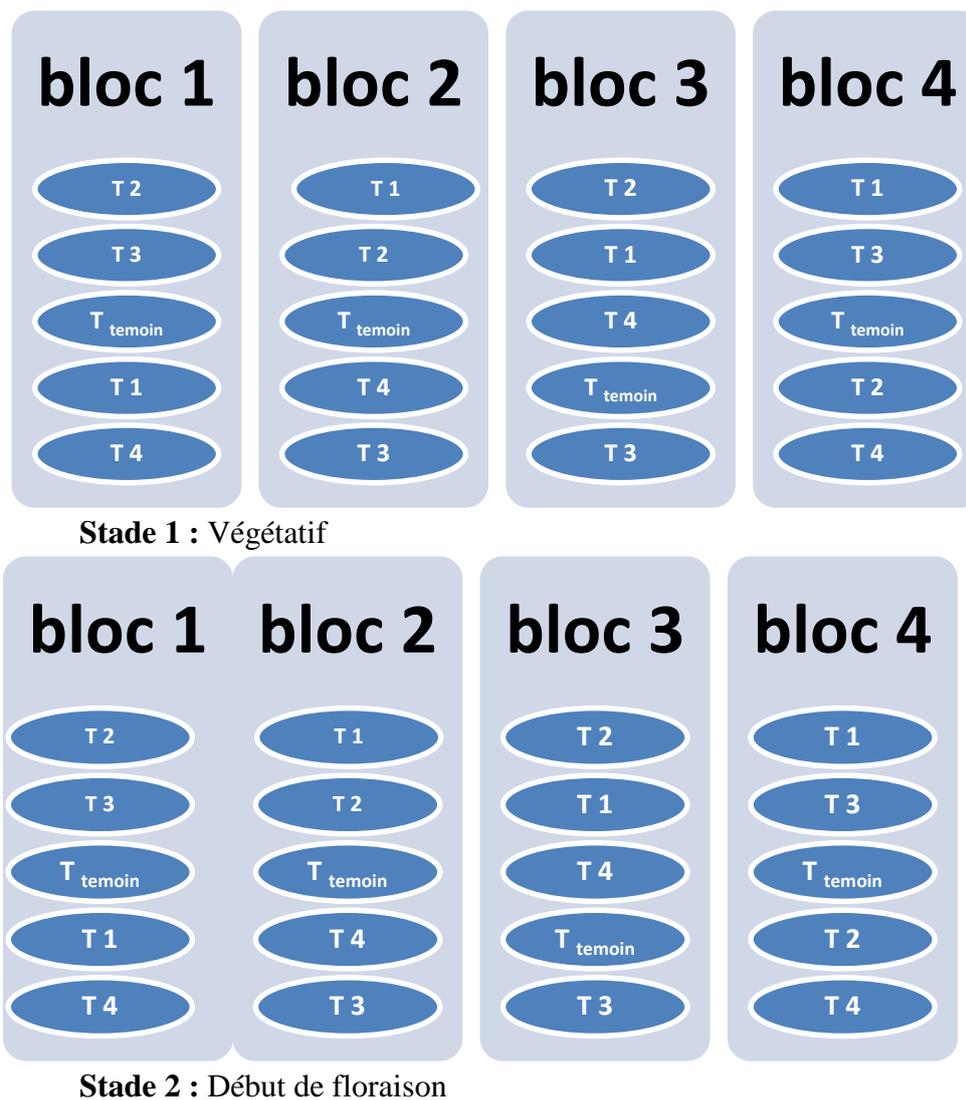


Figure 22 : Schéma du dispositif expérimental de culture en pots

#### 5.1.5 Mise en place et conduite de l'essai

Les graines de *Vicia faba* L. de la variété (Aguadulce) sont préalablement triées, celles d'apparence saines et de même taille sont mises à imbiber pendant six heures dans de l'eau potable, à température ambiante. Les graines sont ensuite stérilisées avec de l'eau de javel dilué 10 fois pendant 2 minutes puis rincées abondamment avec de l'eau distillée. Les graines

triées sont semées dans des pots remplis de 2 kg de sable (6 graines par pot). Le sable est précédemment bien lavé à l'esprit de sel et rincé trois fois à l'eau de robinet puis à l'eau distillée pour enlever toutes les traces de sel. Les graines sont arrosées à l'eau distillée jusqu'à la levée. Quinze (15) jours après semis, quatre meilleurs plants homogènes sont conservés par pot. Les plants sont arrosés un jour sur trois avec des solutions nutritives Hoagland selon la formule de Taiz et Zeiger (Taiz et *al.*, 2002) ; voir le tableau en annexe I.



**Photo 1** : a- plantes âgées de 35 jours, b- plantes âgées de 55 jours

### 5.1.6 Application du stress salin

Le stress par les sels est appliqué aux plants selon le protocole sur deux stades distincts: stade végétatif (plantes âgées de 45j) et stade de début de floraison (plantes âgées de 70j).

Le stress salin est appliqué à un lot de 25 pots pour chaque stade, à raison de 4 répétitions par traitement pendant deux semaines.

## 5.2 Méthodes d'extraction et de dosages

### 5.2.1 Extraction des composés polyphénoliques et flavonoïdes

#### 5.2.1.1 Préparation des échantillons pour l'extraction

Après une quinzaine de jours d'application du stress salin selon le protocole établi, les plantes de chaque traitement et de chaque répétition sont récoltées et étiquetées, d'une manière à éviter de les blesser qui peut causer l'oxydation des tissus, puis séchées à l'air et à l'ombre dans une étuve ventilée à 35°C.

Les parties aériennes comprenant les tiges et les feuilles sont broyées en fines particules et stockées dans du papier aluminium et conservées au froid jusqu'à l'extraction.

Toutes ces opérations permettent de pallier à la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition des activités enzymatiques causant leur dénaturation.

### 5.2.1.2 Procédé d'extraction utilisé

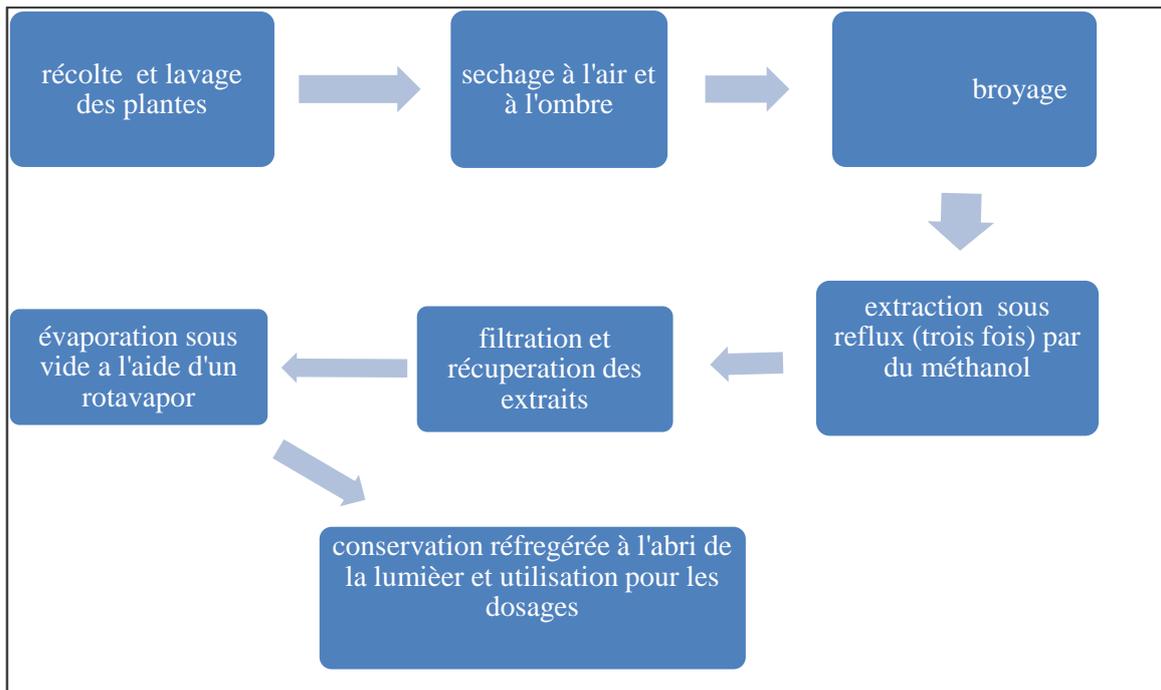
La variation de la chimie des composés phénoliques dans un échantillon est liée à la concentration en composés polyphénoliques simples et complexes et les différentes proportions d'acides phénoliques, les flavonoïdes, les anthocyanines et les proanthocyanidines (entre autres). Ainsi, il est difficile de choisir un seul procédé de préparation et d'extraction de composés phénoliques pour de nombreux produits végétaux (Khoddami et *al.*, 2013).

Des complexes avec des protéines, des glucides ou d'autres éléments empêchent une extraction complète de certains composés phénoliques. Pour certaines techniques de préparation, des échantillons de plantes ont besoin d'être séché en utilisant la lyophilisation, séchage à l'air ou séchage au four (Khoddami et *al.*, 2013).

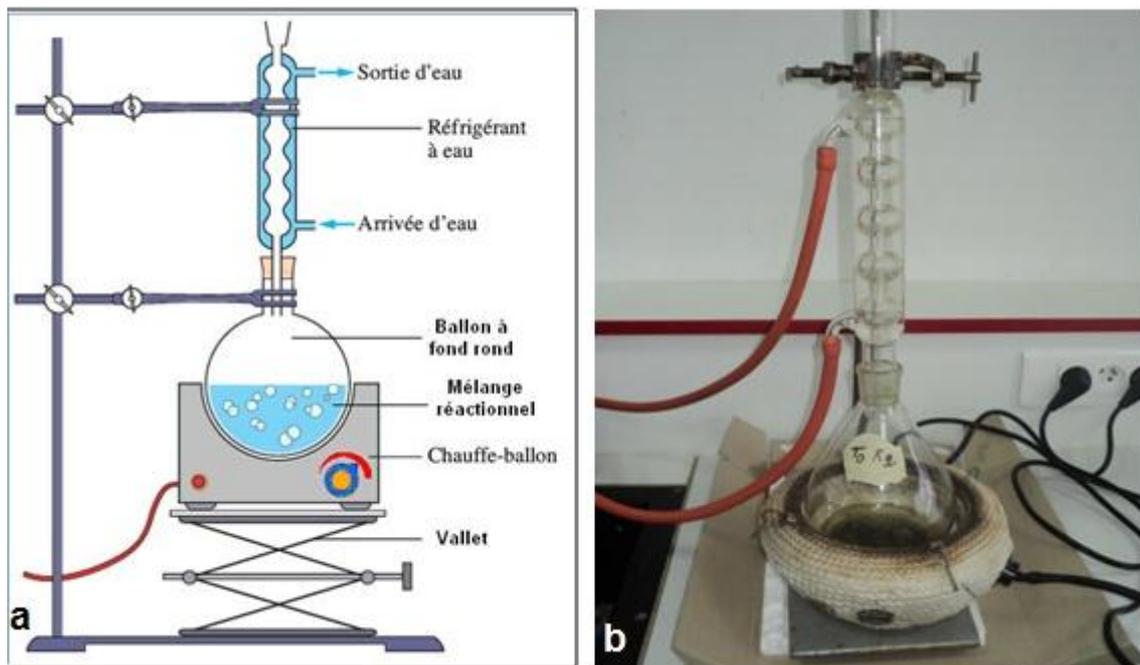
Il existe une panoplie de méthodes pour l'extraction des phénols des plantes. Dans la présente étude, nous avons utilisé la méthode d'extraction sous reflux. Le solvant d'extraction utilisé est le méthanol.

### Description de la méthode

Cette méthode consiste à porter l'échantillon 5 g (10 % de poudre broyée) à ébullition sous reflux (figure 21) en utilisant le méthanol pendant 30 min avec trois extractions successives. Cette technique permet d'extraire les composés chimiques les plus polaires présents dans la plante étudiée. Les trois extraits obtenus sont filtrés à l'aide de papier filtre de type Whatman N° 1. Les filtrats (extraits) de chaque échantillon sont réunis, et posés dans des fioles.



**Figure 23 :** Etapes d'extraction



**Figure 21:** a- Schéma du dispositif de l'extraction ; b- Dispositif de l'extraction, sous reflux.

Les extraits sont ensuite concentrés et séchés à l'aide d'un Rota vapeur (Photo 2 ) réglé à 40°C afin d'éliminer toute trace de Méthanol et pour obtenir un extrait cru visqueux.



**Photo 2:** Rota vapeur utilisé pour le séchage des filtrats après l'extraction.

## 5.2.2 Quantification des polyphénols totaux

### 5.2.2.1 Principe

La teneur en composés phénoliques des différents extraits a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu qui est basé sur la réduction de la mixture phosphotungstique ( $WO_4^{-2}$ ) et phosphomolybdique ( $MoPO_4^{-2}$ ) du réactif de folin par les groupements oxydables des composés phénoliques conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleu. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765nm à l'aide d'un spectrophotomètre dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Li et *al.*, 2007)

### 5.2.2.2 Protocole du dosage

L'analyse quantitative des polyphénols totaux est réalisée par le dosage spectrophotométrique selon la méthode de (Heilerova et *al.*, 2003) utilisant le réactif de Folin Ciocalteu: Dans des tubes à essai, on additionne à 100 $\mu$ l d'extrait méthanolique (2 mg/ml) 500  $\mu$ L de folin Ciocalteu (merck) (dilué au 1/10 dissout dans l'eau distillée), on agite et on laisse à l'obscurité pendant 5min à la température ambiante, ensuite on ajoute à l'ensemble 1,5 ml d'une solution de  $Na_2CO_3$  saturée (2% dissout dans l' $H_2O$ ), on agit encore au vortex et on laisse à l'obscurité pendant une heure à la température ambiante.

Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre UV-Visible (*PRIM SECOMAM*) à la longueur d'onde  $\lambda = 765$  nm.

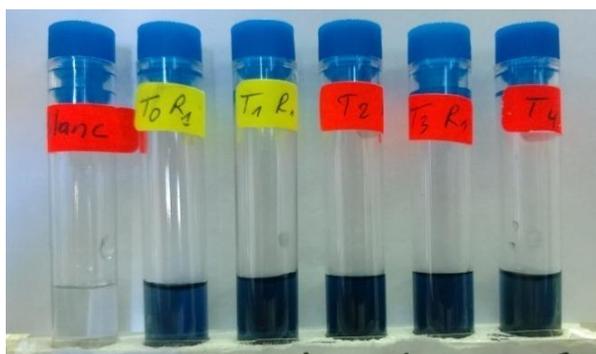


**Photo 3 :** Spectrophotomètre UV-vis PRIM SECOMAM

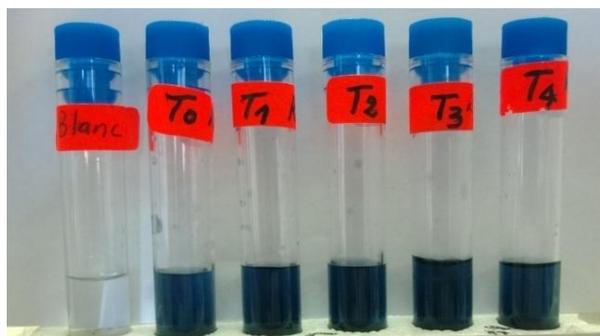
La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique, en suivant les mêmes étapes du dosage. Toutes les mesures sont répétées 3 fois.

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

Les photos montrent quelques échantillons de notre expérimentation.



**Photo 4 :** Tubes contenant des extraits en polyphénols (stade 1)



**Photo 5 :** Tubes contenant des extraits en polyphénols (stade 2)

Le blanc est préparé en remplaçant la quantité de l'extrait méthanolique par l'eau distillée, dans les mêmes conditions.

Cette technique à double faisceaux nous a aidés à éliminer l'absorbance du blanc et donner directement la densité optique de l'échantillon. Pour s'assurer que les résultats soient fiables, les dosages ont été réalisés en triplicata.

La quantification des polyphénols a été faite au moyen d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de différentes concentrations d'acide gallique (*Fluka*) : 0,10, 25, 50, 75 et 100( $\mu\text{g/ml}$ ) à partir d'une solution mère d'acide gallique de 1mg/ml dissout dans l'eau distillée. Cette courbe est réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par g d'extrait (mg EAG/g d'extrait). Ils représentent la moyenne de 3 répétitions.

La quantité des phénols totaux est calculée par l'équation suivante :

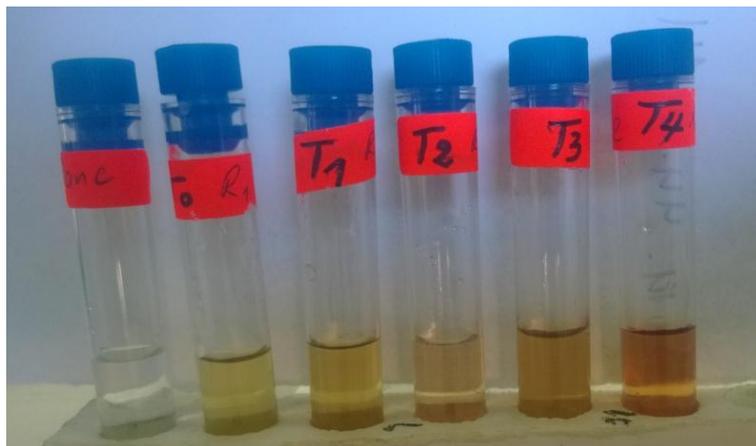
$$C = c \cdot v / m$$

- C : contenu total des polyphénols (mg équivalent acide gallique /g d'extrait plante).
- c : concentration d'acide gallique (mg/ml).
- v : volume de l'extrait (ml).
- m : masse de l'extrait méthanolique des plantes (g).

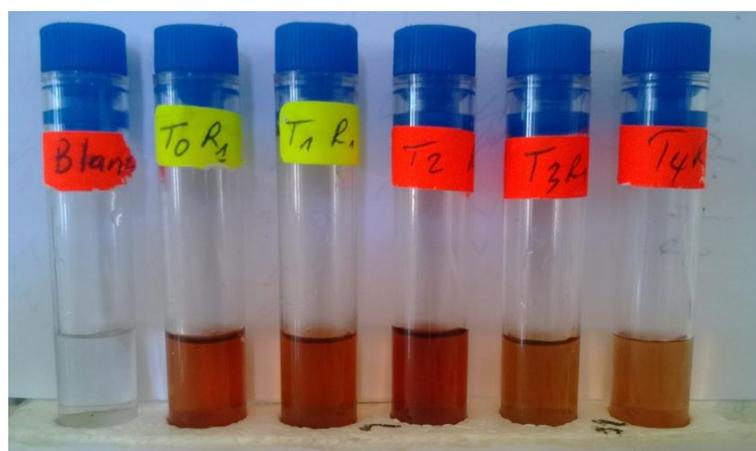
### 5.2.3 Dosage des flavonoïdes

L'analyse quantitative des flavonoïdes est réalisée par le dosage spectrophotométrique selon la méthode directe par (Kim et *al.*, 2003).

Dans des tubes à essai , on mélange 500  $\mu\text{l}$  de l'extrait méthanolique (dissous dans le MéOH, à une concentration de 2 mg/ml à un volume de 1500  $\mu\text{l}$  d'eau distillée, à t = 0 min on ajoute 150  $\mu\text{l}$  d'une solution de  $\text{NaNO}_2$  à 5% (dissout dans l'eau distillée), à t = 5min on ajoute 150  $\mu\text{l}$  d'une solution de  $\text{AlCl}_3$  à 10% (dissout dans l'eau distillée), à t = 11 min on ajoute 500  $\mu\text{l}$  de NaOH 1M(dissout dans l'eau distillée), puis on mélange au vortex. Les dosages ont été réalisés en triplicata. Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre UV- Visible (PRIM SECOMAM) à 510 nm (Photo 4).



**Photo 6 :** Tubes contenant des extraits en flavonoïdes (stade 1)



**Photo 7 :** Tubes contenant des extraits en flavonoïdes (stade 2)

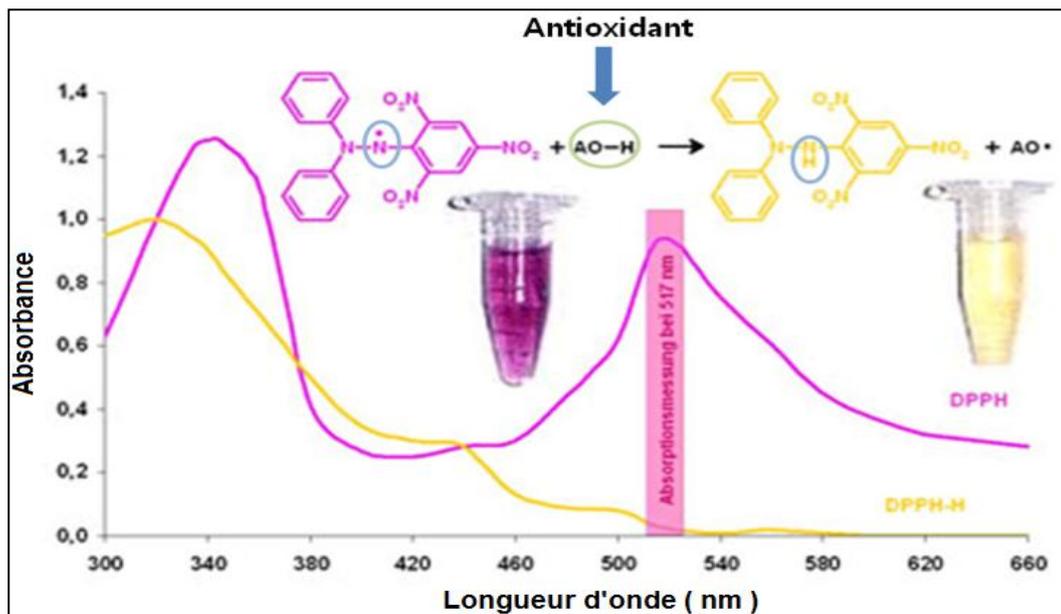
Une courbe d'étalonnage est réalisée par différentes concentrations de quercitine à partir d'une solution mère à 1mg/ml (dissout dans le MéOH). Cette courbe est réalisée dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons. La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg d'équivalent de la quercitine par g d'extrait. Elle représente la moyenne de 3 répétitions.

Le blanc est préparé en remplaçant la quantité de l'extrait méthanolique par l'eau distillée, dans les mêmes conditions.

#### 5.2.4 Potentiel antioxydant des extraits (test DPPH)

Pour évaluer l'activité antioxydante, nous avons utilisé la méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) selon le protocole décrit par (Sanchez-Moreno *et al.*, 1998)

Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en un composé jaune, le DPPH réduit, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Figure 24).



**Figure 24** : Structure du DPPH avec sa forme libre et réduite (Dangles et *al.*, 2000).

Cinquante microlitres de chaque solution méthanoïque des extraits à différentes concentrations sont ajoutés à 1,95 ml de la solution méthanoïque du DPPH à une concentration de  $6 \cdot 10^{-5}$  M / litre, qui équivaut à 23,66 mg / litre. En parallèle, un contrôle négatif est préparé en utilisant du méthanol pur.

Les dilutions de 50-100-150-200 et 250  $\mu$ g d'extrait/ml de méthanol sont réalisées à partir d'une solution mère de 2 mg d'extrait/ml de méthanol. Les essais sont réalisés en triplicata.

La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante (Blois, 1958).

Le pourcentage de réduction du radical libre DPPH est exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs_c - Abs_e) / Abs_c] \times 100$$

Abs<sub>c</sub> : Absorbance du contrôle

Abs<sub>e</sub> : Absorbance de l'échantillon testé.

Nos résultats ont été exprimés en tenant compte de la moyenne de trois mesures obtenues.

Pour chaque extrait nous avons déterminé la valeur IC<sub>50</sub> qui est la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH.

Les résultats peuvent être aussi exprimés en puissance antiradicalaire ARP (Brands-williams et *al.*, 1995).

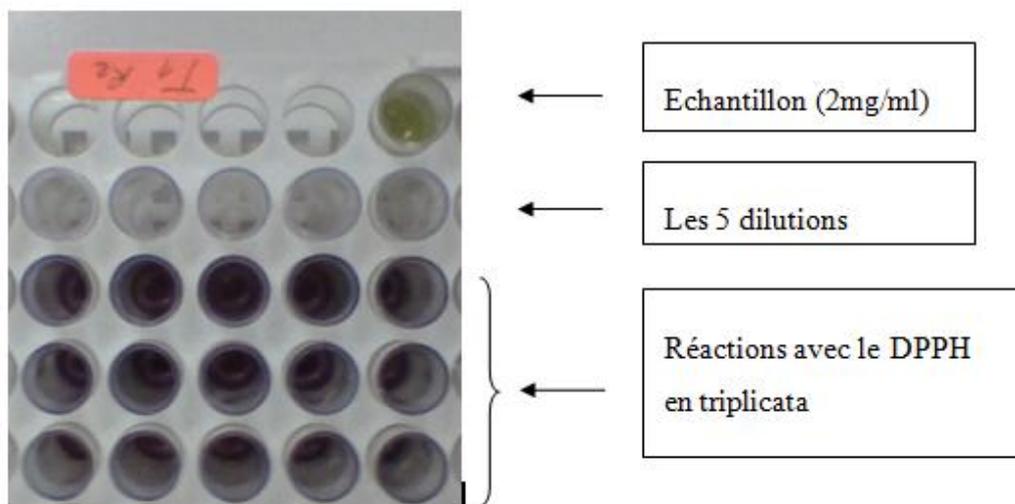
$$\text{ARP} = 1 / \text{IC}_{50}$$

ARP : Puissance anti radicalaire

IC<sub>50</sub>: Concentration de l'extrait nécessaire pour réduire à 50% la concentration initiale du radical DPPH.



**Photo 8** : Exemple de dilutions d'une solution méthanolique d'un extrait.



**Photo 9** : Exemple d'une plaque de tubes d'un échantillon, les dilutions et les réactions avec DPPH en triplicata.

### 5.2.5 Analyse statistique des résultats.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard (M $\pm$ ES) calculée sur la moyenne de quatre répétitions pour tous les paramètres mesurés :

- Contenu polyphénolique total CPT
- Contenu en flavonoïdes CF
- IC<sub>50</sub> du test DPPH

Les données expérimentales sont présentées sous forme de tableaux et d'histogrammes avec barres d'erreurs.

Les analyses de variances sont effectuées à l'aide du logiciel STATBOX 6.40 de Gimmersoft. L'Excel de Microsoft office 2007 est aussi utilisé pour quelques calculs comme l'estimation des IC<sub>50</sub> des extraits à partir de courbes de régressions du taux d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'échantillon mis en réaction.

# CHAPITRE VI

## RESULTATS & DISCUSSION

## **CHAPITRE 6: RESULTATS ET DISCUSSION**

Au terme de cette étude, nous analysons dans ce chapitre les résultats des paramètres mesurés qui se résument dans les contenus en polyphénols totaux (CPT), en flavonoïdes (CF), et le test antioxydant (test DPPH) des extraits méthanoliques exprimé par l'IC<sub>50</sub>.

Pour chaque paramètre mesuré, et pour les deux stades 1 et 2 étudiés, une Anova a été réalisée pour voir s'il y a une différence significative entre les différents traitements salins appliqués et voir si les facteurs exogènes non contrôlés ont eu un impact sur la variation des résultats de notre expérimentation.

- 1<sup>er</sup> stade : stade végétatif 45 jours après semis
- 2<sup>ème</sup> stade : stade de début floraison 70 jours après semis

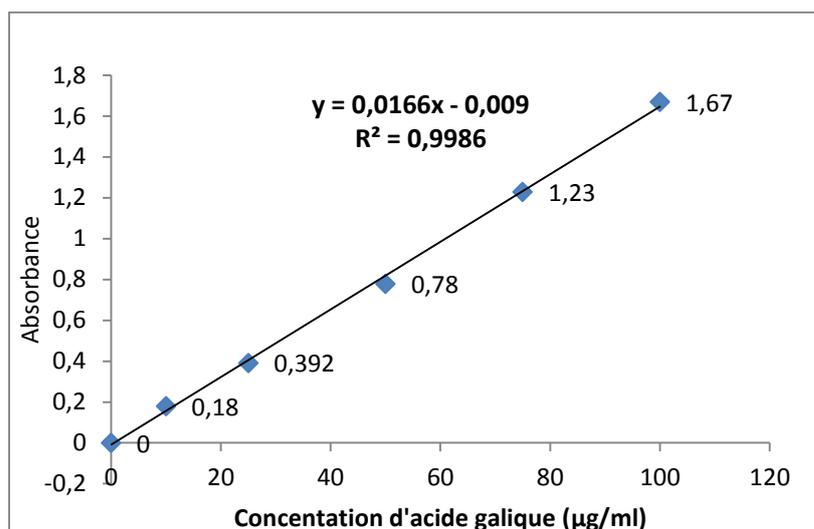
### **6.1 Résultats obtenus**

#### **6.1.1 Variation des contenus en polyphénols totaux (CPT) :**

La détermination de la teneur en polyphénols totaux des différents extraits méthanoliques a été réalisée selon la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu expliquée précédemment.

- i) La spectrophotométrie a permis de quantifier la teneur en polyphénols dans l'extrait méthanolique des parties aériennes des plantes. La concentration des solutions dosées est de 2 mg d'extrait brut/ml de méthanol. La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations dans du méthanol (Figure 25).

La teneur en polyphénols totaux de chaque extrait a été alors déterminée à partir de l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage ( $y = ax + b$ ) et exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait.



**Figure 25 :** Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux réalisée à l'aide de l'acide gallique

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent en acide gallique par gramme d'extrait méthanolique (mg EAG/g d'extrait) en fonction des traitements aux sels : T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> (concentrations en sels des solutions d'irrigation : 25, 50, 75 et 100 mM . L<sup>-1</sup>) et le T<sub>témoin</sub> pour les deux stades étudiés.

Les contenus en polyphénols totaux (CPT) des extraits méthanoliques issus des parties aériennes (tiges et feuilles) des plantes sont rapportés aux graphiques ci-après et bien détaillés aux tableaux insérés en annexe II. Les résultats sont exprimés en mg EAG/g d'extrait. Les valeurs représentent la moyenne des quatre répétitions (n=4) plus ou moins l'erreur standard (ES).

- **Pour le stade 1 (végétatif) :**

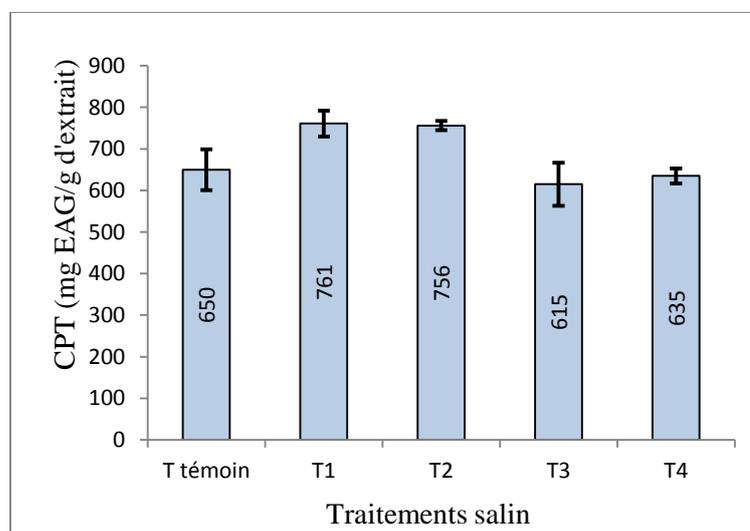
L'analyse statistique des résultats nous a révélé qu'il n'y a pas d'effet significatif du facteur étudié (concentration en sels des solutions nutritives) sur le paramètre polyphénols (Tableau 6). Autrement dit, la différence est non significative comparativement au témoin. (Test de Dunnett au risque  $\alpha$  de 5%).

**Tableau 5 :** Variation des CPT des extraits méthanoliques pour le stade 1

	Traitement salin	Concentration Sels (mM . L <sup>-1</sup> )	CPT Moyenne $\pm$ ES	Variation en %
<b>Stade 1</b>	<b>T<sub>témoin</sub></b>	00	650 $\pm$ 48 a	0
	<b>T<sub>1</sub></b>	25	761 $\pm$ 31 a	17
	<b>T<sub>2</sub></b>	50	756 $\pm$ 11 a	16
	<b>T<sub>3</sub></b>	75	615 $\pm$ 52 a	-5
	<b>T<sub>4</sub></b>	100	635 $\pm$ 17 a	-2

L'Anova présentée en annexe nous montre un coefficient de variation CV= 9.57% qui indique l'influence minimale d'effets d'hétérogénéité non liés au facteur étudié : salinité.

La Figure 26 qui illustre la variation de ce paramètre en fonction des traitements salins nous révèle que les CPT, pour ce stade 1, ont tendance à augmenter en T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> comparativement au témoin de valeur 650 ± 48 pour atteindre respectivement 761±31 et 756±11, mais c'est une différence jugée non significative. Aux traitements T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>, nous constatons une légère baisse mais demeure aussi non significative, et les CPT atteignent respectivement les valeurs de 615±52 et 635±17: des valeurs qui sont statistiquement égales à celle du témoin.



**Figure 26** : Variation des CPT des extraits méthanoliques du stade 1

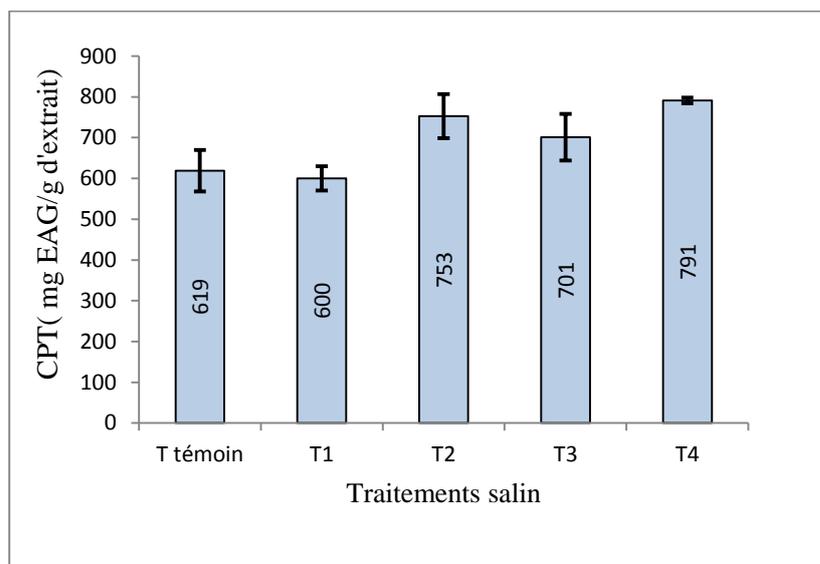
- **Pour le stade 2 (début de floraison)**

**Tableau 6** : Variation des CPT des extraits méthanoliques pour le stade 2

	Traitement salin	Concentration Sels (mM . L <sup>-1</sup> )	CPT Moyenne ±ES	Variation en %
<b>Stade 2</b>	<b>T<sub>témoin</sub></b>	00	619±51 a	0
	<b>T<sub>1</sub></b>	25	600±30 a	-3
	<b>T<sub>2</sub></b>	50	753±54 a	22
	<b>T<sub>3</sub></b>	75	701±57 a	13
	<b>T<sub>4</sub></b>	100	<b>791±7 b</b>	28

L'analyse statistique des résultats nous a révélé qu'il y a effet du facteur étudié (concentration en sels des solutions nutritives) sur le paramètre polyphénols. Avec un CV de 11,71%

La Figure 27 qui illustre la variation de ce paramètre nous montre une légère diminution du CPT au traitement T<sub>1</sub> (600±30) par rapport au témoin (619±51) mais elle est non significative. Les CPT enregistrent des augmentations aux T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> avec des valeurs respectives de (753±54), (701±57) et (791±7). La variation de la concentration au T<sub>4</sub> (28% par rapport au témoin) est considérée comme significative au seuil de risque ( $\alpha=5\%$ ) selon le test de Dunnett.

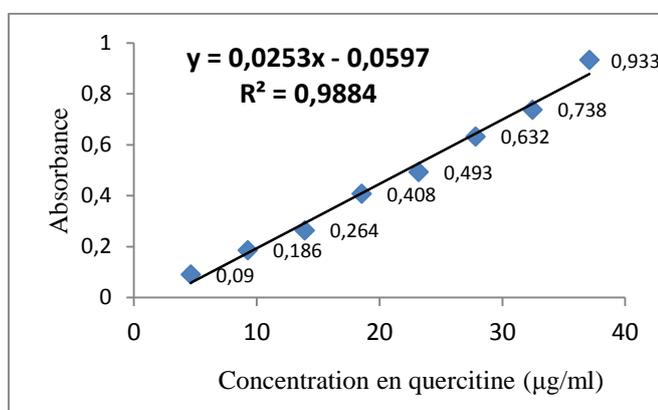


**Figure 27** : Variation des CPT des extraits méthanoliques du stade 2

D'une manière globale les CPT ont augmenté avec la croissance du taux de sels.

### 6.1.2 Variation des contenus en flavonoïdes (CF) :

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent quercitine par gramme d'extrait méthanolique brut (mg EQ/g d'extrait). Les valeurs représentent la moyenne des quatre répétitions (n=4) plus ou moins l'erreur standard (ES). Tous les résultats sont détaillés aux annexes. La figure 28 suivante montre la courbe d'étalonnage de la quercitine.



**Figure 28** : Courbe d'étalonnage des flavonoïdes réalisée à l'aide de la quercitine

- **Pour le stade 1 :**

L'Anova réalisée (annexe III) nous montre un coefficient de variation de 14.55% témoin de l'influence très minime des facteurs exogènes sur la variabilité des résultats.

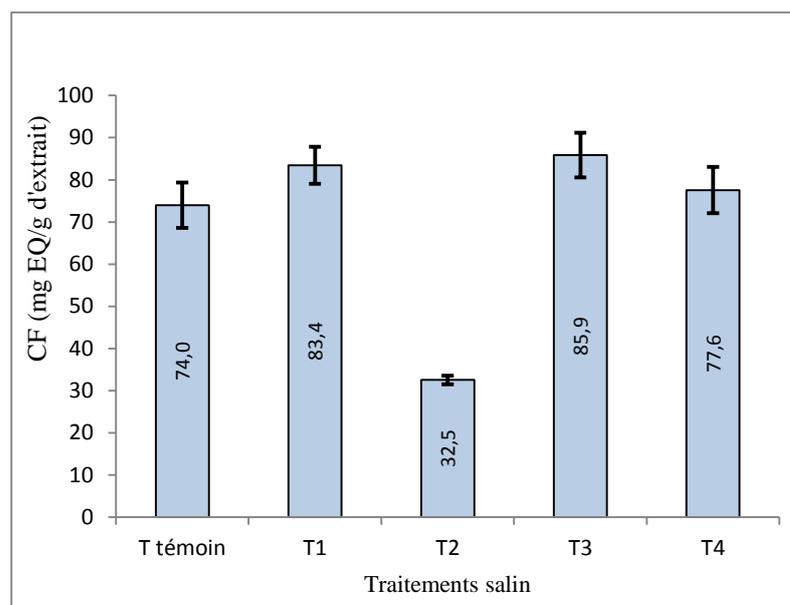
La comparaison des moyennes effectuée par rapport au témoin par le test de Dunnett nous a permis de déceler des différences significatives entre les traitements (Tableau 8).

**Tableau 7 :** Variation des CF des extraits méthanoliques pour le stade 1

	Traitement salin	Concentration Sels (mM . L <sup>-1</sup> )	CF Moyenne±ES	Variation en %
<b>Stade 1</b>	<b>T<sub>témoin</sub></b>	00	74±5,4 a	0
	<b>T<sub>1</sub></b>	25	83,4±4,4 a	13
	<b>T<sub>2</sub></b>	50	32,5±1 b	<b>-56</b>
	<b>T<sub>3</sub></b>	75	85,9±5,3 a	16
	<b>T<sub>4</sub></b>	100	77,6±5,5 a	5

Les contenus en flavonoïdes (CF) enregistrent une légère hausse insignifiante en T<sub>1</sub> 83,4±4,4, équivalente a +13% par rapport au témoin de valeur CF égale à 74±5,4.

Une baisse hautement significative du CF en T<sub>2</sub> atteignant la valeur minimale de 32,5±1 témoigne probablement du rôle des flavonoïdes comme substance métabolique utilisée prématurément : taux de sels de [25 mM . L<sup>-1</sup>] par les plantes pour faire face au stress salin. Il s'agit de l'un des mécanismes non enzymatiques de lutte contre le stress chez les plantes. En T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> les CF ont tendance à augmenter pour atteindre respectivement les concentrations de 85,9±5,3 et 77,6±5,5 mais demeurent statistiquement non différentes du CF du témoin (Figure 29). Cela nous laisse à penser de la possibilité d'intervention d'autres métabolites de défense contre le stress oxydatif généré par la salinité.



**Figure 30 :** Variation du contenu en flavonoïdes (CF) au stade 1.

- **Pour le stade 2 :**

Le début de la floraison des plantes en ce stade 2 ou le stress aux sels est appliqué explique probablement les valeurs globalement élevées des CF par rapport à ceux du stade 1.

Le contenu en flavonoïdes du témoin enregistre la valeur maximum de  $135,8 \pm 13,9$ . L'étude statistique nous montre un effet significatif du facteur taux de sels sur la variation de ce paramètre.

**Tableau 8 :** Variation des CF des extraits méthanoliques pour le stade 2

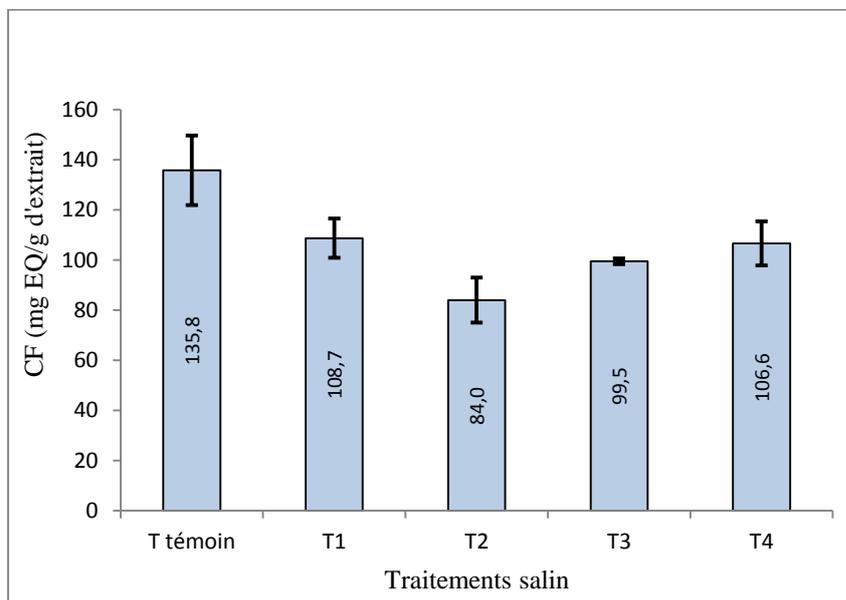
	Traitement	Concentration Sels ( $\text{mM} \cdot \text{L}^{-1}$ )	CF Moyenne $\pm$ ES	Variation en %
<b>Stade 2</b>	<b>T</b> témoin	00	$135,8 \pm 13,9$ a	0
	<b>T</b> <sub>1</sub>	25	$108,7 \pm 7,8$ a	-20
	<b>T</b> <sub>2</sub>	50	$84 \pm 9$ b	<b>-38</b>
	<b>T</b> <sub>3</sub>	75	$99 \pm 1,1$ b	<b>-27</b>
	<b>T</b> <sub>4</sub>	100	$106,6 \pm 8,7$ a	-22

ES : erreur standard (n=4).

Le coefficient de variation de 15.85 % indique l'influence négligeable de facteurs exogènes sur la variabilité de ce paramètre : contenu en flavonoïdes.

Globalement, les valeurs CF trouvées pour les traitements salins T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, et T<sub>4</sub> ont tous enregistré des diminutions par rapport au traitement témoin. Elles ont atteint respectivement  $108,7 \pm 7,8$ ;  $84 \pm 9$ ;  $99 \pm 1,1$  et  $106,6 \pm 8,7$ .

Par la comparaison des moyennes à l'aide du test de Dunnett au risque ( $\alpha=5\%$ ), les valeurs de T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> sont statistiquement inférieures au témoin. La valeur du CF au T<sub>2</sub> est au minimum avec 38% de réduction par rapport au témoin (Figure 31).



**Figure 31** : Variation du contenu en flavonoïdes (CF) au stade 2.

Cette réduction des CF, comme en stade 1, confirme leur utilisation par le métabolisme cellulaire lors de la défense non enzymatique contre le stress salin.

### 6.1.3 Variation du pouvoir antioxydant des extraits (test DPPH) :

Ce test nous renseigne comment les IC<sub>50</sub> des extraits méthanoliques varient en fonction du degré du traitement salin appliqué aux plantes de *Vicia faba* L.

Rappelant qu'IC<sub>50</sub> est la concentration de l'extrait méthanolique exprimé en µg/ml qui réduit 50% de la solution DPPH à une concentration bien déterminée (oxydant très fort).

Les résultats sont toujours exprimés par les moyennes des quatre répétitions plus ou moins les erreurs standards (ES) respectives. Les résultats détaillés sont reportés à l'annexe II.

#### - Pour le Stade 1 : végétatif

L'analyse de variance effectuée nous révèle qu'il y a effet du facteur étudié à savoir le taux de sels ajoutés aux solutions d'irrigation des plantes sur le pouvoir réducteur (antioxydant) des extraits méthanoliques des plantes de *Vicia faba* L.

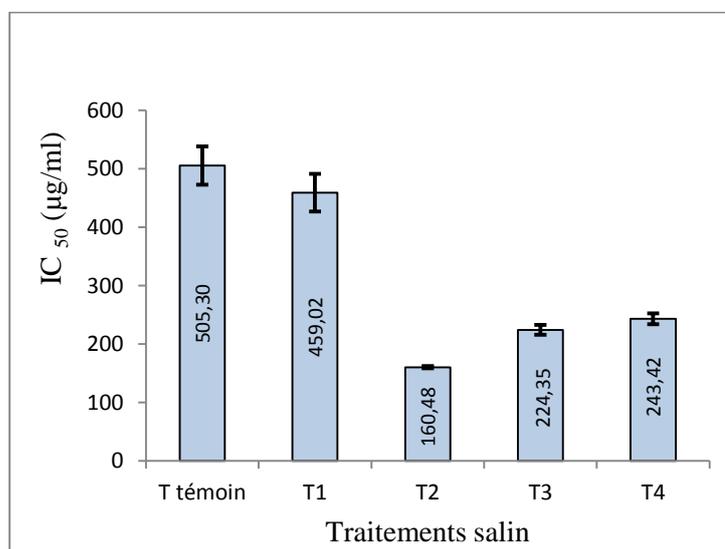
Le coefficient de variation de **13.06** montre l'influence négligeable des autres facteurs d'hétérogénéité sur les résultats de l'expérimentation.

En observant la variation des  $IC_{50}$  (Tableau 9 ; Figure 33), nous constatons que ceux-ci ont tendance à diminuer avec l'accroissement de la salinité, donc c'est le pouvoir antioxydant des extraits qui a augmenté.

**Tableau 9** : Variation des  $IC_{50}$  des extraits méthanoliques pour le stade 1 :

	Traitement	Concentration (mM . L <sup>-1</sup> )	$IC_{50}$	Variation en %
<b>Stade 1</b>	<b>T<sub>témoin</sub></b>	00	505,30 ±32,72 a	0
	<b>T<sub>1</sub></b>	25	459,02 ±32,10 a	-9
	<b>T<sub>2</sub></b>	50	<b>160,48 ±1,96 b</b>	-68
	<b>T<sub>3</sub></b>	75	<b>224,35 ±8,51 b</b>	-56
	<b>T<sub>4</sub></b>	100	<b>243,42 ±9.23 b</b>	-52

L' $IC_{50}$  commence à diminuer à T<sub>1</sub> et atteint la valeur de 459.02 µg/ml qui équivaut à 9% de diminution par rapport à celle du témoin de valeur 505.3 µg/ml. Les  $IC_{50}$  ont atteint en T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> respectivement les valeurs de 160.48 ; 224.35 et 243.42 µg/ml qui équivaut à des taux de diminution respectifs de 68% ; 56% et 52% par rapport au témoin. Ces valeurs sont statistiquement significatives par comparaison au témoin en utilisant le test de Dunnett avec un risque ( $\alpha=5\%$ ) (Figure 32).



**Figure 33** : Variation des  $IC_{50}$  des extraits en fonction de la salinité au stade 1

Ces diminutions de  $IC_{50}$  est synonyme de l'augmentation du pouvoir antioxydant des extraits avec l'élévation de la concentration en sels des solutions nutritives d'irrigation.

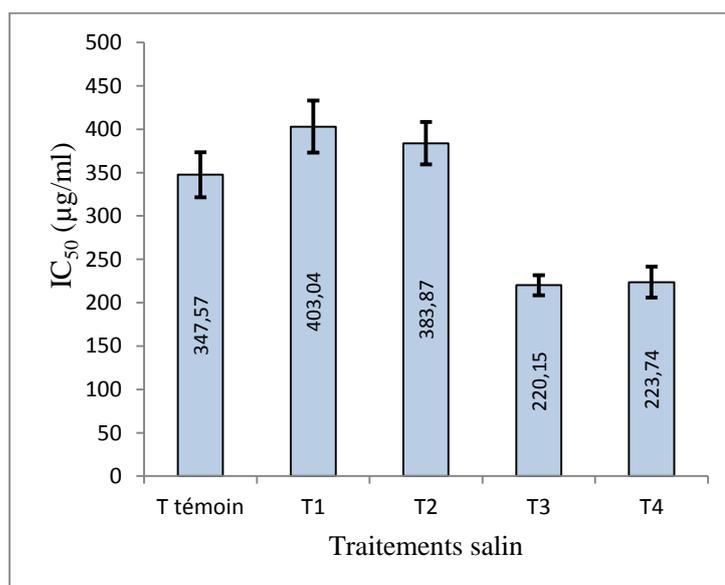
- **Pour le Stade 2** (début floraison).

L'analyse statistique nous montre l'effet significatif du facteur étudié sur le pouvoir antioxydant des extraits méthanoliques des plantes. Un coefficient de variation de 10,71% témoigne de l'influence négligeable des facteurs hexogènes sur les résultats de l'expérimentation.

Malgré la hausse minime des valeurs des  $IC_{50}$  en  $T_1$  et  $T_2$  par rapport à celle du traitement témoin de valeur 347,57  $\mu\text{g/ml}$  en atteignant respectivement 403,04 et 383,87  $\mu\text{g/ml}$ , des hausses non significatives statistiquement, on constate de nouveau leur diminution d'une manière significative aux traitements de forte salinité :  $T_3$  et  $T_4$  où l' $IC_{50}$  atteint les valeurs respectives de 220,15 et 223,74  $\mu\text{g/ml}$  qui équivaut à des diminutions de 37 et 36% (Tableau 12; Figure 34).

**Tableau 10** : Variation des  $IC_{50}$  des extraits méthanoliques pour le stade 2 :

	Traitement	Concentration (mM . L <sup>-1</sup> )	$IC_{50}$	Variation des $IC_{50}$ en %
<b>Stade 2</b>	<b>T témoin</b>	00	347,57 $\pm$ 25,96 <b>a</b>	0
	<b>T<sub>1</sub></b>	25	403,04 $\pm$ 29,85 <b>a</b>	16
	<b>T<sub>2</sub></b>	50	383,87 $\pm$ 24,62 <b>a</b>	10
	<b>T<sub>3</sub></b>	75	<b>220,15 <math>\pm</math>11,51 <b>b</b></b>	-37
	<b>T<sub>4</sub></b>	100	<b>223,74 <math>\pm</math>17,98 <b>b</b></b>	-36



**Figure 34** : Variation des  $IC_{50}$  des extraits en fonction de la salinité au stade 2

Cette baisse explique l'accroissement du pouvoir antioxydant des extraits avec l'augmentation du stress salin appliqué supérieur à 75 et 100 mM . L<sup>-1</sup>.

#### **6.1.4 Corrélation entre les paramètres mesurés (CPT, CF et IC<sub>50</sub>)**

Enfin, le test de corrélation deux à deux de *Pearson* à probabilité de risque  $\alpha = 0.05$  nous n'a révélé aucune corrélation entre les différents paramètres mesurés : les polyphénols, les flavonoïdes et les IC<sub>50</sub> des extraits méthanoliques. Cela suggère l'intervention d'autres métabolites secondaires dans le pouvoir antioxydant des plantes face au stress oxydant généré par la salinité.

## **6.2 Discussion**

Nous rappelons que l'objectif de notre présent travail est d'estimer l'effet du stress salin sur les plantes de fève *Vicia faba* L. provoqué par ajout des sels de chlorure de sodium (NaCl) et Chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>).

Le stress salin, comme il a été mentionné auparavant, entraîne une limitation de la photosynthèse, qui se traduit par une production excessive d'ROS. Pour s'adapter à ces conditions environnementales stressantes, les plantes induisent la synthèse de divers métabolites secondaires, comme par exemple les composés phénoliques.

Un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes leur sont attribués. Donc nous avons aussi évalué le pouvoir antioxydant des extraits par le test DPPH.

Après avoir exposé les divers résultats, nous essayons de comprendre la façon par laquelle les paramètres mesurés varient en réponse au degré de salinité et ce par comparaison avec les résultats d'autres auteurs ayant travaillé sur ce sujet.

### **6.2.1 Contenus en polyphénols totaux (CPT)**

Il faut rappeler que les plantes de fève étaient soumises aux traitements salins croissants par ajout de sels de NaCl et CaCl<sub>2</sub> à 50/50 variant de 25, 50, 75 et 100 mM . L<sup>-1</sup>.

Lors du stade1 végétatif, le contenu en polyphénols totaux augmente légèrement en basse salinité T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> puis diminue d'une manière insignifiante aux traitements T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>. Les CPT des extraits méthanoliques des plantes de *Vicia faba* L. varient donc d'une manière non significative avec l'augmentation du degré de salinité.

En effet, Télésinski et *al.* (2008) lors d'une étude sur l'effet de la salinité sur les plants de *Phaseolus vulgaris*, a signalé une baisse de la teneur en polyphénols avec la sévérité du stress salin. Dans une autre étude, une baisse des phénols a aussi été signalée par Rezazadeh et *al.* (2012) dans les feuilles d'artichauts soumis à la salinité mais pendant une durée de stress de 120 jours.

Dans l'essai réalisé en stade 2 : stade de début de reproduction des plantes de fèves, nous avons trouvé que les CPT enregistrent une augmentation aux T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et surtout à T<sub>4</sub> correspondant à 100 mM . L<sup>-1</sup> : le CPT atteint ainsi une valeur significative de 29% par rapport au témoin T.

Les résultats que nous avons constatés pour ce paramètre rejoignent ceux de (Yuan et *al.*, 2010) dans une étude sur des plantules de radis *Raphanus sativus* L. et ceux de (Mane et *al.*, 2011b) sur *Vetiveria zizanioides* L. ou ils ont trouvé que les contenus en polyphénols n'augmentent significativement que lorsque le taux de sels atteint 100 mM . L<sup>-1</sup>. Cette augmentation des polyphénols face à la salinité a été également signalée dans plusieurs études et chez diverses espèces de plantes. Cela témoigne de l'effet antioxydant de ces métabolites dans la lutte contre le stress oxydant généré par la salinité des sols et des eaux. Noreen et *al.* (2009) ont étudié l'effet de la salinité sur des cultivars de pois (*Pisum sativum*) cultivés sur sable et soumis à des niveaux de NaCl de 0, 40, 80 et 120 mM. Ces auteurs ont trouvé que les polyphénols totaux ont augmenté avec l'accroissement du niveau de sel. Mahmoudi et *al.* (2010) ont de leur côté trouvé une augmentation des phénols dans une étude sur la laitue romaine (*Lactuca sativa*) soumise au stress salin pendant 12 jours. Plusieurs autres auteurs ont constaté cette augmentation des CPT avec le degré du stress salin. On peut citer les études récentes de Dkhil et Denden (2010) sur le gombo (*Abelmoschus esculentus* L.) ; Tiwari et *al.* (2010) sur le concombre (*Cucumis sativus*) ; Baâtour et *al.* (2012) sur la marjolaine (*Origanum majorana* L.) ; Danai-Tambhale et *al.* (2011) sur le riz (*Oryza sativa*) ; Lepengue et *al.* (2012) sur le Maïs (*Zea mays* var. LG 60) ; Mishra et *al.* (2009) sur le pois chiche (*Cicer arietinum* L. CV. Abrodhi) ; Mane et *al.* (2010) sur *Cymbopogon nardus* ; Nouman et *al.* (2012) sur *Moringa oleifera* et bien d'autres.

A la lumière de nos résultats, ou le CPT n'augmente significativement qu'en degré de salinité élevé 100 mM . L<sup>-1</sup>, et pour bien comprendre les mécanismes de défense antioxydante utilisés par la plante mise à l'essai *Vicia faba* L, il est intéressant de prospecter l'intervention d'autres mécanismes de régulation du stress oxydatif généré comme les divers enzymes SOD, CAT et POD, les vitamines surtout le  $\alpha$  tocophérol (Vit E) et aussi la proline.

### 6.2.2 Contenus en flavonoïdes (CF)

A travers les résultats de nos dosages, nous avons signalé la diminution des flavonoïdes même aux bas taux de salinité avec des baisses significatives à T<sub>2</sub> pour le stade 1 et T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> pour le stade 2. Ce phénomène de diminution des flavonoïdes a été signalé par quelques auteurs tels : Frary et *al.* (2010) dans quelques lignées de tomates (*Solanum pennellii*) ; Lopez-Berenguer et *al.* (2009) dans le chou-fleur (*Brassica oleracea* L. var. *italica* cv. Marathon et Télésinski et *al.* (2008) dans les plants d'haricots (*Phaseolus vulgaris* L.). Aux fortes salinités 29 dS/m, Rezazadeh et *al.* (2012) a aussi constaté des diminutions dans les feuilles d'artichauts. D'un autre côté, dans plusieurs études il a été signalé que les flavonoïdes augmentent par l'accentuation du stress salin : Mahmoudi et *al.*, (2010) sur *Lactuca sativa* L. mais après seulement aux taux de NaCl supérieurs à 100 mM . L<sup>-1</sup> de NaCl appliqué pendant 12 jours, Frary et *al.*, (2010) sur quelques lignées de tomate (*Solanum pennellii*) pendant 21 jours,

Vu que la variation de ce paramètre demeure ambiguë d'une espèce à une autre et même d'une variété à une autre il serait intéressant d'approfondir les analyses et déterminer la variation par sous classes de flavonoïdes et aussi effectuer les dosages sur les différentes parties de la plante (feuilles tiges et racines) séparément.

### 6.2.3 Potentiel antioxydant (test DPPH)

Le test DPPH effectué aux extraits méthanoliques des parties aériennes des plantes nous a révélé que le potentiel antioxydant devient plus élevé avec l'augmentation de la concentration en sels. En stade 1, Les IC<sub>50</sub> ont atteint en T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> des taux de diminution significatifs respectivement de 68% ; 56% et 52% par rapport au témoin. Au stade 2, la diminution des IC<sub>50</sub> est significative aux traitements de forte salinité : T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> ou leur taux de diminution a atteint 37 et 36% respectivement. Cette baisse explique l'accroissement du pouvoir antioxydant des extraits avec l'augmentation du stress salin appliqué supérieur à 75 et 100 mM . L<sup>-1</sup>.

Cette augmentation du potentiel antioxydant peut, d'une part, être expliquée par les polyphénols totaux. Mais vu l'absence de corrélation avec l'augmentation des CPT, nous pensons à l'intervention d'autres métabolites secondaires dans le pouvoir antioxydant des plantes face au stress oxydant généré par la salinité. Comme signalé en bibliographie par plusieurs auteurs, les effets toxiques des ROS sont contrecarrés par des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques incluant la superoxyde dismutase (SOD), la catalase

(CAT), ascorbate peroxidase (APX), glutathione reductase (GR), ascorbic acid (AsA), tocopherol, phenols, etc. (Ashraf, 2009 ; Ahmad and Prasad, 2012a et Ahmad and Prasad, 2012b).

Toutefois les polyphénols jouent donc, malgré tout, un rôle important dans le système de détoxification des ROS, qui causent le stress oxydant chez les plantes stressées par les taux élevés du sel. Cependant, il est indispensable de savoir le rôle joué par les autres composants du système antioxydant chez les plantes face au stress salin.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au terme de cette présente étude sur l'évaluation du potentiel antioxydant des polyphénols chez la fève (*Vicia faba* L.) stressé par des solutions nutritives enrichies avec un mélange de NaCl et CaCl<sub>2</sub> nous pouvons déduire les points principaux suivants.

Les contenus en polyphenols totaux augmentent avec le taux de salinité.

- Au stade 1, les CPT augmentent en T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> mais d'une manière non significative et restent stables pour T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub>.
- Au stade 2, ils augmentent en T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> et surtout en T<sub>4</sub> ou ils enregistrent une valeur maximale et significative de **791±7**; une hausse de (+**28%**) par rapport au témoin de valeur **619±51** mg EAG/g d'extrait.

Généralement les flavonoïdes enregistrent une baisse avec l'augmentation de la salinité surtout à partir du traitement T<sub>2</sub> de 50 mM/l. de sels.

- Au stade 1, à T<sub>2</sub> leur contenu CF atteint **-56% (32,5±1)** de réduction par rapport au témoin (**74±5,4**). Une valeur hautement significative.
- Au stade 2 leur baisse commence à partir de T<sub>1</sub> et continue d'une manière significative en T<sub>2</sub> et T<sub>3</sub> avec des taux de réduction respectifs de **-38% et -27%** (84±9 et 99±1,1mg EQ/g d'extrait.)

Le potentiel antioxydant des extraits augmente avec le degré de salinité comme cela est mis en évidence par la baisse des IC<sub>50</sub>.

- Au stade 1, la réduction de l'IC<sub>50</sub> commence à partir de T<sub>1</sub> et s'accroît en T<sub>2</sub> (**68%** de réduction par rapport au témoin) puis reste plus au moins stable en T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> avec respectivement **56% et 52%** de réduction.
- Au stade 2, la réduction n'apparaît qu'à partir de T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> avec respectivement **37% et 36%** de réduction par rapport à T témoin. Cela pourrait être expliqué par le besoin des plantes pour les flavonoïdes généralement abondants dans les fleurs.

L'absence de corrélation entre ces paramètres mesurés laisse à penser à une influence d'autres métabolites secondaires dans le mécanisme de défense non enzymatique des plants de *Vicia faba* L. en plus des divers processus enzymatique que les plantes emploient pour neutraliser l'effet délétère des ROS générées par la salinité et qui provoquent le stress oxydant.

Dans la perspective de savoir le rôle joué par les autres composants du système antioxydant chez les plantes en face du stress salin, et pour bien approfondir cette étude sur *Vicia faba* L, il serait intéressant d'élargir l'investigation à d'autres méthodes d'analyse et aux autres marqueurs de stress oxydatif (dosage des malondialdéhydes ; MDA , dosage des différents enzymes antioxydants, ou le dosage des vitamines). Pour l'évaluation du pouvoir antioxydant, en plus du test DPPH il serait intéressant d'effectuer d'autres tests comme ABTS et TRAP.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdel L., 2008. Effect of seed size and plant spacing on yield and yield components of Faba bean (*Vicia faba* L.) *Res. J Agric. Biolog. Sci.*, pp. 146-148.
- Agati G., Azzarello E., Polastri S., & Tatini M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. (Elsevier, Éd.) *Plant Science* (196), pp. 67-76.
- Ahmad P. & Jhon R., 2005. Effect of Salt stress on growth and biochemical parameters of *Pisum sativum* L. *Arch Agro Soil Sci*, 51(6), pp. 665–672 .
- Ahmad P. & Prasad M., 2012a . Environmental adaptations and stress tolerance in plants in the era of climate change. *Media, Springer Science*. New York. 657p.
- Ahmad P., & Prasad M., 2012b. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. (*S. Media, Éd.*) New York. 547p.
- Ahmad P. & Sharma S., 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants. *Plant Soil Environ*, 54 (3), pp. 89-99.
- Ahmad P., Sharma S. & Srivastava P., 2006. Differential physio-biochemical responses of high yielding varieties of Mulberry (*Morus alba*) under alkalinity ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) stress *in vitro* . *Physiol Mol Biol Plants*, 12(1), pp. 59-66.
- Allen G.J., Wyn Jones R.G. & Leigh R.A., 1995. Sodium transport in plasma membrane vesicles isolated from wheat genotypes differing in  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  discrimination traits. *Plant, Cell Environment* (18), pp. 105-115.
- Amede T. & Schubert S., 2003. Mechanisms of drought resistance in grain legumes. Osmotic adjustment. *Ethiop. J. Sci.*(26), pp. 37-46.
- Apel k. & Hirt H., 2004 . Reactive Oxygen Species : Metabolism, Oxidative Stress, and Signal transduction. *Annu. rev. plant biol.*, 55, pp. 373-399.
- Asada K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.
- Asada K., 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* (141), pp. 391–396.
- Ashraf M., 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv* (27), pp. 84–93.
- Ashraf M. & Foolad M.R., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, 59(2), pp. 206-216.
- Baâtour O., Tarchoun I., Nasri N., Kaddour R., Harrathi J., Drawi E., Lachaâl M., 2012. Effect of growth stages on phenolics content and antioxidant activities of shoots in sweet marjoram (*Origanum majorana* L.) varieties under salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 11(99), pp. 16486-16493.
- Belkhodja M. & Benkabilia M., 2000. Proline response of faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Egypt. J.of Agric.Res.*, 78 (1), pp. 185-195.
- Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*(181), pp. 1199- 1200.
- Brands-williams W., Cuvelier M. & Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *lebensm-Wiss.Technol.*(18), pp. 25-30.
- Bronner W.E., 1995. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grape fruit juice concentrates. *J. Chromatog.*(705), pp. 247-256.
- Bruneton J., 1993. Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales. Paris: *Ed. Tec & Doc-Lavoisier*. 698p.

- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales (3<sup>ème</sup> édition). Paris: *Ed. Tec&doc*. 456p.
- Brunetti C., Di Ferdinando M., Fini A., Pollastri S. & Tattini M., 2013. Flavonoids as Antioxidants and Developmental Regulators: Relative Significance in Plants and Humans. *International Journal of molecular sciences* (14), pp. 3540-3555.
- Calu G., 2006. Effet du stress salin sur les plantes. Comparaison entre deux plantes modèles : *Arabidopsis thaliana* et *Thellungiella halophila*. Master 1, Recherche biotechnologie : du gène à la molécule, *SpectroSciences*, (article 23), p. 10pp.
- Carillo P., Annunziata M.G., Pontecorvo G., Fuggi A. & Woodrow P., 2011. Salinity Stress and Salt Tolerance. In: Shankar and A. Kumar, *Abiotic stress in Plants-Mechanisms and Adaptations* pp. 21-38. InTech Ed.
- Cashman P., Kumar A. and Bandhu A., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. . *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60, pp. 324-349.
- Chen T. and Murata N., 2011. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* (34), pp. 1-20.
- Cheyrier V.C., Giles D. and Kevin M.L., 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry* (n° xxx), pp. 1-20.
- Chinnusamy V., Jagendorf A. & Zhu J.K., 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*(45), pp. 437-448.
- Cronquist A., 1981. Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press, NY. 1262 cited by W.R. Anderson. *Brittonia*, 34 (2), pp. 268-270.
- Crozier A., Jaganath I. & Clifford M., 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. H. Ashihara, M. Clifford, A. Crozier, I. Jaganath, & M. Clifford (Éds.), *Plant secondary metabolites: occurrence and role in the human diet* pp.. *Ed. blackwell*. Pp 1-24.
- Danai-Tambhale S., Kumar V. & Shriram V., 2011. Differential Response of Two Scented Indica Rice (*Oryza sativa*) Cultivars under Salt Stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 7(4), pp. 387-397.
- Dangles O., Fargeix G., & Dufour C., 2000. Antioxidant properties of anthocyanins and tannins: a mechanistic investigation with catechin and the 3,4, 7-trihydroxyfl avylum ion. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions* (2), pp. 1653–1663.
- Delauney A. & Verma D., 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*(4), pp. 215-223.
- Demidchik V., 2012. Reactive oxygen species and oxidative stress in plants. In S. Shabala, *Plant stress physiology*. CAB international.
- Di Ferdinando M., Brunetti C., Agati G. & Massimiliano T., 2013. Multiple functions of polyphenols in plants inhabiting unfavorable mediterranean areas. *Environmental and experimental botany*. 10 pages.
- Diamant S., Eliahu N., Rosenthal D. & Goloubino P., 2001. Chemical chaperones regulate molecular chaperones *in vitro* and in cells under combined salt and heat stresses. *J Biol Chem* (276).
- Dkhil B. & Denden M., 2010. Salt stress induced changes in germination, sugars, starch and enzyme of carbohydrate metabolism in *Abelmoschus esculentus* L. (Moench.) seeds. *Afr J Agric Res*(5), pp. 1412–1418.
- Douaoui T., & Hartani A., 2008. Impact de l'irrigation par les eaux souterraines sur la dégradation des sols de la plaine du Bas-Chéliff . Dans M. Kuper, A. Zairi. 3<sup>ème</sup> atelier régional du projet Sirma, Jun 2007, Nabeul,, Tunisia. Cirad, 5 p., 2008. <cirad-00259785>
- Dupont F. et Guignard J., 2007. Abrégé de Botanique (14<sup>ème</sup> éd.). *Editions Masson*, 479p.
- Essah P.A., 2000. Sodium Transport in *Arabidopsis thaliana*. Master of Philosophy. Department of Plant Sciences and Pembroke. Cambridge. 120p.

- Fipps G., 2003. Irrigation Water Quality Standards and Salinity Management Strategies. *Texas A&M AgriLife Extension*, B1667 4-03, 17pages. (<http://agrillifebookstore.org>).
- Floss H., 1997. Natural products derived from unusual variants of the shikimate pathway. *Natural Product Reports* (14), pp. 433-434.
- Foltete A.S., 2010. Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués. *Thèse Doct.* Université Paul Verlaine – Metz. 189 pages.
- Frary A., Göl D., Keleş D., Ökmen B., Pinar H., Şığva H. Ö., Doğanlar S., 2010. Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*, 10 (58).
- Fryer M.J., 1992. The antioxidant effect of thylakoid vitamin-E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant, Cell and Environment*, 15(4), pp. 381–392.
- Gallais A. & Bannerot H., 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. Paris: INRA. 134p.
- Gardès-Albert M., Bonnefont-Rousselot D., Abedinzadeh Z., & Jore D., 2003. Espèces réactives de l'oxygène Comment l'oxygène peut-il devenir toxique? Mécanismes biochimiques, *l'actualité chimique* : 91-97.
- Gasim S., & Link W., 2007. Agronomic performance and the effect of soil fertilization on German winter faba bean. *J. Central Eur. Agric.*(8), pp. 121-127.
- Ghedira K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother.*(3), pp. 162-169.
- Gill S., & Tuteja N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* (48), pp. 909-930.
- Greenway H. & Munns R., 1980. Mechanism of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* (3), pp. 149-190.
- Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P., 2008. Le stress oxydant, *Rev Med Liege*; 62 : 10 : 628-638.
- Halitim A., 1973- Etude expérimentale de l'amélioration des sols sodiques d'Algérie en vue de leur mise en culture. Thèse Doct. 3<sup>ème</sup> cycle, Univ. Rennes, 176p.
- Hamdoon A.M., Salmin K.A., & Awad G.A., 2013. Antioxidant and Quantitative Estimation of Phenolic and Flavonoids of Three Halophytic Plants Growing in Libya. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol 2 (3), pp. 89-94.
- Harborne J., 1997. Phytochemistry of fruits and vegetables: An ecological overview. (O.U. Press, Éd.) In: Thomas-Barberan F. (ed) *Phytochemistry of Fruits and Vegetables.*, pp. 353-367.
- Hasegawa P., Bressan R., Zhu J., & Bohnert H., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant molecular biology* (51), pp. 463-499.
- Havsteen B.H., 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. (E.S. Inc, Éd.) *Pharmacology & Therapeutics* (96), pp. 67–202.
- Heilerova L., Buckova M., Silhar S., & Labuda J., 2003. Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.), thyme (*Thymus vulgaris* L.) and agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by conventional methods and the DNA-based biosynthesis. *Czech J. Food Sci.*(21), pp. 78-84.
- Hoffmann L., Besseau S., Geoffroy P., Ritzenthaler C., Meyer D., Lapierre C., Legrand M., 2004. Silencing of hydroxycinnamoyl coenzyme A shikimate / quinate hydroxycinnamoyl transferase affects phenylpropanoid biosynthesis. *Plant cell.*, 16(6), pp. 1446- 1465.
- INSID-Algerie., 2008. Le point sur la salinité des sols dans les périmètres irrigués : Risques et Recommandations. (Cas du périmètre irrigué du Bas Cheliff), 1-16p.
- Ivanov B and Khorobrykh S., 2003. Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species. *Anlioxid Redox Signal* 5: 43-53.

- Jabnour M., 2008. Adaptation des plantes au stress salin : caractérisation de transporteurs de sodium et de potassium de la famille HKT chez le riz. *Thèse Doct.* Montpellier Supagro. France. 127 p.
- James D., Hanks R. & Jurinak J., 1982. *Modern Irrigated Soils*. New York.: *John Wiley & Sons*. 198p.
- Jean-Jacques. M., Annie. F., Christian J., 2005. Les composés phénoliques des végétaux ; un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Allemand. *Presse Polytechniques et Universitaires*. Romandes. 192 p.
- Jiménez A., Hernández J. A., Del Rio L.A. & Sevilla F., 1997. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology*, 114(1), pp. 275–284.
- Katerji N., Mastrorilli M., Lahmer F., Maalouf F. & Oweis T., 2011. Faba bean productivity in saline–drought conditions. *Europ. J. Agronomy* (35), pp. 2-12.
- Katerji N., Van Hoorn J., Hamdy A., & Mastrorilli M., 2000. Salt tolerance classification of crops to soil salinity and to water stress day index. *Agric. Water Manage* (43), pp. 99-109.
- Kaya C., Tuna A., & Yokas I., 2009. The role of plant hormones in plants under salinity stress. *Book salinity and water stress* (44), pp. 45-50.
- Kessiran M., 2003. Gestion de l'irrigation dans le milieu salin. *Recueil des communications des journées techniques et scientifiques sur la qualité des eaux du Sud. Volume III*, El-Oued les 19 et 20 mai 2003.
- Khan H., Paull J., Siddique K. & Stoddard F., 2010. Faba bean breeding for drought-affected environments: a physiological and agronomic perspective. *Field Crop Res.*, 115(3), pp. 279-286.
- Khan M.K., 2010. Polyphénols d'Agrumes (flavonones): Extraction de glycosides de la peau d'orange, synthèse de métabolites chez l'homme (glucuronides) et étude physico-chimique de leur interaction avec la sérum albumine. *Thèse de doctorat*. Université d'Avignon. France. 161 pages
- Khoddami A., Wilkes M.A., & Roberts T.H., 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. a review. *Molecules* (18), pp. 2328-2375.
- Kiarostami K., Mohseni R. & Saboor A., 2010. Biochemical changes of *Rosmarinus officinalis* under salt stress. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, Vol. 6 (3), pp. 114-122.
- Kim D., Jeong S. & Lee C.Y., 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* (81), pp. 321–326.
- Koyr H., Ahmad P. & Geissler N., 2012. Abiotic stress responses in plants: an overview. *In: P. Ahmad, Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Springer Science + Business Media*. New York, pp. 1-28.
- Krieger-Liszkay A., Fufezan C. & Trebst A., 2008. Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynthesis Res.*(98), pp. 551-564.
- Ksouri R., Megdiche W., Debez A., Falleh H., Grignon C. & Abdelly C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, pp. 244-249.
- Ksouri R., Megdiche W., Falleh H., Trabelsi N., Boulaaba M., Smaoui A. & Abdelly C., 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of tunisian halophytes. *comptes rendus BIOLOGIES* (331), pp. 865-873.
- Lahlou M., Badraoui M. & Soudi B., 2000. Modélisation de l'évolution de la salinité et de l'alcalinité dans les sols irrigués. *Séminaire : 'Intensification agricole et qualité des sols et des eaux'*, Rabat, 2-3 Novembre.
- Lefevre I., & Lutts S., 2000. Effects of salt and osmotic stress on free polyamine accumulation in moderately salt resistant rice cultivar AIW 4. *Int Rice Res Note* (25), pp. 36-37.
- Legros J.P., 2009. La salinisation des terres dans le monde. Académie des Sciences et Lettres de Montpellier., *Conférence, Bulletin* (40), pp. 257-269.

- Lepengue A.N., Mouaraga I., Ibrahim B. Ake S. & M'batchi B., 2012. Réponse du maïs (*Zea mays* var.LG 60) au stress salin : étude de la synthèse de quelques composés biochimiques. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 14(Issue 1), pp. 1866-1872.
- Levigner A., Lopez F., Varisuyt G., Berthomien P. & Casse-Delbar T., 1995. Les plantes face au stress salin. *Cahier d'agriculture* (4), pp. 263-273.
- Li H., Cheng K., Wong C., Fan K., Chen F. & Tian Y., 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. *Food Chemistry* (102), pp. 771-776.
- Li P., Huo L., Su W., Lu R., & Deng C., 2011. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity and phenolic content of *Pouzolzia zeylanica*. *Journal of the serbian chemical society*, pp. 709-717.
- Li Y., Zhou Y., Wang Z., Sun X. and Tang K., 2010. Engineering tocopherol biosynthetic pathway in Arabidopsis leaves and its effect on antioxidant metabolism, *Plant Science*, vol. 178, N°3, pp. 312–320.
- Lim J.H., Park K.J., Kim B.K., Jeong J.W. & Kim H.J., 2012. Effect of salinity stress on phenolic compounds and carotenoids in buckWheat (*Fagopyrum esculentum* M.) sprout. *Food Chemistry* (135), pp. 1065-1070.
- Link W., Hanafy M., Malenice N., Jacobsen H.J. & Jelenic S., 2008. Faba bean. Compendium of transgenic crop plants: Transgenic legume Grains and forages. (C.K. Hall, Éd.) pp. 72-88.
- Lister H., 2006. Health Attributes of legumes, *Crop & Food Research Report 1745 No. 1520*
- Logan B., 2005. Reactive oxygen species and photosynthesis. In: N. Smirnoff, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plant, *Oxford Ed. Blackwell*. pp. 250–67..
- Lopez-Berenguer C., Del-Carmen M., Martinez-Ballesta C., Moreno D., Carvajal M., & Garcia-Viguera C., 2009. Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli. *J Agric Food Chem* (57), pp. 572–578.
- Maas E. & Hoffman G., 1977. Crop salt tolerance, current assessment. *J. Irrig. Drain. Div. ASCE* (103), pp. 115-134.
- Maatougui M., 1996. Situation de la culture des fèves en Algérie et perspectives de relance. *Rev. Céréales*(29), pp. 6-14.
- Mahmoudi H., Huang J., Gruber M., Kaddour R., Lachaal M., Ouerghi Z. & Hannoufa A., 2010. The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *J. Agric Food Chem* (58), pp. 5122–5130.
- Mane A.V., Karadge B.A. & Samant J. S., 2010. Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon Nardus* (L.) Rendle. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(3), pp. 338-347.
- Mane A., Deshpande T., Wagh V., Karadge B. & Samant J., 2011a. A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(06), pp. 1192-1216.
- Mane A., Saratale G.D., Karadge B. & Samant J., 2011b. Studies on the effects of salinity on growth, polyphenol content and photosynthetic response in *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. *Emir. J. Food Agric.*, 23(1), pp. 59-70.
- Mansour M., 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol Plant* (43), pp. 491–500 .
- Matkowski A., 2006. Plant Phenolic Metabolites as Antioxidants and Mutagenesis Inhibitors. In: B. Yaroslav, D. J. Durzan & P. Smertenko (Éds.), Cell Biology and Instrumentation: UV Radiation, Nitric Oxide and Cell Death in Plants. IOS Press. pp129-148.
- Mc Neil S., Nuccio M. & Hanson A., 1999. Betaines and related smoprotectants: targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.*(120), pp. 945–949 .

- Mermoud A., 2006. Maitrise de la salinité : Cours de physique du sol. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne. p. 15 pages.
- Miliauskas G., & Van Beek T.n 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* (85), pp. 231-237.
- Miller G.A., Suzuki N., Ciftci-Yilmaz S. & Mittler R.O., 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), pp. 453-467.
- Miller G., Shulaev V. & Mittler R., 2008. Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiologia Plantarum*, 133(3), pp. 481-489.
- Mishra M., Mishra P.K., Kumar U. & Prakash V., 2009. NaCl Phytotoxicity Induces Oxidative Stress and Response of Antioxidant Systems in *Cicer arietinum* L. CV. Abrodhi. *Botany Research International*, 2(2), pp. 74-82.
- Mishra P., Bhoomika K. & Dubey R.S., 2013. Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Protoplasma*, 250 (issue 1), pp. 3-19.
- Mittal R., 1991. Behaviour of peroxidases in rice: changes in enzymatic activity and isoforms in relation to salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 29(1), pp. 31-40.
- Mittler R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7( 9), pp. 405-410.
- Munns R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & environment*, 25(2), pp. 239-250.
- Munns R. & Tester M., 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*(59), pp. 651-681.
- Mwengi J.E., 2011. Faba Bean Growth Response To Soil Temperature and nitrogen. Master of science in soil science. Washington State University. 60 pages
- Nahon D., 2008. L'épuisement de la Terre. L'enjeu du XXIème siècle. *Odile Jacob Edition*. Paris, 231p.
- Navarro J., Folres P., Garrido C., & Martinez V., 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem* (96), pp. 66-73.
- Noreen Z. & Ashraf M., 2009. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. (*Elsevier, Éd.*) *Journal of plant physiology* (166), pp. 1764-1774.
- Nouma, W., Siddiqui M., Basra S., Khan R., Gull T., Olson M. & Munir H., 2012. Response of *Moringa oleifera* to saline conditions. *Int. J. Agric. Biol.*(14), pp. 757-762.
- Nourimand M., Mohsenzadeh S., & Silva J.A., 2012. Physiological responses of fennel seedling to four environmental stresses. *Iranian Journal of Science & Technology* (A1), pp. 37-46.
- Pallavi S., Bhushan J.A., Dubey R.S. & Pessarakli M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, p. 26.
- Parida A.K. and Das A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (60), pp. 324-349.
- Parvaiz A., Jaleel C.A., Azzouz M. and Nabi G., 2009. Generation of ROS and non-enzymatic Antioxidants During Abiotic Stress in Plants. *Botany Research International*, 2 (N°1), pp. 11-20.
- Pelmont J., 1995. Enzymes, catalyseurs du monde vivant. *Presses universitaires de grenoble*. France, 1039p.
- Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S. and Vianello A., 2013. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci.*(14), pp. 14950-14973.

- Popovici C., Saykova I. and Tylkowski B., 2009 . Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel* (4), pp. 25-39.
- Rajan K., Singh A. and Pandey A., 2012 . Faba bean soils and their management for higher productivity In: Faba Bean (*Vicia faba* L.): A potential leguminous crop of India. (R. f. ICAR, Éd.) pp. 205-212.
- Rania A.A., 2007. Complexation des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier : Propriétés technologiques des coagulums obtenus. *Thèse Doctorat*, Univ. Paris. 209p.
- Räsänen L.A., 2002 . Biotic and abiotic factors influencing the development of N<sub>2</sub>-fixing symbioses between rhizobia and the woody legumes *Acacia* and *Prosopis*. Academic dissertation in microbiology. *Thesis.* Helsinki. 80 pages.
- Rasool S., Hameed A., Azooz M.M., Muneeb-u-Rehman O., and Ahmad P., 2013 . Salt Stress: Causes, Types and Responses of Plants. In: P. Ahmad (2013), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*. Springer Science Business Media. pp 1-24
- Reinli K. and Block G., 1996 . Phytoestrogen content of foods –A compendium of literature values. *Nutr. Cancer*(26), pp. 123–148.
- Remy C., Manach C., Texier O. and Regeat F., 1996 . Intérêt nutritionnel des flavonoïdes. *Med. Nutr.*(32), pp. 17-27.
- Rezazadeh A., Ghasemnezhad A., Barani M. & Telmadarrehei T., 2012 . Effect of salinity on phenolic composition and antioxidant activity of artichoke (*Cynaria scolymus* L.) leaves. *Research Journal of Medicinal Plant*, pp 1-8.
- Rhodes D., Rich P., Brunk D., Ju G., Rhodes J., Pauly M. & Hansen L., 1989 . Development of two isogenic sweet corn hybrids differing for glycinebetaine content. *Plant Physiol* (91). pp 1112–1121
- Rice-Evans C., Miller N. & Paganda G., 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical Biology and Medicine* (20), pp. 933-956.
- Rozeff N., 1995. Sugarcane and salinity – A review paper. *Sugarcane* (5), pp. 8-19.
- Sanchez-Moreno C., Larrauri J. & Saura-calixto F., 1998 . A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal Sci. Technology International* (8), pp. 121-137.
- Setayesh M.Z., khajeh H., Bahabadi S.E. & Sabbagh S.K., 2012 . Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress. (V. Publications, Éd.) *International journal of Agronomy and Plant Production*, 3, pp. 710-715.
- Shabala S. & Rana M., 2012 . Salinity stress: physiological constraints and adaptive Mechanisms. In: S. Shabala, *Plant stress physiology*. pp. 59-93. CAB International.
- Shahidi F., Janitha P. & Wanasundara P., 1992. Phenolic antioxidants, Critical Reviews. *Food Science and Nutrition* (32), pp. 67-102.
- Sharma P., Jha Ambuj B., Dubey Rama S. & Pessarakli M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, a review. *Journal of Botany*, volume 2012, 26 pages.
- Sharma P., Jha A.B. & Dubey R.S., 2011 . Oxidative Stress and Antioxidative Defense Systems in Plants Growing under Abiotic Stresses. In: M. Pessarakli, *Hand of plant and crop stress* (3<sup>rd</sup> edition). Taylor and Francis Group. 1194 pages.
- Singh A., Chandra N., Bharati R. & Dimree S., 2010 . Effect of seed size and seeding depth on Fava bean (*Vicia faba* L.) productivity. *Environ. Ecol.*, 28(3A), pp. 1522-1527.
- Singh N., Bracken C., Hasegawa P., Handa A., Buckel S., Hermdson M. and Bressan R., 1987 . Characterization of osmotin. A thaumatin-like protein associated with osmotic adjustment in plant cells. *Plant Physiol* (85), pp. 529-536.
- Smirnov F. 1999. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New phytol* (125), pp. 27-58.

- Sofa A., Dichio B., Xiloyannis E. & Massia A., 2004 . Effects of different irrachiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant. Science* (166), pp. 293-303.
- Subash N. & Priya N., 2012. Climatic requirements for optimizing Faba bean (*Vicia faba* L.) production In: Faba Bean (*Vicia faba* L) A Potential legume for India, (*R.f. ICAR, Éd.*) pp. 197-204.
- Subramanian S., Stacey G. & Yu O., 2007. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci.*, 12 (7), pp. 282-285.
- Sudhakar C., Lakshmi A. & Giridarakumar S., 2001 . Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, 161, pp. 613-619.
- Szabolcs I., 1994 . Prospects of soil salinity for the 21<sup>st</sup> Century. *Acapulco Mexique: Trans 15th World Congress of Soil Science*, 1, pp. 123-141.
- Taiz L., & Zeiger E., 2002 . *Plant Physiology* (3<sup>rd</sup> ed.). Sinauer associates Inc. 623 pages.
- Télésinski A., Nowak J., Smolik B., Dubowska A. & Skrzypiec N., 2008 . Effect of soil salinity on activity of antioxidant enzymes and content of ascorbic acid and phenols in bean (*Pahaseolus vulgaris* L.) plants. *J. Elementol*, 13(3), pp. 401-409.
- Tiwari J., Munshi A., Kumar R., Pandey R., Arora A., Bhat J., & Sureja A., 2010 . Effect of salt stress on cucumber: Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ratio, osmolyte concentration, phenols and chlorophyll content. *Acta Physiol Plant* (32), pp. 103–114.
- Valderrama R., Corpas F. & Carreras A., 2 006. The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell and Environment*, 29 (7), pp. 1449–1459.
- Vinocur S. and Altman R., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 123 - 132
- Waśkiewicz A., Agnieszka M.P. and Malgorzata G. , 2013. Phenolic Content Changes in Plants Under Salt Stress. In: P. Ahmad, *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress* pp. 283-314. Springer Science+ Business Media.
- Wojciechowski M.F., Lavin M. & Sanderson M., 2004 . A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. *American J. Botany* (91), pp. 1846-1862.
- Yahia Y., Elfalleh W., Tlili N., Hannachi H., Loumerem M. & Ferchichi A., 2013. Phytochemical contents and antioxidant activities of some tunisian faba bean populations. *Romanian Agricultural Research* (30). 10 pages
- Yao K., and De Luca V., 1995 . Creation of a Metabolic Sink for Tryptophan Alters the Phenylpropanoid Pathway and the Susceptibility of Potato to *Phytophthora infestans*. *Plant, Cell.*(7), pp. 1787-1799.
- Yu L.L., Yu K.K. and Parry J., 2005 . Antioxidant properties of coldpressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils, *Food Chemistry*. 91, pp. 723-729
- Yuan G., Wang X., Wang Q., & Guo R., 2010. Effect of salt stress on phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and antioxidant activity in radish sprouts. *Food chemistry* (121), pp. 1014-1019.
- Zaghouane O., 1991. The situation of faba bean (*Vicia faba* L.) in Algeria. Options Méditerranéennes. Série Séminaires 10: 123-125.
- Zhu J.K., 2001. Plant salt tolerance Review. *Trends in Plant Science*, 6( 2), pp. 66-71.

# ANNEXES

ANNEXE I  
COMPOSITION DE LA SOLUTION HOAGLAND

**TABLE 5.3**  
Composition of a modified Hoagland nutrient solution for growing plants

Compound	Molecular weight	Concentration of stock solution	Concentration of stock solution	Volume of stock solution per liter of final solution	Element	Final concentration of element	
	g mol <sup>-1</sup>	mM	g L <sup>-1</sup>	mL		μM	ppm
<b>Macronutrients</b>							
KNO <sub>3</sub>	101.10	1,000	101.10	6.0	N	16,000	224
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236.16	1,000	236.16	4.0	K	6,000	235
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	115.08	1,000	115.08	2.0	Ca	4,000	160
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246.48	1,000	246.49	1.0	P	2,000	62
					S	1,000	32
					Mg	1,000	24
<b>Micronutrients</b>							
KCl	74.55	25	1.864	2.0	Cl	50	1.77
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61.83	12.5	0.773		B	25	0.27
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	169.01	1.0	0.169		Mn	2.0	0.11
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	287.54	1.0	0.288		Zn	2.0	0.13
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	249.68	0.25	0.062		Cu	0.5	0.03
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> (85% MoO <sub>3</sub> )	161.97	0.25	0.040		Mo	0.5	0.05
NaFeDTPA (10% Fe)	468.20	64	30.0	0.3–1.0	Fe	16.1–53.7	1.00–3.00
<b>Optional<sup>a</sup></b>							
NiSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	262.86	0.25	0.066	2.0	Ni	0.5	0.03
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	284.20	1,000	284.20	1.0	Si	1,000	28

Source: After Epstein 1972.

Note: The macronutrients are added separately from stock solutions to prevent precipitation during preparation of the nutrient solution. A combined stock solution is made up containing all micronutrients except iron. Iron is added as sodium ferric diethylenetriaminepentaacetate (NaFeDTPA, trade name Ciba-Geigy Sequestrene 330 Fe; see Figure 5.2); some plants, such as maize, require the higher level of iron shown in the table.

<sup>a</sup>Nickel is usually present as a contaminant of the other chemicals, so it may not need to be added explicitly. Silicon, if included, should be added first and the pH adjusted with HCl to prevent precipitation of the other nutrients.

Source : (Taiz et al., 2002)

## ANNEXE II

Tableau 11 : Contenu en polyphénols totaux : CPT. (mg EAG/g d'extrait)

		<b>BLOC 1</b>	<b>BLOC 2</b>	<b>BLOC 3</b>	<b>BLOC 4</b>	<b>ET</b>	<b>ES</b>	<b>Moyenne ±ES</b>
<b>STADE I</b>	<b>T témoin</b>	537,23	729,94	600,27	733,10	97	48	<b>650±48</b>
	<b>T1</b>	754,19	809,01	674,07	804,79	63	31	<b>761±31</b>
	<b>T2</b>	728,89	754,19	783,70	756,30	22	11	<b>756±11</b>
	<b>T3</b>	545,45	764,73	604,49	545,45	104	52	<b>615±52</b>
	<b>T4</b>	671,96	649,19	629,79	588,89	35	18	<b>635±17</b>
<b>STADE II</b>	<b>T témoin</b>	473,34	697,05	683,77	621,14	102	51	<b>619±51</b>
	<b>T1</b>	600,90	544,19	574,13	682,08	59	30	<b>600±30</b>
	<b>T2</b>	749,97	718,34	644,55	899,67	107	54	<b>753±54</b>
	<b>T3</b>	665,21	784,76	555,99	797,41	114	57	<b>701±57</b>
	<b>T4</b>	787,92	807,95	794,46	774,43	14	7	<b>791±7</b>

Tableau 12 : Contenu en flavonoïdes : CF. (mg EQ/g d'extrait)

		<b>BLOC 1</b>	<b>BLOC 2</b>	<b>BLOC 3</b>	<b>BLOC 4</b>	<b>ET</b>	<b>ES</b>	<b>Moyenne ±ES</b>
<b>STADE I</b>	<b>T témoin</b>	72,53	82,71	59,32	81,35	10,8	5,4	<b>74±5,4</b>
	<b>T1</b>	90,50	70,61	85,37	87,21	8,8	4,4	<b>83,4±4,4</b>
	<b>T2</b>	35,23	30,59	31,40	32,91	2,0	1,0	<b>32,5±1</b>
	<b>T3</b>	74,08	98,24	90,20	80,94	10,6	5,3	<b>85,9±5,3</b>
	<b>T4</b>	85,77	63,38	86,66	74,41	11,0	5,5	<b>77,6±5,5</b>
<b>STADE II</b>	<b>T témoin</b>	130,67	101,86	169,04	141,74	27,8	13,9	<b>135,8±13,9</b>
	<b>T1</b>	87,95	117,32	123,59	105,99	15,6	7,8	<b>108,7±7,8</b>
	<b>T2</b>	61,94	77,33	94,92	101,75	17,9	9,0	<b>84±9</b>
	<b>T3</b>	99,76	101,31	96,29	100,72	2,2	1,1	<b>99,5±1,1</b>
	<b>T4</b>	105,47	118,75	120,01	82,34	17,5	8,7	<b>106,6±8,7</b>

Tableau 13 : l'IC<sub>50</sub> des extraits méthanoliques. (µg/ml) du test DPPH.

		<b>BLOC 1</b>	<b>BLOC 2</b>	<b>BLOC 3</b>	<b>BLOC 4</b>	<b>ET</b>	<b>ES</b>	<b>Moyenne ±ES</b>
<b>STADE I</b>	<b>T témoin</b>	580,06	433,10	535,99	472,04	65,45	32,72	<b>505,30 ±32,72</b>
	<b>T1</b>	410,73	421,25	551,57	452,53	64,21	32,10	<b>459,02 ±32,10</b>
	<b>T2</b>	161,63	160,56	164,55	155,16	3,92	1,96	<b>160,48 ±1,96</b>
	<b>T3</b>	237,09	238,39	202,27	219,67	17,02	8,51	<b>224,35 ±8,51</b>
	<b>T4</b>	233,09	241,82	269,91	228,86	18,47	9,23	<b>243,42 ±9,23</b>
<b>STADE II</b>	<b>T0</b>	309,36	347,13	421,11	312,69	51,92	25,96	<b>347,57 ±25,96</b>
	<b>T1</b>	340,28	440,97	465,49	365,39	59,71	29,85	<b>403,04 ±29,85</b>
	<b>T2</b>	357,68	440,11	407,38	330,30	49,23	24,62	<b>383,87 ±24,62</b>
	<b>T3</b>	245,83	230,95	193,33	210,49	23,01	11,51	<b>220,15 ±11,51</b>
	<b>T4</b>	186,10	261,14	246,91	200,83	35,95	17,98	<b>223,74 ±17,98</b>

## ANNEXE III

## STATISTIQUE DU PARAMETRE POLYPHENOLS

Variable : POLYPHENOLS STADE 1

## ANALYSE DE VARIANCE

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	154988	19	8157,26				
VAR.FACTEUR 1	77247,14	4	19311,79	4,51	0,01878		
VAR.BLOCS	26390,66	3	8796,89	2,06	0,159		
VAR.RESIDUELLE 1	51350,22	12	4279,19			65,42	9,57%

## COMPARAISONS DE MOYENNES

TEST DE DUNNETT - seuil = 5%

FACTEUR 1 / RESIDUELLE 1

PPES = 129.37

F1	LIBELLES	MOYENNES	
			> TEMOIN
2	T1	760,52	
3	T2	755,77	
1	T0	650,14	TEMOIN *
5	T4	634,96	
4	T3	615,03	
			< TEMOIN

Variable :POLYPHENOLS STADE 2

## ANALYSE DE VARIANCE

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	225353	19	11860,68				
VAR.FACTEUR 1	109636,7	4	27409,18	4,17	0,02425		
VAR.BLOCS	36750,55	3	12250,18	1,86	0,1892		
VAR.RESIDUELLE 1	78965,69	12	6580,47			81,12	11,71%

## COMPARAISONS DE MOYENNES

TEST DE DUNNETT - seuil = 5%

FACTEUR 1 / RESIDUELLE 1

PPES =160.43

F1	LIBELLES	MOYENNES	
			> TEMOIN
5	T4	791,19	
3	T2	753,13	
4	T3	700,84	
1	T0	618,83	TEMOIN *
2	T1	600,33	
			< TEMOIN

ANNEXE IV  
STATISTIQUE DU PARAMETRE FLAVONOIDES

Variable : FLAVONOIDES STADE 1

## ANALYSE DE VARIANCE

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	8914,01	19	469,16				
VAR.FACTEUR 1	7625,32	4	1906,33	18,02	0,00007		
VAR.BLOCS	19,2	3	6,4	0,06	0,97895		
VAR.RESIDUELLE 1	1269,49	12	105,79			10,29	14,55%

## COMPARAISONS DE MOYENNES

TEST DE DUNNETT - seuil = 5%

FACTEUR 1

/ RESIDUELLE 1

PPES = 20.34

F1	LIBELLES	MOYENNES	
			> TEMOIN
4	T3	85,87	
2	T1	83,42	
5	T4	77,56	
1	T0	73,98	TEMOIN *
3	T2	32,53	< TEMOIN

Variable : FLAVONOIDES STADE 2

## ANALYSE DE VARIANCE

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	10629	19	559,42				
VAR.FACTEUR 1	5678,82	4	1419,7	4,94	0,01392		
VAR.BLOCS	1501,45	3	500,48	1,74	0,21112		
VAR.RESIDUELLE 1	3448,73	12	287,39			16,95	15,85%

## COMPARAISONS DE MOYENNES

TEST DE DUNNETT - seuil = 5%

FACTEUR 1

/ RESIDUELLE 1

PPES = 33.53

F1	LIBELLES	MOYENNES	
			> TEMOIN
1	T0	135,83	TEMOIN *
2	T1	108,71	
5	T4	106,64	
4	T3	<b>99,52</b>	< TEMOIN
3	T2	<b>83,99</b>	

## ANNEXE V

STATISTIQUE DU PARAMETRE IC<sub>50</sub>Variable : IC<sub>50</sub> STADE 1

## ANALYSE DE VARIANCE

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	403600,2	19	21242,12				
VAR.FACTEUR 1	376444,5	4	94111,12	54,35	0		
VAR.BLOCS	6377,34	3	2125,78	1,23	0,34276		
VAR.RESIDUELLE 1	20778,41	12	1731,53			41,61	13,06%

TEST DE DUNNETT - seuil = 5%

## COMPARAISONS DE MOYENNES

FACTEUR 1 / RESIDUELLE 1

PPES = 82.3

F1	LIBELLES	MOYENNES	
			> TEMOIN
1	T0	505,3	TEMOIN *
2	T1	459,02	
5	T4	<b>243,42</b>	< TEMOIN
4	T3	<b>224,35</b>	
3	T2	<b>160,48</b>	

Variable : IC<sub>50</sub> STADE 2

## ANALYSE DE VARIANCE

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	155020,7	19	8158,98				
VAR.FACTEUR 1	123502,5	4	30875,63	27	0,00001		
VAR.BLOCS	17793,78	3	5931,26	5,19	0,01588		
VAR.RESIDUELLE 1	13724,36	12	1143,7			33,82	10,71%

## COMPARAISONS DE MOYENNES

TEST DE DUNNETT - seuil = 5%

FACTEUR 1 / RESIDUELLE 1

PPES = 66.88

F1	LIBELLES	MOYENNES	
			> TEMOIN
2	T1	403,04	
3	T2	383,87	
1	T0	347,57	TEMOIN *
5	T4	<b>223,74</b>	< TEMOIN
4	T3	<b>220,15</b>	

## ANNEXE VI

**Expression des résultats des polyphénols totaux :**

On prend l'exemple de l'échantillon de *Vicia faba* traitée à 25 mM . L<sup>-1</sup> (CPT, Stade 1):

D'après la courbe d'étalonnage on a l'équation suivante :

$$y = 0,0166x - 0,009 \longrightarrow x = (y + 0,009)/0,0166 \quad \text{exemple avec } y = \text{DO} = 0,8403$$

$$\longrightarrow x = (0,8403 + 0,009) / 0,0166$$

$$= 51,16 \mu\text{g/ml}$$

On multiplie cette valeur par 21 qui correspond au facteur de dilution de notre échantillon ( $\delta = 100\mu\text{l}$  (volume déposé de l'échantillon) /  $2100\mu\text{l}$  (volume réactionnel) =  $1/21$ ).

Donc :  $x' = 51,14 \times 21 = 1074,36 \mu\text{g/ml}$

La solution mère est à 2 mg d'extrait/ml.

On a 1074,36  $\mu\text{g}$   $\longrightarrow$  2 mg

$x''$   $\longrightarrow$  1 mg

$x'' = 1074,36/2 = 537,2 \mu\text{g/mg}$  d'extrait  $\longrightarrow$  :  $x'' = 537,2 \text{ mg/g}$  d'extrait méthanolique.

**Expression des résultats des flavonoïdes :**

On prend l'exemple de l'échantillon de la tomate témoin :

D'après la courbe d'étalonnage on a l'équation suivante :

$$y = 0,0253x - 0,0597 \longrightarrow x = (y + 0,0597) / 0,0253 \quad \text{exemple avec } y = \text{DO} = 0,5957$$

$$\longrightarrow x = (0,5957 + 0,0597) / 0,0253$$

$$= 25,9 \mu\text{g/ml (de milieu réactionnel)}$$

On multiplie cette valeur par 5.6 qui correspond au facteur de dilution de notre échantillon ( $\delta = 500\mu\text{l}$  (volume déposé de l'échantillon) /  $2800\mu\text{l}$  (volume réactionnel) =  $5/28$ ).

Donc :  $x' = 25,9 \times 5,6 = 145,06 \mu\text{g/ml}$  d'extrait.

La solution mère est à 2 mg d'extrait/ml.

On a 145,06  $\mu\text{g}$   $\longrightarrow$  2 mg

$x''$   $\longrightarrow$  1 mg

$x'' = 145,06 / 2 = 72,53 \mu\text{g/mg}$  d'extrait méthanolique

$x'' = 72,53 \text{ mg/g}$  d'extrait méthanolique