

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH – OUARGLA –  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DES SCIENCES AGRONOMIQUES



**THESE**

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT  
EN SCIENCES AGRONOMIQUES

**THEME**

**Etude écogénétique de la réponse de jeunes plantules  
de *Crithmum maritimum* et d'*Atriplex halimus*  
à la salinité (NaCl)**

**Soutenue le 12/09/2018**

**Par M<sup>elle</sup> HAMDANI FAIZA**

**Devant le jury**

**Président : DADDI BOUHOUN MUSTAPHA**

Professeur (UKMO)

**Directeur de thèse : DERRIDJ AREZKI**

Professeur (UMMTO)

**Examineurs**

**AIT SAID SAMIR**

M.C.A (UMMTO)

**OULD EL HADJ KHELIL AMINATA**

Professeur (UKMO)

**OUINTEN MOHAMED**

Professeur (Telidji Amar Laghouat)

**SALHI NESRINE**

M.C.A (UKMO)

## ***Remerciements***

*Je tiens à remercier vivement mon directeur de thèse Mr DERRIDJ AREZKI, pour l'intérêt qu'il a toujours montré à mon travail et tout l'effort qu'il a fourni pour que j'arrive à aboutir à cette thèse. Comme je lui remercie pour sa patience et son caractère humain.*

*Mes remerciements vont également à Mme HILARY ROGERS de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire (Université de Cardiff, Royaume -Uni), et pour les conseils stimulants que j'ai eu l'honneur de recevoir de sa part.*

*Un grand merci à Mr DADDI MOUHOUN MUSTAPHA qui a bien voulu présider mon jury de soutenance.*

*Je remercie également les examinateurs Mr AIT SAID SAMIR, Mme OULD EL HADJ KHELIL AMINATA, Mr OUINTEN MOHAMED et Mme SALHI NESRINE qui ont accepté de bien vouloir juger ce travail.*

## ملخص

النباتات المحبة للملوحة تعتبر من أكثر النباتات المقاومة للملوحة (NaCl). هذه المقاومة هي من النوع الفيزيولوجي، البيو كيميائي والجيني. تطبيق الملوحة بطريقة مفاجئة ووحيدة لملاح كلور الصوديوم (0، 256، 341، 427 و 512 ميليومول/لتر) على نوع *Crithium maritimum* (العشيرة 1 سهبيه و العشيرة 2 ساحلية) و تراكيز أخرى لملاح كلور الصوديوم (0 ، 256 ، 341 ، 427 و 512 ميليومول/لتر) على نوع *Crithium maritimum* لمدة ستة أسابيع أحدث استجابات متباينة بين النوعين. حيث ان العشيرة الساحلية تتسم بمقاومة عالية مقارنة بالعشيرة السهبية. إذ تخزن كمية كبيرة من الصوديوم، البوتاسيوم والاوزموليت (البرولين، كليسرين بيتاين و السكريات الذائبة) في الأوراق و الجذور عبر الزمن (بعد أسبوع، أسبوعين و ستة أسابيع تحت عوامل الملوحة). دور مضادات الاكسدة في مقاومة الملوحة يعتبر رئيسي عند النباتات المقاومة للملوحة، حيث العشيرة ب 2 (الساحلية) تخزن كمية كبيرة من حمض الاسكوربيك مع زيادة النشاط الانزيمي للكتلاز في الأوراق بعد ستة أسابيع من الملوحة مقارنة بالعشيرة ب 1 (السهبية). دراسة التعبير الجيني للمورثة مونواكسيجيناز (CMO) و للمورثة صوديوم هيدروجان اونتيپورتار ( $Na^+/H^+$  Antiporter) على أوراق العشيرتين (السهبية و الساحلية) اثبتت تغيرات في تعبير هاتين المورثتين بعد ستة أسابيع من الملوحة، حيث ان العشيرة الساحلية سجلت تعبير جيني اكبر من العشيرة السهبية.

بالنسبة للنباتات المقاومة للملوحة من نوع *Crithium maritimum*، تطبيق الملوحة بطريقة مفاجئة ووحيدة عليها أحدثت تغيرات في الاستجابة لهذه الملوحة، حيث استطاعت هذه النباتات ان تنمو في تراكيز عالية من الملوحة بفضل تخزينها للصوديوم، اوزموليت في الأوراق و الجذور عبر الزمن وكذلك بفضل تخزينها حمض الاسكوربيك مع ارتفاع في النشاط الانزيمي للكتلاز وهذا في الأوراق بعد ستة أسابيع من الملوحة. الملوحة أحدثت كذلك تغيرات في التعبير الجيني في الأوراق بعد ستة أسابيع من الملوحة.

**الكلمات الدالة:** *Atriplex halimus*، *Crithium maritimum*، NaCl، التعبير الجيني  $Na^+/H^+$  Antiporter، كوليمونواكسيجيناز (CMO)، اوزموليت.

## RESUME

Les halophytes sont parmi les végétaux les plus adaptés au stress salin (NaCl). Ces adaptations sont d'ordre physiologique, biochimique et génétique. L'application brutale (single step) des différentes concentrations en NaCl : 0, 34, 85, 171 et 256 mM chez deux populations d'*Atriplex halimus* (population steppique ; P1 et population de littoral ; P2) et des concentrations de l'ordre de 0, 34, 85, 171, 256, 341, 427 et 512 mM chez une autre halophyte à savoir *Crithmum maritimum* pendant six semaines induit des réponses différentes selon les espèces. La population côtière présente une meilleure tolérance au sel par rapport à la population steppique dont les plantules accumulent plus de Na<sup>+</sup> dans leurs vacuoles (au niveau des feuilles et des racines) et avec une bonne sélectivité du K<sup>+</sup>. Cette tolérance est accompagnée par une accumulation des osmoprotecteurs (proline, glycine bêtaïne et sucres solubles) au niveau feuilles et des racines qui est de plus en plus importante avec la durée du stress (après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin). Le rôle des antioxydants dans la résistance des jeunes plantules d'*A. halimus* aux fortes concentrations en NaCl est clairement mis en avant. En effet la population P2 accumule plus d'acide ascorbique avec une élévation de l'activité enzymatique de la catalase au niveau des feuilles après six semaines sous traitement salin. L'étude de l'expression génique des deux gènes (gène de la Choline monooxygénase (CMO) et le gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter) révèle des différences dans l'expression au niveau des feuilles des deux populations étudiées après six semaines sous des conditions salines. La population de littoral montre une expression plus élevée que la population steppique.

Chez l'halophyte *Crithmum maritimum*, l'application brutale (single step) de la salinité provoque des changements dans la réponse des jeunes plantules à l'élévation de la concentration en NaCl. Le développement avec succès de cette halophyte au stade juvénile est dû principalement à l'accumulation du Na<sup>+</sup> et des osmolytes au niveau des feuilles et des racines à travers le temps et à l'accumulation de l'acide ascorbique accompagné de l'augmentation de l'activité de la catalase au niveau des feuilles après six semaines sous traitement salin. Le stress salin induit également des changements dans l'expression du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter au niveau des feuilles de cette halophyte après six semaines sous stress salin.

**Mots clés :** *Atriplex halimus*, *Crithmum maritimum*, NaCl, expression génétiques, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter, Choline monooxygénase (CMO), osmolytes.

## ABSTRACT

The halophytes are among the most suitable plants for salt stress (NaCl). These adaptations are physiological, biochemical and genetic. The single step application of different NaCl concentrations: 0, 34, 85, 171 and 256 mM in two populations of *Atriplex halimus* (steppe population, P1 and littoral population, P2) and concentrations of the order of 0, 34, 85, 171, 256, 341, 427 and 512 mM in another halophyte, namely *Crithmum maritimum* for six weeks, induces different responses depending on the species. The coastal population has a better salt tolerance than the steppe population, whose seedlings accumulate more Na<sup>+</sup> in their vacuoles (in leaves and roots) with good K<sup>+</sup> selectivity. This tolerance is accompanied by the accumulation of osmoprotectors (proline, glycine betaine and soluble sugars) in leaves and roots over time (after one week, two weeks and six weeks under salt stress). The role of antioxidants in the resistance of young seedlings of *A. halimus* at high concentrations of NaCl is paramount. Indeed, the P2 population accumulates more ascorbic acid with an increase of the enzymatic activity of catalase in the leaves after six weeks under saline treatment. The study of the gene expression of the two genes (Choline monoxygenase (CMO) gene and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter gene) revealed differences in leaves and roots expression of the two populations studied after six weeks under salt conditions. The coastal population shows a higher expression than the steppe population.

In the halophyte *Crithmum maritimum*, the application of salinity in a single step causes changes in young seedling response to elevated NaCl concentrations. The successful development of this halophyte in the juvenile stage is mainly due to the accumulation of Na<sup>+</sup> and osmolytes in leaves and roots over time, and the accumulation of ascorbic acid accompanied by an increase of the catalase activity in leaves after six weeks under saline treatment. Saline stress also induced changes in the expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter gene in the leaves of this halophyte after six weeks under salt stress.

**Key words:** *Atriplex halimus*, *Crithmum maritimum*, NaCl, gene expression, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter, Choline monoxygenase (CMO), osmolytes.

## LISTE DES ABREVIATIONS

A : *Adenine*

ABA : Ascorbic acid

ADNc : ADN complémentaire

APX : Ascorbate peroxidase

AQP : Aquaporines

ASA : Ascorbate

BAC : Chromosome Artificiel de la Bactérie

BADH : Bétaïne Aldéhyde Déshydrogénase

C : Cytosine

CAT : Catalase

CDPKs : Protéines Kinases dépendantes du calcium

CE : Conductivité électrique

CEN : Centromère

CMO : Choline monooxygénase

*codA* : Gène de la choline déshydrogénase de l'Arthrobacter

Ct : Cycle seuil

DASAR : Dehydroascorbate reductase

ddATP : Désoxyribonucléotides désoxy-adénine tri-phosphate

ddCTP : Désoxy-cytosine tri-phosphate

ddGTP : Désoxyribonucléotides de la guanine désoxy-guanine tri-phosphate

ddTTP : Désoxyribonucléotides désoxy-thymine tri-phosphate

dNTP: Désoxyribonucléoside triphosphates

*Eco*: *Eschrichia coli*

FAOx : Formes actives de l'oxygène

G : *Guanine*

GB : Glycine bétaïne

GR : Glutathion Réductase

GSH : Glutathione

GSSG : Glutathion oxydé

GST Peroxisomal: Glutathione S-transferase

HO· : Radical hydroxyle

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène

HKG: Housekeeping Gene

HNO<sub>3</sub>: Acide nitrique

HPLC : High pressure liquid chromatography (chromatographie liquide sous haute pression)

*HVA1* : Protéine de l'Orge (*Hordeum vulgare* L.) group 3 LEA

Kb : *Kilobase* (unité de mesure en biologie moléculaire)

Ladder : *Échelle d'ADN*

MDAR : Monodehydroascorbate reductase

MDHAR : Mono-Dehydroascorbate

MPA : Metaphosphoric acid (Acide métaphosphorique)

Mt18S ARNr : ARN ribosomique 18S (*Mt18S*)

N<sub>2</sub> : Azote liquide

NADP-ME : NADP-malique

NtHAL3 : Gène issu de *Nicotiana tabacum* controlant la protéine Hal3 (half life protein)

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : Oxygène singulet

O<sub>2</sub><sup>-·</sup> : Superoxide radicals

OH<sup>·</sup> : Hydroxyl radical

ONU : *Organisation des Nations Unies*

ORI : Origine de réplication

PCR : Abréviation anglaise de polymerase chain reaction

PDH : Proline Déshydrogénase

PEPcase : Phosphoenolpyruvate carboxylase

PEPC : Phosphoénolpyruvate carboxylase

PKS : Protein Kinase S

PMP3 : Plasma membrane protein 3

PPDK: Dikinase phosphate

POD: Peroxydase

Protéines LEA: Late Embryogenesis Abundant proteins

Protéines: HSP Heat-Shock Protein

Protéines : HSP Heat-Shock Protein

PSII : Oxydoréductase de photosystème II

Put : Putrescine

PUV2 : 18S primers

PUV4 : 18S primers

qRT-PCR : RT-PCR quantitative

RGR : Relative growth rate (Taux de croissance relative)

ROS : Espèces réactives d'oxygène

RWC Relative water content

S.A.U : Surface agricole utile

SDS-NaOH : Sodium Dodecyl Sulfate- Hydroxyde de Sodium

SOD: Superoxyde Dismutase

SOS2: Salt Overly Sensitive 2 (Sel trop sensible 2)

Spd : Spermidine

Spm : Spermine

T : Thymine

TaAQP8 : Aquaporine du tabac transgénique

Tampon TEA : Tris-acetate-EDTA

TEL : Extrémités télomériques

TER : Teneur relative en eau

Th : Température d'hybridation

Tm : Températures de demi-dénaturation des amorces

UV : Ultraviolets

YAC : Yeast artificial chromosome (Chromosome artificiel de levure)

## LISTE DES TABLEAUX

		<b>Page</b>
<b>Tableau I. 1</b>	Classes de la salinité du sol en fonction de la conductivité électrique de l'extrait de la pâte saturée et de la somme des anions (Servant, 1975).	18
<b>Tableau I. 2</b>	Distribution mondiale des zones touchées par le sel (Squires, 2011).	19
<b>Tableau I. 3</b>	L'étendue globale de la salinisation induite par l'homme dans les zones arides sensibles (Mha) (Squires, 2011).	19
<b>Tableau I. 4</b>	Dégradation des terres cultivées par la salinisation des divers pays au cours de la dernière décennie (Ramade, 2002).	20
<b>Tableau I. 5</b>	Choix du vecteur : avantages et inconvénients (Tagu et Moussard, 2003).	68
<b>Tableau I. 6</b>	Quelques enzymes de restriction de type II et leur site de reconnaissance (Voet et Voet, 2016).	70
<b>Tableau I. 7</b>	Liste de certains gènes de ménage (Housekeeping Gene HKG) (Nicot <i>et al.</i> , 2005).	81
<b>Tableau II. 1</b>	Solution nutritive, macroéléments (Morard, 1995).	88
<b>Tableau II. 2</b>	Solution nutritive, microéléments (Morard, 1995).	88
<b>Tableau II. 3</b>	Conductivité électrique des différents traitements salins ( <i>Atriplex halimus</i> ).	88
<b>Tableau II. 4</b>	Conductivité électrique des différents traitements salins ( <i>Crithmum maritimum</i> ).	88

## LISTE DES FIGURES

		Page
<b>Figure I. 1</b>	Aspect morphologique de l' <i>Atriplex halimus</i> (Ozenda, 1977)	6
<b>Figure I. 2 (Photo)</b>	Vue d'ensemble d' <i>Atriplex halimus</i> au niveau de littoral (Wilaya de Tipaza)	7
<b>Figure I. 3 (Photo)</b>	Reprise de feuillage chez l' <i>Atriplex halimus</i> ( <b>A</b> : Région d'El masrane (Djelfa) ; <b>B</b> : Wilaya de Tiapza)	7
<b>Figure I. 4</b>	Fenouil marin <i>Crithmum maritimum</i> (Wolfgang, 1982)	9
<b>Figure I. 5 (Photo)</b>	Fenouil marin, <i>Crithmum maritimum</i> (wilaya de Tipaza)	9
<b>Figure I. 6 (Photo)</b>	Graines de fenouil marin, <i>Crithmum maritimum</i> (Dumont et Mazzacurati, 2013 ; <b>(A)</b> <b>(B)</b> (Wilaya de Tipaza).	10
<b>Figure I. 7</b>	<i>Crithmum maritimum</i> dans une zone rocheuse maritime (Dumont et Mazzacurati, 2013)	12
<b>Figure I. 8 (A et B) (Photo)</b>	<i>Crithmum maritimum</i> dans une zone rocheuse maritime (Wilaya de Tipaza)	13
<b>Figure I. 9</b>	<i>Crithmum maritimum</i> dans une zone rocheuse maritime exposée aux aspersiones par les vagues et les embruns (Dumont et Mazzacurati, 2013)	13
<b>Figure I. 10 (Photo)</b>	<i>Crithmum maritimum</i> dans une zone rocheuse maritime exposée aux aspersiones par les vagues et les embruns (Wilaya de Tipaza)	14
<b>Figure I. 11</b>	La carte mondiale des terres arides. Source : UNEP/GRID 1991 Dans WRI (FAO, 2006).	20
<b>Figure I. 12</b>	Répartition des sols salins du nord de l'Algérie (Anonyme, 2008)	22
<b>Figure I. 13</b>	La démarcation fonctionnelle des voies de signalisation du stress salin et du stress hydrique (stress osmotique et stress ionique) (Zhu, 2002)	28
<b>Figure I. 14</b>	Effets de l'osmose sur une cellule végétale. (a) les plantes aquatiques vivant dans l'eau douce sont dans un environnement hypotonique	30
<b>Figure I. 15</b>	Glandes à sel de <i>Limonium vulagre</i> (Mohr et Schopfer, 2012)	34

<b>Figure I. 16</b>	Chénopodiacées. Poils de la vessie sur la surface inférieure des feuilles de <i>Chenopodium bonus-henricus</i> x 90 (Kubitzki et al., 2013)	34
<b>Figure I. 17</b>	Structure d'une cuticule typique de la plante (épaisseur fortement exagérée) (Forbes et Watson, 1992)	36
<b>Figure I. 18</b>	Fonction multiple de la proline (Ahmad et al., 2012)	40
<b>Figure I. 19</b>	Biosynthèse de la glycine-bétaine (Cherry et al., 2012)	41
<b>Figure I. 20</b>	Structure chimique des trois polyamines communes (Hopkins, 2003)	42
<b>Figure I. 21</b>	Principaux polyols du stress salin (Borg, 2004)	43
<b>Figure I. 22</b>	Synthèse de glutathion (Roberfroid, 2008)	45
<b>Figure I. 23</b>	Cycle d'ascorbate-glutathion (Smith et al., 2009)	47
<b>Figure I. 24</b>	Anatomie des feuilles de plantes C3 et C4 (Weil et al., 2001)	48
<b>Figure I. 25</b>	Fonctionnement photosynthétique des plantes en C4 (Deysson, 1982)	50
<b>Figure I. 26</b>	Acide malique (Guignard, 2000)	51
<b>Figure I. 27</b>	Les étapes de l'étude de l'expression des gènes	58
<b>Figure I. 28</b>	Schéma représentatif des étapes de la PCR (Lonvaud-funel et al., 2010)	61
<b>Figure I. 29</b>	Schéma récapitulatif du principe du clonage par les techniques de l'ADN recombinant (Lodish, 2005)	62
<b>Figure I. 30</b>	Récapitulation des étapes de la construction de l'ADN recombinant (Cain et al., 2006)	63
<b>Figure I. 31</b>	Structure du plasmide	64
<b>Figure I. 32</b>	Clonage moléculaire avec vecteur	65
<b>Figure I. 33</b>	Structure d'un vecteur YAC (Tagu et Moussard, 2003)	66
<b>Figure I. 34</b>	Structure d'un vecteur BAC (Chromosome Artificiel de la Bactérie) (Pinkert, 2014)	64
<b>Figure I. 35</b>	Représentation schématique de l'action de l'enzyme de restriction (Kulkarni, 2002)	71

<b>Figures I. 36</b>	Différents types de coupure par les enzymes de restriction (Clark et Pazdernik, 2015)	71
<b>Figure I. 37</b>	Insertion du produit de PCR (ADN) dans le plasmide (ligation) (Becker, 2002)	72
<b>Figure I. 38</b>	Représentation schématique du principe du clonage (Cooper, 1999)	74
<b>Figure I. 39 (A)</b>	Etape du séquençage (méthode de Sanger- Coulson) (Karp, 2010)	77
<b>Figure I.39 (B,C)</b>	Les pistes du gel et interprétation de la séquence par ordinateur (Karp, 2010)	78
<b>Figure I. 40</b>	Schéma récapitulatif de la Transcription réverse et la synthèse de l'ADNc (Tagu et Moussard, 2003)	79
<b>Figure I. 41</b>	Cycle seuil Ct (Threshold level) sur une courbe d'amplification PCRq en temps réel (Guillaume, 2009)	82
<b>Figure I. 42</b>	Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes : Lightcycler assay)	83
<b>Figure I. 43</b>	Courbe de fusion	84
<b>Figure II. 1</b>	Mise en culture des deux espèces étudiées ( <i>Atriplex halimus</i> et <i>Crithmum maritimum</i> ).	88
<b>Figure II. 2</b>	: Alignement de séquences (ou alignement séquentiel) du gène CMO de l' <i>Atriplex postrata</i> , l' <i>Atriplex hortensis</i> et l' <i>Atriplex nummularia</i> .	95
<b>Figure II. 3</b>	Alignement de séquences (ou alignement séquentiel) du gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporteur de l' <i>Atriplex dimorphostegia</i> et l' <i>Atriplex gmelini</i>	97
<b>Figure II. 4</b>	Les étapes récapitulatives du clonage	100
<b>Figure II. 5</b>	Le plasmide pGEM T- Easy	106
<b>Figure II. 6</b>	Principe de l'extraction de l'ARN par RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)	109
<b>Figure III. 1</b>	Taux de survie chez les deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> après six semaines sous stress salin	114
<b>Figure III. 2</b>	Hauteur des plants des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i>	115

	après une semaine, deux semaine et six semaines sous stress salin	
<b>Figure III. 3</b>	Taux de croissance relative de jeunes plantules des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> après six semaines sous stress salin	116
<b>Figure III. 4</b>	Teneur relative en eau (%) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	117
<b>Figure III. 5</b>	Teneur relative en eau (%) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin	117
<b>Figure III. 6</b>	Taux de chlorophylle des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	118
<b>Figure III. 7</b>	Taux de Na <sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	119
<b>Figure III. 8</b>	Taux de Na <sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin	119
<b>Figure III. 9</b>	Taux de K <sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	121
<b>Figure III. 10</b>	Taux de K <sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin	121
<b>Figure III. 11</b>	Ratio K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	123
<b>Figure III. 12</b>	Ratio K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au	123

	niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin	
<b>Figure III. 13</b>	Taux de proline des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	125
<b>Figure III. 14</b>	Taux de proline des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin	125
<b>Figure III. 15</b>	Taux des sucres solubles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	127
<b>Figure III. 16</b>	Taux des sucres solubles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin	127
<b>Figure III. 17</b>	Taux de la glycine bêtaïne des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	129
<b>Figure III. 18</b>	Taux de la glycine bêtaïne des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des racines deux semaines et six semaines sous stress salin	129
<b>Figure III. 19</b>	Total des solutés internes (32,1 mM) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	130
<b>Figure III. 20</b>	Total des solutés internes (32,1 mM) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des racines après deux semaines et six semaines sous stress salin	131
<b>Figure III. 21</b>	Concentration en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> au niveau des feuilles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , après six semaines sous stress salin	132
<b>Figure III. 22</b>	Activité de la catalase au niveau des feuilles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , après six semaines sous stress salin	132

<b>Figure III. 23</b>	Taux d'acide ascorbique des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles, après six semaines sous stress salin	133
<b>Figure III. 24</b>	ARN issu de l'extraction des tissus foliaires des plantules soumises à 171 mM NaCl de la population steppique P1 d' <i>Atriplex halimus</i> après six semaines sous l'effet du sel	134
<b>Figure III. 25</b>	ADNc issu de l'échantillon choisi pour le clonage (tissus foliaires issus des plantules tressées à 171 mM NaCl de la population steppique P1 d' <i>Atriplex halimus</i> )	135
<b>Figure III. 26</b>	(A) : Confirmation de la compatibilité des amorces spécifiques du gène CMO avec l'ADNc issu de notre échantillon choisi pour le clonage ( <i>Atriplex halimus</i> ) ; (B) : L'ADN issu de la bande extraite du gel après confirmation avec les amorces spécifiques du gène CMO ( <i>Atriplex halimus</i> )	136
<b>Figure III. 27</b>	Colonies positives ayant acquis le plasmide après ligature ( <i>Atriplex halimus</i> ).	136
<b>Figure III. 28</b>	Les ADN plasmidiques purifiés issus des colonies transformées ( <i>Atriplex halimus</i> ).	137
<b>Figure III. 29</b>	Séquençage (gène CMO) après clonage chez l' <i>Atriplex halimus</i>	139
<b>Figure III. 30</b>	Compatibilité des amorces avec les ADNc de nos échantillons choisis ( <i>Atriplex halimus</i> )	138
<b>Figure III. 31</b>	Séquençage (gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter) après clonage chez l' <i>Atriplex halimus</i>	141
<b>Figure III. 32</b>	Expression relative du gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles et au niveau des racines, après six semaines sous stress salin	142
<b>Figure III. 33</b>	Expression relative du gène CMO des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d' <i>Atriplex halimus</i> , au niveau des feuilles et au niveau des racines, après six semaines sous stress salin	143
<b>Figure III. 34</b>	Taux de survie chez les jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après six semaines sous stress salin	156

<b>Figure III. 35</b>	Taille des jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	157
<b>Figure III. 36</b>	Taux de croissance relative de jeunes plantules de l'espèce <i>Crithmum maritimum</i> (2 semaines comparées à une semaine) (A) et (6 semaines comparées à 1 semaine) (B)	158
<b>Figure III. 37</b>	Teneur relative en eau (%) au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> , après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	159
<b>Figure III. 38</b>	Teneur relative en eau (%) au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après deux et six semaines sous stress salin	160
<b>Figure III. 39</b>	Taux de chlorophylle de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	161
<b>Figure III. 40</b>	Taux de Na <sup>+</sup> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	162
<b>Figure III. 41</b>	Taux de Na <sup>+</sup> au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	162
<b>Figure III. 42</b>	Taux de K <sup>+</sup> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	163
<b>Figure III. 43</b>	Taux de K <sup>+</sup> au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après deux semaines et six semaines sous stress salin	164
<b>Figure III. 44</b>	Ratio K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Taux de K <sup>+</sup> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	165
<b>Figure III. 45</b>	Ratio K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après deux semaines et six semaines sous stress salin	165
<b>Figure III. 46</b>	Taux de proline au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	166

<b>Figure III. 47</b>	Taux de proline au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	167
<b>Figure III. 48</b>	Taux des sucres solubles au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	168
<b>Figure III. 49</b>	Taux des sucres solubles au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après deux semaines et six semaines sous stress salin	168
<b>Figure III. 50</b>	Teneur en glycine bêtaïne au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	169
<b>Figure III. 51</b>	Teneur en glycine bêtaïne au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après deux semaines et six semaines sous stress salin	170
<b>Figure III. 52</b>	Total des solutés internes (32,1 mM) au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> , après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin	171
<b>Figure III. 53</b>	Total des solutés internes (32,1 mM) au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> , après deux semaines et six semaines sous stress salin	171
<b>Figure III. 54</b>	Concentration en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après six semaines sous stress salin	172
<b>Figure III. 55</b>	Activité de la catalase au niveau des feuilles des jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après six semaines sous stress salin	173
<b>Figure III. 56</b>	Taux d'acide ascorbique au niveau des feuilles des jeunes plantules de l'espèce halophyte <i>Crithmum maritimum</i> après six semaines sous stress salin	174
<b>Figure III. 57</b>	Compatibilité des amorces avec les ADNc de nos échantillons choisis ( <i>Crithmum maritimum</i> )	175
<b>Figure III. 58</b>	Séquençage (gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter) après clonage chez <i>Crithmum maritimum</i>	176

**Figure III. 59** Expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter au niveau des feuilles et des racines de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après six semaines sous stress salin

177

# TABLE DES MATIERES

	<b>Page</b>
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. Présentation des deux espèces : <i>Atriplex halimus</i> et <i>Crithmum maritimum</i>	5
1. 1. <i>Atriplex halimus</i>	5
1. 1. 1. Nomenclature	5
1. 1. 2. Répartition	5
1. 1. 3. Description et caractéristiques principales	5
1. 1. 4. Exigences écologiques	6
1. 1. 5. Mode de multiplication	8
1. 1. 6. Rôle écologique	8
1. 2. <i>Crithmum maritimum</i>	8
1. 2. 1. Nomenclature	8
1.2. 2. Répartition	8
1. 2. 3. Description et caractéristiques principales	8
1. 2. 4. Exigences écologiques	11
1. 2. 5. Mode de multiplication	11
1. 2. 6. Rôle écologique et utilisation	15
2. Salinité	15
2. 1. Définition de la salinité	15
2. 2. Principales sources de sels	16
2. 2. 1. Salinisation "primaire"	16
2. 2. 2. Salinisation "secondaire"	17
2. 3. Différents types de salinités	17

2. 4. Répartition des sols salés dans le monde et en Algérie	18
2. 4. 1. Répartition des sols salés dans le monde	18
2. 4. 2. Répartition des sols salés en Algérie	21
2. 5. Problématique du sol et de l'eau en Algérie	21
2. 5. 1. Présentation générale actuelle	21
2. 5. 2. Gestion de l'irrigation dans le milieu salin en Algérie	24
2. 5. 3. Désertification et Salinité	25
3. Réponse des plantes au stress salin	26
3. 1. Définition du stress et son origine	26
3. 2. Définition du stress salin	27
3. 3. Effet du stress salin sur les plantes	28
3. 3. 1. Stress osmotique	28
3. 3. 2. Toxicité ionique (stress ionique)	29
3. 4. Comportement des plantes vis-à-vis du stress salin	31
3. 5. Réponses adaptatives des plantes au stress salin	35
3. 5. 1. Adaptations morphologiques et anatomiques des halophytes	35
3. 5. 2. Adaptations physiologiques	38
3. 5. 2. 1. Ajustement osmotique	38
3. 5. 2. 2. Systèmes de défense par les antioxydants	43
3. 5. 2. 3. Aptitude des halophytes à protéger le système photosynthétique	47
3. 5. 2. 4. Variation des lipides membranaires au cours du stress salin	49
3. 5. 2. 5. Synthèse des acides organiques	51
3. 5. 2. 6. Synthèse des protéines spécifiques aux stress salin	52
3. 5. 3. Réponse génétique des plantes au stress salin	53
3. 5. 3. 1. Gènes liés au stress salin	53
3. 5. 3. 1. 1. Gènes de Choline monoxygénase (CMO) et Bétaine	53

## aldéhyde déshydrogénase (BADH)

3. 5. 3. 1. 2. Gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter	54
3. 5. 3. 1. 3. Gène P5CS contrôlant l'accumulation de la proline	54
3. 5. 3. 1. 4. Gènes Late embryogenèse abundent protéines (LEA)	55
3. 5. 3. 1. 5. Gènes Plasma membrane protein 3 (PMP3)	56
3. 5. 3. 1. 6. Gènes codant pour les aquaporines (AQP)	56
4. Etude de l'expression de gènes liés au stress salin	57
4. 1. Extraction et purification des acides nucléiques	57
4. 2. Mise en évidence des gènes candidats	59
4. 2. 1. Recherche bibliographique des gènes candidats et alignements	59
4. 2. 2. Conception des amorces	59
4. 2. 3. Amplification par PCR des gènes candidats	60
4. 2. 4. Révélation des fragments amplifiés	61
4. 3. Clonage et séquençage des produits d'amplification	61
4. 3. 1. Clonage de l'ADN par les techniques de l'ADN recombinant	61
4. 3. 1. 1. Construction de l'ADN recombinant	62
4. 3. 1. 2. Amplification de l'ADN recombinant	73
4. 3. 1. 3. Sélection des bactéries transformées	73
4. 3. 1. 4. Criblage des transformants	73
4. 3. 1. 5. Séquençage de l'ADN purifié (séquençage des <i>clones</i> )	75
4. 4. Étude de l'expression de gènes par PCR quantitative (qPCR)	76
4. 4. 1. Transcription réverse (synthèse de l'ADNc)	76
4. 4. 2. Conception des amorces	80
4. 4. 3. Choix des gènes cibles ou candidats	80
4. 4. 4. Sélection des gènes de ménage	80
4. 4. 5. Réaction de PCR quantitative en temps réel	80

4. 4. 6. Analyse des données	84
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	
1. Matériel végétal	86
2. Semis et conditions de culture	87
3. Paramètres étudiés	87
3. 1. Paramètres physiologiques	90
3. 1. 1. Taux de survie, taux de croissance relative et teneur relative en eau	90
3. 1. 2. Taux de chlorophylle	90
3.1.3. Dosage des ions K <sup>+</sup> et Na <sup>+</sup>	90
3. 2. Paramètres biochimiques	91
3. 2. 1. Dosage de la proline	91
3. 2. 2. Dosage des sucres solubles	91
3. 2. 3. Dosage de la glycine-bétaïne	92
3. 2. 4. Dosage des solutés totaux	92
3. 2. 5. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	92
3. 2. 6. Mesure de l'activité de la catalase	93
3. 2. 7. Quantification de l'acide ascorbique	93
4. Etude de l'expression relative des gènes	94
4. 1. Choix des gènes liés au stress salin	94
4. 2. Conception des amorces dégénérées	94
4. 3. Clonage	100
4. 3. 1. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)	101
4. 3. 1. 1. Extraction de l'ARN	101
4. 3. 1. 2. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)	102
4. 3. 1. 3. Confirmation de la synthèse de l'ADNc	103

4. 3. 2. PCR avec les amorces dégénérées	104
4. 3. 3. Extraction de la bande d'ADN du gel d'électrophorèse	104
4. 3. 4. Ligation avec le plasmide	105
4. 3. 5. Transformation dans les cellules compétentes d' <i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	106
4. 3. 6. Sélection des colonies positives après transformation par PCR	107
4. 3. 7. Culture en milieu liquide des colonies positives	107
4. 3. 8. Purification de l'ADN plasmidique et séquençage	108
4. 4. Étude de l'expression génétique des gènes identifiés	108
4. 4. 1. Extraction de l'ARN	108
4. 4. 2. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) et normalisation	111
4. 4. 3. PCR quantitative en temps réel	111
4. 4. 4. Calcul de l'expression relative	112
5. Analyse statistique	112
<b>CHAPITRE III</b>	
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
1. Résultats et Discussion de l'espèce <i>Atriplex halimus</i>	113
1. 1. Résultats	113
1. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques physiologiques	113
1.1. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de survie	113
1.1. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la hauteur des plants	114
1.1. 1. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de croissance relative	115
1. 1. 1. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en eau	116

1. 1. 1. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de chlorophylle	118
Na <sup>+</sup> 1. 1. 1. 6. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de	118
K <sup>+</sup> 1. 1. 1. 7. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de	120
K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> 1. 1. 1. 8. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le ratio	122
1. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques biochimiques	124
1. 1. 2. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de la proline	124
1. 1. 2. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux des sucres solubles	126
1. 1. 2. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en glycine bêtaïne	128
1. 1. 2. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le total des solutés internes	130
1. 1. 2. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les antioxydants	131
1. 1. 2. 5. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la concentration en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	131
1. 1. 2. 5. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'activité de la catalase	132
1. 1. 2. 5. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de l'acide ascorbique	133
1. 1. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression génétique	134
1. 1. 3. 1. Résultats obtenus après extraction de l'ARN de l'échantillon destiné au clonage	134
1. 1. 3. 2. Résultats de séquençage après clonage	137
1. 1. 3. 3. Résultats obtenus après PCR avec les amorces spécifiques du gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter	138
1. 1. 3. 4. Résultats de séquençage (gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter)	140

1. 1. 3. 5. Etude de l'expression génétique des gènes CMO et Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter	140
1. 1. 3. 5. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression relative du gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter	140
1. 1. 3. 5. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression relative du gène CMO (Choline monooxygénase)	142
1. 2. Discussion	143
2. Résultats et Discussion de l'espèce <i>Crithmum maritimum</i>	156
2. 1. Résultats	156
2. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques physiologiques	156
2. 1. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de survie	156
2. 1. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la taille des plants	157
2. 1. 1. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de croissance Relative	157
2. 1. 1. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en eau	159
2. 1. 1. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de chlorophylle	160
2. 1. 1. 6. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de Na <sup>+</sup>	161
2. 1. 1. 7. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de K <sup>+</sup>	163
2. 1. 1. 8. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le ratio K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	164
2. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques Biochimiques	166
2. 1. 2. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de la proline	166
2. 1. 2. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux des sucres solubles	167

2. 1. 2. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en glycine bêtaïne	169
2. 1. 2. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le total des solutés internes	170
2. 1. 2. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les antioxydants	172
2. 1. 2. 5. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la concentration en H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	172
2. 1. 2. 5. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'activité de la catalase	172
2. 1. 2. 5. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de l'acide ascorbique	173
2. 1. 3. Etude de l'expression génétique du gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter	174
2. 1. 3. 1. Résultats obtenus après PCR avec les amorces spécifiques du gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter	174
2. 1. 3. 2. Résultats de séquençage (gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter)	175
2. 1. 3. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression relative du gène Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Antiporter	177
2. 2. Discussion	178
CONCLUSION GENERALE	186
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	189
ANNEXES	

## INTRODUCTION

La salinité et la sécheresse limitent considérablement la productivité végétale sur 40% de la surface terrestre, notamment en régions méditerranéennes (Jebara et *al.*, 2000). L'augmentation de l'agriculture irriguée et l'utilisation intensive des ressources en eau dans les pays chauds et secs entraînent une apparition inévitable de nombreux problèmes de salinité dans les sols et l'eau. L'Algérie ne fait pas exception : de longues périodes de sécheresse ont entraîné des signes extérieurs de la salinisation du sol affectant 3,2 millions d'hectares (Belkhodja et Bidai, 2004). La salinisation des sols est un phénomène qui correspond à l'accumulation excessive de sels, ce qui se traduit par une diminution de la fertilité des sols. En Algérie, les caractères pédoclimatiques favorisent dans de nombreuses régions des processus de salinisation des terres très contraignantes pour les agriculteurs (Harrag et Kaabache, 2001).

A ce titre et devant le risque de perdre de nouvelles terres par salinisation, des mesures strictes et urgentes ont été prises pour faire face à ce phénomène. Les principaux enjeux consistent à améliorer les pratiques culturales de manière à économiser les ressources en eau mais également à développer, sélectionner et introduire des espèces adaptées aux conditions locales. Les plantations d'*Atriplex* apparaissent comme l'une des meilleures solutions pour le rétablissement de ces terres et la restauration des sols. Ces arbustes sont extrêmement rustiques et capables d'être cultivés dans des conditions extrêmes d'aridité et de salinité, et constituent une réserve fourragère pour les périodes de disettes.

Le genre *Atriplex* est le plus diversifié de la famille des Amaranthacées (classé précédemment comme Chenopodiaceae) et comprend environ 200 espèces dans les régions tempérées et subtropicales (Leboudre-Delalande, 2012). Ce genre est associé à des sols salins et alcalins dans des milieux arides, désertiques ou semi-désertiques (Mulas et Mulas, 2004). Parmi les espèces d'*Atriplex* en Afrique du Nord, *Atriplex halimus* L. est un arbuste de type C4 natif du bassin méditerranéen qui montre une excellente tolérance à la salinité et à la sécheresse (Ortiz-Dorda et *al.*, 2005) et aux métaux lourds (Lutts et *al.*, 2004).

Le fenouil marin (*Crithmum maritimum* L.) est une halophyte typique des écosystèmes côtiers méditerranéens qui présente une forte tolérance au sel pendant sa croissance végétative (Ben Amor et *al.*, 2005). Étant naturellement tolérant au sel, le

fenouil marin pourrait être utilisé comme une culture alternative sur des sols salins (Grigoriadou et Maloupa, 2008). En fait, il a été suggéré qu'il pourrait être utile en tant que culture à graines oléagineuses dans les sols salins semi-arides où d'autres types de ces cultures ne peuvent être cultivées (Atia et *al.*, 2011). En outre, *Crithmum maritimum* L. est une plante aromatique riche en composés antioxydants (Siracusa et *al.*, 2011).

Les plantes exposées au stress salin sont confrontées à deux contraintes principales : premièrement, le stress osmotique dû à la hausse de la pression osmotique externe. La réponse à cette situation est une réduction rapide du taux de croissance des plantes. Dans une deuxième phase, il existe une accumulation d'ions toxiques ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) qui peut conduire à une sénescence prématurée des feuilles et finalement à la mort de toute la plante. Les mécanismes permettant d'atteindre la tolérance au sel varient d'une espèce à l'autre. Certains halophytes excluent les sels des feuilles en les accumulant dans les glandes salées à la surface de leurs feuilles (Sangam et *al.*, 2005), tandis que d'autres sont considérées comme des accumulatrices internes. Ce dernier groupe accumule du sel en le séquestrant dans la vacuole cellulaire. Flowers et Colmer 2008 (2008) notent que les halophytes contrôlent le rapport  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  cellulaire à travers une famille d'antiporters tel que le  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter qui se localise dans le tonoplaste (membrane qui sépare la vacuole du cytoplasme) (Hamada et *al.*, 2001). Les gènes  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter ont été isolés de plusieurs espèces d'*Atriplex*, telle que l'*Atriplex gmelini* (Hamada et *al.*, 2001).

Un autre mécanisme développé par les plantes pour survivre à un environnement stressant, en particulier impliquant la sécheresse ou la salinité, est la biosynthèse et l'accumulation d'osmolytes (qui agissent comme osmoprotecteurs) tels que les sucres solubles, la proline et la glycine bêtaïne (Peel et *al.*, 2010). La synthèse et l'accumulation de la glycine-bêtaïne ont été largement étudiées chez les Chenopodiaceae (Brouquisse et *al.*, 1989). La glycine bêtaïne stabilise les structures quaternaires des protéines complexes, par exemple celle de PSII (Papageorgiou et Murata, 1995). Elle peut également être importante dans la protection des membranes contre les concentrations élevées en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (Rhodes et Hanson, 1993). La concentration de la glycine bêtaïne accumulée est généralement en corrélation avec le niveau de la tolérance au sel (Rhodes et Hanson, 1993). La Choline monooxygénase (CMO) oxyde la choline à la bêtaïne aldéhyde, qui est ensuite converti par la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH) en glycine bêtaïne. L'expression des gènes CMO a augmenté de manière spectaculaire dans les tiges, les feuilles et les racines de l'*Atriplex prostrata* après un traitement de 3 jours

avec 1-2% de NaCl (Wang et Showalter, 2004). La proline est également accumulée très rapidement chez l'*Atriplex halimus* sous traitements salins et contribue à l'ajustement osmotique (Ben Hassine et al., 2008).

Le stress salin s'accompagne d'une augmentation des niveaux d'espèces réactives d'oxygène (ROS) qui perturbent l'homéostasie redox conduisant à une peroxydation lipidique et à d'autres dommages cellulaires. Le traitement du sel élève les taux de ROS à la fois chez les halophytes et les glycophytes. Cependant, chez les halophytes, l'élévation peut être transitoire, et après seulement quelques heures, les niveaux redescendent à nouveau en raison de l'activation des mécanismes antioxydants (Ellouzi et al. 2011). L'acide ascorbique est un antioxydant clé qui est produit abondamment chez les plantes, qui récupère les ROS (Smirnoff, 2000). Les principaux groupes de ROS balayés comprennent le superoxyde, les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet (Foyer et Noctor, 2003). Les enzymes antioxydantes sont également une partie essentielle du système de balayage des ROS activés sous le stress salin. Il s'agit notamment de la superoxyde dismutase (SOD), de la catalase (CAT) et de la peroxydase (POD) (Boughalleb et al., 2010). Les activités de ces enzymes sont fréquemment élevées chez les espèces tolérantes au sel, y compris l'*Atriplex halimus* (Boughalleb et al., 2010).

De nombreuses études sur la tolérance au stress salin ont été effectuées en augmentant progressivement la salinité sur une période du temps pour permettre aux plantes de s'adapter, et en appliquant le stress sur des plantes plus âgées déjà bien établies au NaCl. Par exemple, Boughalleb et al. (2009) ont exposé l'*Atriplex halimus* jusqu'à 800 mM NaCl mais ce stress a été imposé par incréments de NaCl 100 mM à des intervalles de 2 jours jusqu'à ce que la concentration de salinité maximale testée ait été atteinte. Toutefois, dans les zones où les eaux souterraines utilisées pour l'irrigation ont une salinité élevée, il est possible de faire germer les plantes avec de l'eau douce, mais il n'est pas possible de soumettre les plantes à une adaptation progressive sur une longue période. Partant de ce contexte, nous nous sommes intéressés à connaître d'une part le comportement des jeunes plantules d'*Atriplex halimus* et de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* lorsqu'elles sont soumises à une augmentation soudaine de la salinité (single-

step up approach) et d'autre part les mécanismes intervenant dans la tolérance au sel. Le choix des deux espèces était basé sur leurs caractéristiques agronomiques et écologiques. En effet, l'*A. halimus* est considérée comme une espèce fourragère de bonne qualité nutritive pour les bétails. Elle joue un rôle primordial dans la lutte contre la désertification par la fixation des dunes. Elle peut tolérer l'aridité et la salinité. Sur le plan agronomique, *C. maritimum* constitue une source d'huile végétale par excellence. Elle s'adapte très bien aux fortes concentrations en sels. Ses huiles essentielles pourraient être utilisées à des fins médicinales et en industrie cosmétique (Ben Amor et *al.*, 2005).

Une gamme de salinités (concentrations en NaCl : 0, 34, 85, 171 et 256 mM) a été appliquée sur de jeunes plantules d'*A. halimus* issues de deux populations d'Algérie : population steppique (P1) et population du littoral (P2). Une autre gamme de salinité (NaCl) plus élevée (0, 34, 85, 171, 256, 341, 427 et 512 mM) a été appliquée sur de jeunes plantules de fenouil marin (*Crithmum maritimum*) provenant du littoral algérien. Le stress salin a été appliqué sur une durée de six semaines. Une hypothèse a été également prise en considération dès le début, pour laquelle, les populations exposées à l'environnement naturel plus salé seraient plus tolérantes aux traitements salins les plus élevés et présenteraient également des mécanismes différents ou plus efficaces à la tolérance au sel. Pour cela, cette hypothèse a été concrétisée par des analyses d'ordre physiologiques, biochimiques et génétiques sur les feuilles et les racines des jeunes plantules des deux espèces étudiées à travers le temps (après une semaine, deux semaines et six semaines sous des conditions salines).

# CHAPITRE I

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Présentation des deux espèces : *Atriplex halimus* et *Crithmum maritimum*

#### 1. 1. *Atriplex halimus*

##### 1. 1. 1. Nomenclature

- Nom scientifique : *Atriplex halimus* L.
- Nom vernaculaire français : Pourpier de mer.
- Nom vernaculaire arabe : Gtaf.
- Famille : Chenopodiaceae.

##### 1. 1. 2. Répartition

Le genre *Atriplex* est le plus grand et le plus diversifié de la famille des Chenopodiaceae et compte environ 200 espèces dans les régions tempérées et subtropicales. On trouve également des exemplaires de ce genre dans les régions polaires, bien qu'en nombre très réduit. Généralement, il est associé aux sols salins ou alcalins et aux milieux arides, désertiques ou semi-désertiques (Mulas et Mulas, 2004).

La zone de diffusion de l'espèce *Atriplex halimus* L. s'étend des zones semi-arides aux humides ; elle est très commune le long des côtes du Bassin Méditerranéen (Dejean et Recgros, 1978). En Algérie, le genre *Atriplex* est spontané dans les étages bioclimatiques semi-arides et arides et peut atteindre l'étage humide le long du littoral dans les zones affectées par les embruns marins (Maire, 1962). Plus au sud, l'*Atriplex halimus* a été signalée dans des terrains à nappe phréatique salée, comme In Salah, dans les oueds entre Hoggar et Tassili des Ajjer ou encore au bord des sebkras de Timimoun et d'El Goléa (Ozenda, 1977).

##### 1. 1. 3. Description et caractéristiques principales

L'*Atriplex halimus* L est un arbrisseau buissonnant (50-200 cm), généralement argenté et très ramifié. Feuilles à courts pétioles, jusqu'à 6x4 cm ovoïdes-rhombiques ou ovoïdes. Fleurs unisexuées, étiolées et lancéolées, en petites grappes distantes. Fleurs mâles peu apparentes ; fleurs femelles à deux sépales presque rond, à bord entier ou dentelé (Ingri et Schonfelder, 1988) (figures I. 1, 2 et 3). Cet arbuste fourrager autochtone qui tolère bien les conditions d'aridité (sécheresse, salinité...) peut contribuer à la

valorisation des sols marginaux et dégradés et à l'amélioration des productions végétales et animales dans plusieurs régions démunies.



**Figure I.1** : Aspect morphologique de l'*Atriplex halimus* (Ozenda, 1977).

#### **1. 1. 4. Exigences écologiques**

- *Bioclimat* : semi-aride à hivers chaud à froid.
- *Pluviométries* : 100-500 mm de pluies par an. Nécessite un appoint d'eau sous 200 mm de pluviométrie par concentration de ruissellement ou par présence d'une nappe phréatique à moins de 10 m de profondeur.
- *Température* : supporte l'hiver, des minima absolus peuvent atteindre -5 à -10°C durant la nuit (Sadji, 1987).
- *Sol* : Elle pousse dans des sols pauvres et peu profonds, sur des pentes raides et dans des dépressions avec des sols argileux, salins, alcalins ou gypsifères, ainsi que sur des sols lourds (Abu-Zanat et Louhaichi, 2014). Elle peut apparaître sur des terres en rocailles, talus argileux et dans des zones d'épandage plus ou moins salées (Quezel et Santa, 1962).



**Figure I. 2 (Photo) :** Vue d'ensemble d'*Atriplex halimus* au niveau de littoral (Wilaya de Tipaza).

**A**



**B**



**Figure I. 3 (Photo) :** Reprise de feuillage chez l'*Atriplex halimus* (A : Région d'El Masrane (Djelfa) ; B : Wilaya de Tiapza).

### **1. 1. 5. Mode de multiplication**

Il existe plusieurs modes de multiplication chez l'espèce *Atriplex halimus* ; semis au printemps dans du sable ; bouturage en été en demi-herbacé ; à l'étouffée ou en rameaux ligneux au printemps (Belot, 1978).

### **1. 1. 6. Rôle écologique**

Outre sa qualité fourragère l'*Atriplex* possède un système racinaire très développé fixant les couches supérieures du sol et peut être utilisé comme moyen de lutte contre la désertification. Il constitue un matériel biologique de choix pour l'enrichissement de la flore et la protection du sol dans les zones arides (Belkhodja et Bidai, 2004). Actuellement, dans les régions de l'Afrique du Nord et de l'Asie Occidentale, des milliers d'hectares sont consacrées à la culture d'arbustes fourragers associée aux techniques de conservation de l'eau (Boulanouar et al., 2000).

## **1. 2. *Crithmum maritimum***

### **1. 2. 1. Nomenclature**

- Nom scientifique : *Crithmum maritimum* L.
- Nom vernaculaire français : *Criste marine*, Crithme, Fenouil marin ou Perce-pierre (Littré, 2012).
- Famille : Apiacées (Ombellifères).

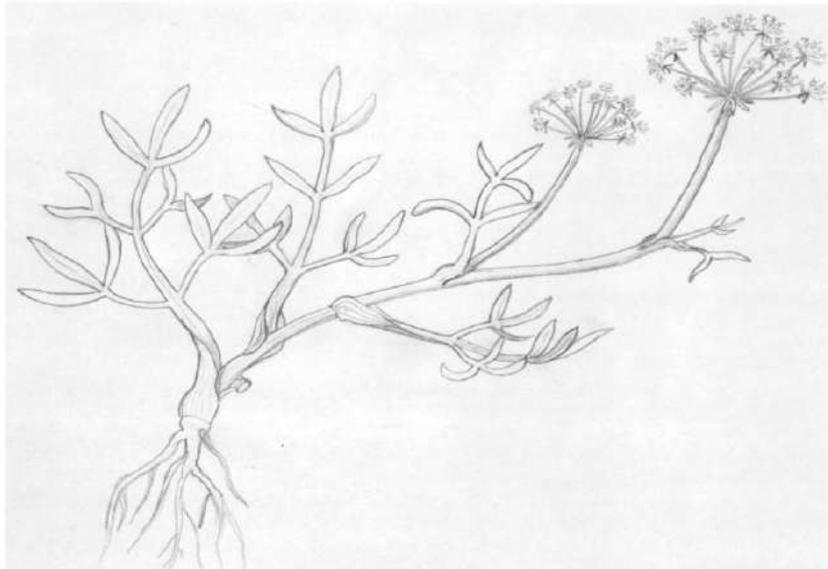
### **1.2. 2. Répartition**

*Crithmum maritimum* est une halophyte présente spontanément sur toutes les côtes de la façade atlantique de l'Europe, y compris les Îles Britanniques, les côtes de la Manche, de l'Afrique du nord, des Îles Canaries et de Madère. Elle pénètre un peu en Mer du Nord (Belgique et Pays-Bas) mais y reste rare et ponctuelle et y surtout présente sur des sites anthropisés (digues, etc.) (Dumont et Mazzacurati, 2013). En Algérie, cette halophyte se localise à proximité immédiate de la mer « dans les anfractuosités des rochers déchiquetés par les vagues, dans la zone des embruns, à pente faible » (Nègre, 1964). Dans ces zones, cette espèce est associée à *Limonium gougetianum* (Nègre, 1964).

### **1. 2. 3. Description et caractéristiques principales**

Le fenouil marin est une halophyte vivace. Il s'agit d'une végétation chamaephytique suffrutescente, d'une hauteur moyenne ne dépassant pas les 30 cm (Khelifi et al., 2008). La criste marine ; *Crithmum maritimum* est une plante à tige herbacée, le plus souvent très simple, sans rameaux, courbée, cannelée, l'ombelle au sommet. Les feuilles succulentes et vertes (Dumont et Mazzacurati, 2013) sont

lancéolées, charnues et alternes (Brisseau-Mirbel et Jolyclerc, 2014). Elles sont caractérisées par la présence d'une gaine à leur base avec un pétiole court se terminant par une lame composée pincée, qui est habituellement divisée en 3 feuillets (Wolfgang, 1982) (figure I. 4 et 5). Les fleurs sont des ombelles composées, très petites de couleur jaune (Males et *al.*, 2003). Le fruit est un akène. C'est un fruit sec ne s'ouvrant pas, dont la paroi est plus ou moins soudée à la graine qu'il contient (figure I.6) ; un akène est disséminé tel quel (Dumont et Mazzacurati, 2013).



**Figure I. 4 :** Fenouil marin *Crithmum maritimum* (Wolfgang, 1982).



**Figure I. 5 (Photo) :** Fenouil marin, *Crithmum maritimum* (Wilaya de Tipaza).

**A**



**B**



**Figure I. 6 (Photo) :** Graines de fenouil marin, *Crithmum maritimum*  
(Dumont et Mazzacurati, 2013 ; (A)) (B) : (Wilaya de Tipaza).

#### 1. 2. 4. Exigences écologiques

- *Bioclimat* : Cette plante croît en étage bioclimatique subhumide variante à hivers chauds (Khelifi et *al.*, 2008).
- *Besoin en eau* : *Crithmum maritimum* a des besoins hydriques faibles liés à l'absence d'eau disponible dans le substrat où elle se développe. Cette absence est accentuée par l'effet desséchant du vent et des embruns.
- *Températures* : la criste marine supporte les expositions en plein soleil, en plein vent et résiste très bien à la sécheresse en stockant l'eau dans ses feuilles charnues. Ses racines s'infiltrant profondément dans la moindre anfractuosité. Cette plante se développe au printemps jusqu'en automne alors qu'en hiver, elle régresse. Les températures optimales moyennes sont de 15°C et 25°C (Okusanya, 1977). *Crithmum maritimum* ne résiste qu'aux gels modérés -5°C à -7°C (Dumont et Mazzacurati, 2013).
- *Sol* : cette halophyte se développe sur des promontoires rocheux (figure I. 7 et 8 (A et B)) et des dalles de grès du Pléistocène et du Pliocène ancien qui surplombent la mer et qui sont situées dans la zone d'influence des vagues, très exposées aux aspersion par les vagues et les embruns (Nègre, 1964) (figure I. 9 et 10). *Crithmum maritimum* est une plante maritime héliophile essentiellement saxicole (c'est-à-dire vivant sur les rochers) et généralement rupicole (c'est-à-dire vivant sur les parois rocheuses plus ou moins verticales). Elle se présente le plus souvent comme un chasmophyte (c'est-à-dire une plante poussant dans les fissures) (Dumont et Mazzacurati, 2013).

#### 1. 2. 5. Mode de multiplication

Le fenouil marin se multiplie par graine et de façon végétative. Il est semé, en sol réchauffé (en pleine terre) ou sous abri, pendant l'automne ou durant le printemps (mars-avril). Le bouturage de tiges au printemps (avant la floraison) ou la division des souches sont également possibles. On peut aussi bouturer des tronçons de racines (Dumont et Mazzacurati, 2013).



**Figure I. 7 :** *Crithmum maritimum* dans une zone rocheuse maritime  
(Dumont et Mazzacurati, 2013).

**A**



**Figure I. 8 A Photo :** *Crithmum maritimum* dans une zone rocheuse maritime  
(Wilaya de Tipaza).

**B**



**Figure I. 8 B (Photo) :** *Crithmum maritimum* dans une zone rocheuse maritime (Wilaya de Tipaza).



**Figure I. 9 :** *Crithmum maritimum* dans une zone rocheuse maritime exposée aux aspersiones par les vagues et les embruns (Dumont et Mazzacurati, 2013).



**Figure I. 10 (Photo) :** *Crithmum maritimum* dans une zone rocheuse maritime exposée aux aspersiones par les vagues et les embruns (Wilaya de Tipaza).

### **1. 2. 6. Rôle écologique et utilisation**

*Crithmum maritimum* L. est une halophyte typique des écosystèmes du littoral (Abdelly et *al.*, 2006). Cette espèce montre une haute tolérance au sel pendant la croissance végétative (Ben Amor et *al.*, 2005) et supporte également la sécheresse (Dumont et Mazzacurati, 2013). Étant naturellement tolérant au sel, le fenouil marin pourrait être utilisé comme une culture alternative sur des sols salins (Grigoriadou et Maloupa, 2008). En Algérie, *Crithmum maritimum* est officiellement protégée par le décret exécutif n° 12-03 du 10 Safar 1433 (4 janvier 2012). La plante est en effet rare dans cette zone et considérée comme menacée (Dumont et Mazzacurati, 2013).

*Crithmum maritimum* est une plante comestible et considérée comme une source de minéraux (Guil-Guerrero et *al.*, 1998) à haut potentiel antioxydant (Siracusa et *al.*, 2011). Cette plante halophyte a une action tonique et purgatoire. Les feuilles présentent des propriétés digestives et diurétiques (Cunsolo et *al.*, 1993). Les feuilles sont riches en plusieurs composés tels que la vitamine C, les caroténoïdes, les flavonoïdes, ainsi que des substances bioactives pouvant être utilisées pour des usages aromatiques, médicamenteux, antimicrobiens et insecticides (Ozcan et Ermen, 2001). Ses huiles essentielles pourraient être utilisées à des fins médicinales et en industrie cosmétique (Ben Amor et *al.*, 2005). Les graines de *C. maritimum* ont une valeur et une quantité appréciable d'huile potentiellement comestible due à ses acides gras dont la composition est proche de l'huile d'olive (Zarrouk et *al.*, 2004). Cette halophyte pourrait agir comme une nouvelle source d'huile comestible (Weber et *al.*, 2007).

## **2. Salinité**

### **2. 1. Définition de la salinité**

La salinité est un facteur écologique constitué par la teneur en sels (NaCl) dans des eaux ou dans des sols. Dans de nombreux écosystèmes, la salinité est un facteur limitant. L'excès des sels dans les sols empêche le développement d'une végétation normale, seules quelques plantes halophiles étant capables d'y croître (Ramade, 2002).

En pédologie, la salinité correspond à la quantité de sels présents dans la solution du sol. Certains sels peu solubles sont sous la forme de cristaux ou d'efflorescences (cas de gypse) mais, le plus souvent, ils sont sous une forme dissoute. Des anions et cations étant présents dans la solution du sol (Baize, 2016). Elle est mesurée à l'aide de la conductivité électrique (CE à 25°C) de l'extrait de pate saturée (Mathieu et Lozet, 2011).

La salinisation est un ensemble de mécanismes suivant lesquels le sol s'enrichit en sels solubles et acquière, à un degré plus ou moins fort, le caractère salé (Lozer et Mathieu, 1990).

## **2. 2. Principales sources de sels**

La salinisation peut être "primaire" c'est-à-dire héritée des conditions naturelles, liées par exemple à la présence des couches géologiques salées. Elle peut également être "secondaire" c'est-à-dire liée à l'activité de l'homme et en particulier aux pratiques d'irrigation.

### **2. 2. 1. Salinisation "primaire"**

Les principales sources de la salinisation primaire sont (Cheverry et Bourrie, 1998) :

- *Océan* : dans ce cas, l'accumulation des sels se fait par l'intermédiaire de l'atmosphère, qui peut véhiculer des sels dissous dans l'eau de pluie, mais surtout de très fines particules hygroscopiques, sous forme d'aérosols. Ces sels sont rabattus vers le sol lors de précipitations et sédimentent également par temps sec. Le phénomène est très significatif à proximité du littoral marin, mais peut s'avérer non négligeable au coeur même des continents (Bresler et *al.*, 1982). La majeure partie des anions chlorures et sulfates, une partie mineure mais non négligeable du sodium et du magnésium vient ainsi indirectement de l'océan. Dans ces conditions, le faciès hydrochimique des eaux est "chlorure- sodique" ou "sulfate-sodique».
- *Lithosphère* : du fait de l'altération des roches constituant les îles océaniques ou la croûte continentale. Il s'agit surtout dans le premier cas de basaltes, dans le deuxième cas de granites ou de roches voisines, et des sels dissous résultant de réactions hydrolyses aluminosilicates et des ferromagnésiens. Dans les roches de la lithosphère continentale, le sodium et le calcium sont plus abondants que le magnésium et le potassium, et les eaux appartiennent donc aux faciès hydrochimiques "bicarbonate-calcique" et "bicarbonate- sodique".
- *Sels fossiles* : c'est l'origine principale des phénomènes de salinisation primaire observés à travers le globe. Il peut s'agir soit de nouveaux évaporitiques (roches), soit des solutions du sol salées emprisonnées dans des sédiments d'origine marine. Beaucoup de pays sont concernés, les sels ainsi remis en circulation pouvant être plutôt d'origine continentale (Caucase, Mandchourie, Mongolie, Tchad...), d'origine marine (les deltas anciens), et ce parfois par des phénomènes

d'artésianisme, remontant en surface des eaux salines fossiles très profondes (Asie Centrale, Afrique du Nord...).

### **2. 2. 2. Salinisation "secondaire"**

Un caractère salin accompagne aussi très fréquemment la mise en valeur des terres par irrigation (salinité secondaire) ou il est induit par la médiocre qualité de l'eau utilisée, par les engrais ou par des pratiques agricoles mal conduites et en particulier l'absence de drainage (Capon et *al.*, 2016). Le phénomène de salinisation est une cause de la désertification suite à l'accumulation de sels dans le sol, ce qui nuit aux cultures.

### **2. 3. Différents types de salinités**

On distingue deux types de salinité des sols : les sols salins (solontchaks) et les sols alcalins (Solonetz).

Les sols salins présentent, du point de vue morphologique, les caractéristiques de surface des « Solontchaks » : efflorescences salines (chlorures et sulfates sodiques et magnésiens) ou horizon superficiel friable. En sol argileux, la structure est nettement prismatique, avec parfois des faces de glissement (Jamagne, 2011). Les sols salins sont surtout fréquents dans les zones arides, où l'irrigation provoque l'accumulation de sels ; que les précipitations ne suffisent pas à évacuer (Raven et *al.*, 2011).

Les sols alcalins (Solonetz) ; ce sont des sols présentant des teneurs en sels alcalins (carbonates et bicarbonates) avec un pH supérieur à 8,8 ce qui empêche la croissance de la plupart des plantes. Le sodium échangeable représente moins de 15% du complexe d'échange (Baize, 2016).

Les sols salés peuvent être classés en différentes classes de salinités en fonction de la conductivité électrique (CE) de l'extrait de la pâte saturée (tableau I. 1).

**Tableau I. 1** : Classes de la salinité du sol en fonction de la conductivité électrique de l'extrait de la pâte saturée et de la somme des anions (Servant, 1975).

	<b>Désignation</b>	<b>CE mmho/cm à 25°C</b>	<b>Somme des anions (mél/l)</b>
<b>0</b>	Non salé	< 2,5	< 2,5
<b>1</b>	Faiblement salé	2,5 – 5	25 – 50
<b>2</b>	Moyennement salé	5 – 10	50 – 105
<b>3</b>	Salé	10 – 15	105 – 165
<b>4</b>	Fortement salé	15 -20	165 – 225
<b>5</b>	Très fortement salé	20 – 27,5	225 – 315
<b>6</b>	Excessivement salé	27,5- 40	315 – 620
<b>7</b>	Hyper salé	>40	>620

## **2. 4. Répartition des sols salés dans le monde et en Algérie**

### **2. 4. 1. Répartition des sols salés dans le monde**

Sur une base mondiale, environ un tiers de toutes les terres agricoles sont de plus en plus salines. Ce problème de salinité est une conséquence de processus naturels et l'interférence humaine. Il s'étend à plus de 100 pays, et il se rencontre dans tous les types de climats. Des statistiques précises sur l'étendue des sols affectés par le sel ne sont pas disponibles en dépit de l'importance du problème, mais certaines estimations de l'étendue des dommages ont été réalisées. Une enquête du Programme Environnemental des Nations Unies publiée au début des années 1990 montre que les sols salés ont souvent une distribution inégale, avec des problèmes de sels affectant de 2 à 357.6 Mha ou plus les sols dans une région (tableau I. 2 et 3) (Squires, 2011).

Les terrains salés se rencontrent surtout le long des côtes maritimes, dans les zones salées et humides, et à l'intérieur des terres dans les zones arides (Ulrich et *al.*, 1992). Les terres irriguées salinisées représentent environ 10% de la salinisation due à des actions humaines (qui correspondent à 20% des terres salinisées), Près de 50% des terres irriguées

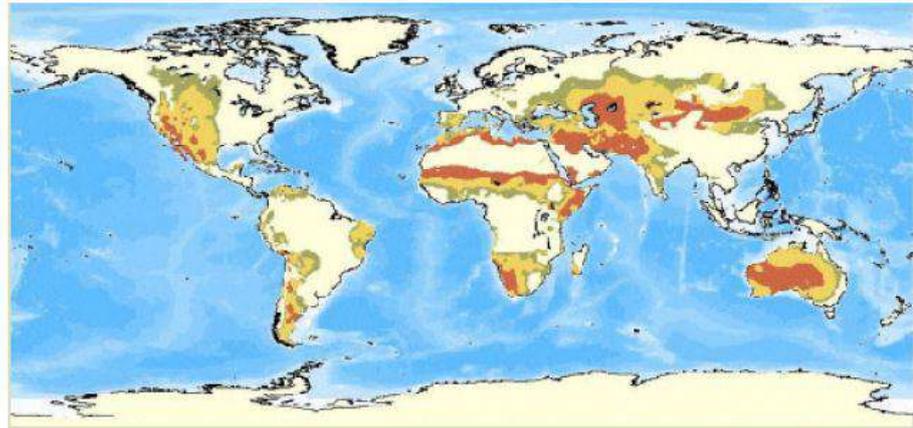
salinisées se trouvent dans la zone aride (figure I. 11) (FAO, 2006). En effet, le problème de la salinisation s'accroît avec l'extension des superficies irriguées (Oudija et Ismaili, 2002). Le risque de voir de nouvelles terres perdues par salinisation s'est fortement accru depuis 20 ans par suite de l'extension des terres irriguées (tableau I. 4) (Ramade, 2002).

**Tableau I. 2 :** Distribution mondiale des zones touchées par le sel (Squires, 2011).

<b>Continent</b>	<b>Saline (Mha)</b>	<b>Sodique (Mha)</b>	<b>Total (Mha)</b>
<b>Afrique</b>	122.9	86.7	209.6
<b>Asie du sud</b>	82.2	1.8	84.0
<b>Asie nord et centrale</b>	91.4	120.1	211.4
<b>Asie du sud est</b>	20.0	-	20.0
<b>Amérique du sud</b>	96.4	59.8	129.2
<b>Amérique du Nord</b>	6.2	9.6	15.8
<b>Mexique</b>	20	-	2.0
<b>Australie</b>	17.6	340.0	357.6
<b>Total</b>	411.7	617.9	1029.5

**Tableau I. 3 :** L'étendue globale de la salinisation induite par l'homme dans les zones arides sensibles (Mha) (Squires, 2011).

<b>Continent</b>	<b>léger</b>	<b>modéré</b>	<b>fort</b>	<b>extrême</b>	<b>Total (Mha)</b>
<b>Afrique</b>	3.3	1.9	0.6	-	5.8
<b>Asie</b>	10.7	8.1	16.2	0.4	35.4
<b>Amérique du sud</b>	0.9	0.1	-	-	1.0
<b>Amérique du Nord</b>	0.3	1.2	0.3	-	1.8
<b>Europe</b>	0.8	1.7	0.5	-	3.0
<b>Australie</b>	-	0.5	-	0.4	0.9
<b>Total</b>	16.0	13.5	17.6	0.8	47.9



**Zone d'aridité**  
■ Aride  
■ Semi-aride  
■ Sec à Sub-humide

**Figure I. 11** : La carte mondiale des terres arides. Source : UNEP/GRID 1991  
 Dans WRI (FAO, 2006).

**Tableau I. 4** : Dégradation des terres cultivées par la salinisation des divers pays au cours de la dernière décennie (Ramade, 2002).

<b>Pays</b>	<b>Surfaces irriguées en 10<sup>3</sup> ha</b>	<b>Accroissement (en %)</b>	<b>% atteint par le sel</b>
<b>Egypte</b>	2474	12	40
<b>Soudan</b>	1700	2	20
<b>Etats unis</b>	19830	19	25
<b>Chine</b>	45420	6	15
<b>Inde</b>	39800	18	27
<b>Iran</b>	5730	3	30
<b>Irak</b>	1750	11	50
<b>Pakistan</b>	15320	13	40

## **2. 4. 2. Répartition des sols salés en Algérie**

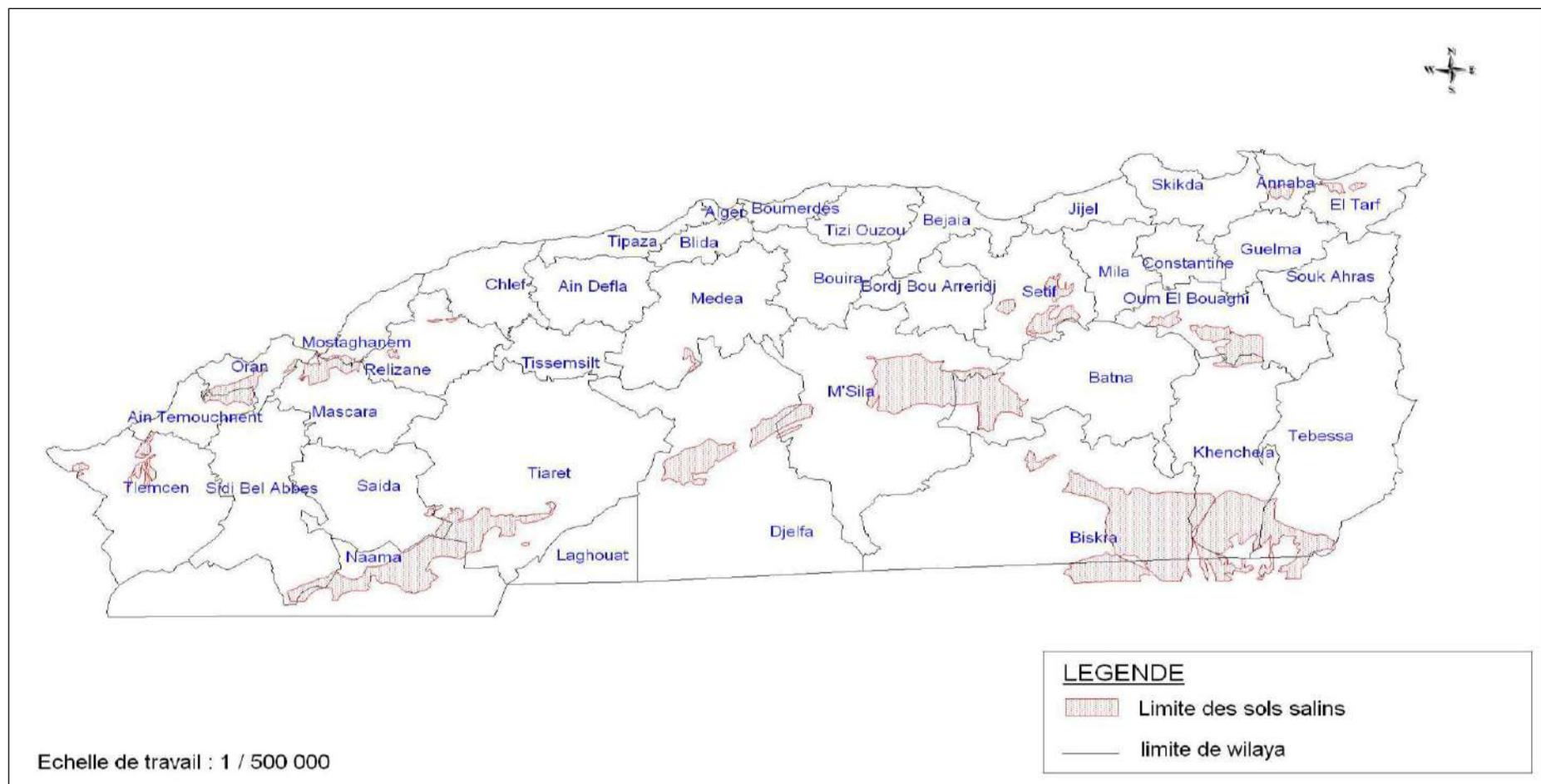
En Algérie, il n'est recensé aucune étude cartographique fiable et précise permettant de délimiter les zones touchées par la salinité des terres et la quantification de la teneur des sels dans le sol. Néanmoins il existe quelques données fragmentaires qui donnent une idée générale sur le phénomène de salinité et de la dégradation des terres (Anonyme, 2008). D'après Szablocs (1989), 3,2 million d'hectares subissent à des degrés de sévérité variable, le phénomène de salinisation dont une bonne partie se trouve localisée dans les régions steppiques où le processus de salinisation est plus marqué du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient.

Ce phénomène de salinisation des sols est observé dans les plaines et vallées de l'Ouest du pays (Mina, Cheliff, Habra Sig, Maghnia) dans les hautes plaines de l'Est (Constantine, Sétif, Bordj Bou Arreridj, Oum El Bouagui), aux abords des Chotts et de Sebkhass (Chott Ech Chergui, Chott Gharbi, Chott Hodna, Chott Melghir, Sebkhass d'Oran, de Benziane, Zemmoul, Zazhrez Gharbi et Chergui, etc..) et dans le grand Sud (dans les Oasis, le long des oueds, etc..) (figure I. 12) (Anonyme, 2008).

## **2. 5. Problématique du sol et de l'eau en Algérie**

### **2. 5. 1. Présentation générale actuelle**

L'eau est considérée comme le plus important facteur pour l'agriculture en Algérie. Les potentialités hydriques naturelles de l'Algérie sont estimées actuellement à 18 milliards de m<sup>3</sup> par an dont l'irrigation présente 62 % de la demande total du pays (Mozas et Ghosn, 2013). Cette eau est à la fois rare et mal répartie sur le territoire national. La région littorale du Nord, qui regroupe les bassins méditerranéens et ne représente que 7% de la surface du territoire national avec 90% du total des écoulements superficiels du pays (estimée à 12,4 milliards de m<sup>3</sup> par an), le reste étant partagé entre les Hauts Plateaux pour 6% et les bassins sahariens pour 4% (Benblidia et Thivet, 2010). Depuis le début des années 2000, le gouvernement algérien a pris des mesures importantes pour sortir de la situation de la pénurie d'eau qui touchait le pays. La nouvelle politique de l'eau s'est structurée autour de 2 axes stratégiques : 1)- Le développement de l'infrastructure



**Figure I. 12 :** Répartition des sols salins du nord de l'Algérie (Anonyme, 2008).

hydraulique : barrages, transferts, stations de dessalement d'eau de mer, stations d'épuration etc, 2) - La réforme institutionnelle du secteur de l'eau qui vise à promouvoir une meilleure gestion de la ressource (Mozas et Ghosn, 2013). Mais cette politique est caractérisée par une prise en compte insuffisante de l'agriculture bien qu'elle soit le premier poste consommateur d'eau, avec près de 65% des prélèvements au niveau national. L'agriculture irriguée n'a pas l'importance qu'elle devrait avoir dans les stratégies nationales sur l'eau. Elle ne figure pas au rang de dossier prioritaire dans le programme quinquennal 2009-2014, priorité étant clairement donnée aux ouvrages de mobilisation de l'eau et à l'alimentation en eau potable (Benblidia et Thivet, 2010). En effet, Les superficies irriguées couvrent 620.687 ha soit 7,34% de la SAU totale (8.458.680 ha) et sont localisées dans 287 456 exploitations soit 28 % du total des exploitations. L'utilisation de la SAU irriguée par les principales cultures en 2001 s'établit comme suit : arboriculture : 41,2% ; cultures maraîchères et industrielles : 33% et 25,8% pour les grandes cultures dont 3% de la sole céréalière est irriguée ; 76,8% de la sole maraîchère de plein champ est irriguée ; 95,5% des plantations de palmiers dattiers sont irriguées ; 95% des vergers agrumicoles sont irrigués (Anonyme, 2003). Selon Benblidia et Thivet (2010), la limitation des superficies irriguées dans l'ensemble du pays est liée à la sécheresse qui a sévi au cours des dernières décennies et à de nombreux facteurs externes au secteur hydro-agricole, tels que : la faiblesse de la planification des ressources en eau liée au manque de coordination sectorielle et intersectorielle, à l'absence d'outils pour établir des prévisions et définir des règles de gestion de la pénurie. S'ajoutent à cela des facteurs internes tels que la dégradation des infrastructures par manque d'entretien, les importantes pertes dans les réseaux évaluées à plus de 40% en moyenne, les gaspillages liés au faible prix de l'eau agricole, une situation difficile pour les offices nationaux et la cessation d'activité pour la majorité des offices de wilaya. Ces auteurs préconisent donc la réforme du secteur hydro-agricole qui apparaissant ainsi indispensable et fortement souhaitée par l'ensemble des acteurs.

## **2. 5. 2. Gestion de l'irrigation dans le milieu salin en Algérie**

En Algérie, la majorité des périmètres irrigués sont confrontés aux problèmes de salinité qui diffèrent selon les régions bioclimatiques agro-pédologiques. La dégradation avancée du sol suite à l'action conjuguée de l'irrigation, la salinité des eaux, l'insuffisance et/ou l'absence de drainage et la rareté des amendements organiques est marquée (Daoud et Halitim, 1994).

La problématique de salinité est rencontrée pratiquement au niveau de la quasi-totalité des terres agricoles : la steppe est affectée par la salinité sur une superficie d'un million d'hectare ; la région Ouest avec 400 000 hectares (périmètres du Bas Chelif, la Mina, Habra Sig et l'Oranais) et 100 000 hectares pour le sud (Kessira, 2002).

L'extension de l'agriculture en irriguée et l'utilisation intense des ressources en eau dans un pays chaud et sec entraînent inévitablement l'apparition du problème de salinité des sols et des eaux. L'Algérie qui offre toutes les variantes du climat méditerranéen n'échappe pas à cette règle, où la sécheresse observée depuis longtemps, a conduit manifestement au processus de salinisation des sols sur 3,2 millions d'hectares affectés (Moulay et Bidai, 2004).

A ce titre, et devant la détérioration de la situation et son évolution incontrôlée qui constitue une menace réelle sur les superficies agricoles utiles, des mesures strictes et urgentes ont été prises pour la mise en valeur des sols salés et ce par les plans nationaux d'actions de lutte contre la désertification et la salinité qui consistent à :

- Préserver certaines zones favorables de la dégradation par la salinisation ;
- Identifier le matériel végétal local adapté, par l'introduction et sélection des espèces tolérantes au sel et adaptées aux conditions locales ; l'identification, la sélection et l'introduction des espèces adaptées aux conditions locales de chaque site retenu :
  - Espèces autochtones : *Salsola vermiculata*, *Atriplex halimus*, *Atriplex glausa*, *Kochia prostrata*.
  - Espèce exotiques : *Atriplex indulata*, *Atriplex lentiformis*, *Atriplex nummularia*, *Atriplex canescens*, *Kochia prostrata*.
  - Culture fourragères en irrigué : plusieurs espèces adaptées à la salinité des sols et des eaux seront testées, ainsi que d'autres espèces locales, exemple : la luzerne.
- Déterminer les conditions d'adaptation et de tolérance du système sol-eau-plante dans un milieu salin ;
- Acquérir les connaissances techniques et scientifiques nécessaires pour la gestion de ce phénomène dans les différentes régions du pays ;
- Vulgariser les techniques.

### **2. 5. 3. Désertification et Salinité**

Plusieurs termes ont été utilisés pour décrire les phénomènes de dégradation des écosystèmes par l'avancée du sable à savoir : désertisation, extension des déserts, avancement des déserts. Le terme désertisation était utilisé par les écologues francophones (Le Houérou, 1976), alors que le terme désertification était utilisé plutôt par les écologues anglophones. Mais en septembre 1977 suite à la conférence des Nations Unies qui a eu lieu à Nairobi (Kenya) sur la désertification le terme désertification a été adopté et il a été traduit dans toutes les langues. La définition de la désertification donnée durant cette conférence est comme suit : la désertification est la diminution ou la destruction du potentiel biologique de la terre et peut conduire finalement à l'apparition de conditions désertiques. Elle est liée également à la dégradation des terres dans les zones arides, semi-arides et subhumides sèches due à des facteurs divers parmi lesquels les variations climatiques et les activités humaines (Nahal, 2004). Vue l'importance que prennent la désertification et l'ensemble des autres problèmes environnementaux et climatiques, l'ONU revient à la charge et organise en 1992, à Rio de Janeiro, au Brésil, le troisième Sommet de la Terre, soit la Conférence des Nations unies sur l'environnement et le développement. De cette conférence naîtra la convention sur la diversité biologique, la convention-cadre des Nations unies sur les changements climatiques et également la convention des Nations unies sur la lutte contre la désertification (Rémillard, 2011).

Chaque année, 10 millions d'hectares de terres arables se dégradent à l'échelle mondiale. En Chine plus de 10.000 Km<sup>2</sup> par an sont envahis par le désert (le désert de Gobi) ; 2,3 milliards de personnes (40 % de la population mondiale) vivent dans des zones dégradées. L'Asie est la région la plus touchée (1,4 milliards d'hectares en voie de désertification). 74% des terres africaines sont également touchées (Arrignon, 2011). En Algérie, la désertification est le problème le plus inquiétant. Le phénomène est présent dans les zones steppiques et semi-arides ; elle est due aux surpâturages et aux labours mal contrôlés (Chenntouf, 2008). Les régions steppiques couvrent 32 millions d'hectares (9% du territoire) 20 millions d'ha de parcours steppiques et 12 millions d'ha de parcours présahariens). Ce sont les écosystèmes les plus sensibles à la désertification (Nedjraoui, 2009). La désertification progresse vers le nord du pays et signifie une régression du couvert végétal ou carrément la disparition du sol cultivable dont le processus aboutit à une réduction continue et parfois irréversible de

la biodiversité et de la productivité des ressources naturelles (Chenntouf, 2008).

La sécheresse est caractérisée à la fois par une diminution des précipitations et une augmentation de l'évaporation. Les sels solubles remontent donc par capillarité à la surface des sols, où ils forment des croûtes, ou des structures poudreuses. Les remontées capillaires et la salinisation sont d'autant plus importantes qu'il existe une nappe phréatique peu profonde et salée. Dans ces zones, seules subsistent des plantes halophytes, où toute autre végétation disparaît (Boivin et Le Brusq, 1985).

La lutte contre la désertification et la promotion d'un développement durable sont étroitement liées, compte tenu de l'importance sociale et économique des ressources naturelles et de l'agriculture. Les meilleures pratiques à préconiser afin de limiter le phénomène de désertification et de salinité sont les suivantes :

- Augmentation de la résilience des populations.
- Amélioration de la gestion des terres.
- Diversification de la production.
- Restauration des terres.
- Contrôle de l'érosion.
- Utilisation de sources d'énergie non ligneuses.

### **3. Réponse des plantes au stress salin**

#### **3. 1. Définition du stress et son origine**

Le terme populaire, de stress est un mot anglais, sans équivalent en français, très utilisé de nos jours dans la vie courante. Venant du latin *stringere*, serrer, qui évoque une situation de pression et de contrainte, c'est un terme ambigu, employé dans un sens différent selon les auteurs (Bounhoure et *al.*, 2012). Ce mot stress est emprunté au vocabulaire des métallurgistes, qui désignaient ainsi les modifications d'un métal soumis à des forces de pression, d'étirement ou de torsion. En 1914, le physiologiste américain Cannon l'a transposé à la régulation hormonale des émotions, chez l'animal (cité par Selye, 1950). En 1945, les deux psychiatres militaires américains Roy Grinker et Jhon Spiegel l'appliquent à la pathologie psychiatrique de guerre, dans leur ouvrage intitulé *Men Under Stress*, pour désigner l'état psychique des soldats soumis aux émotions du combat (cité par Crocq, 2012). En 1950, le physiologiste canadien Hans Selye adopte le terme stress pour désigner ce qu'il appelait depuis 1936 le « syndrome général d'adaptation » ou réaction physiologique standard de l'organisme soumis à une agression, quelle que soit la nature de cette agression (Crocq, 2012).

En 2009, le terme « stress » est apparu dans le titre de 632 articles dans le sujet domaine de la science des plantes. Le physiologiste des plantes, Jacob Levitt a suggéré que les termes « stress » et « force (strain) » en biologie pourraient être liés au concept utilisé en mécanique. En ces termes, le stress est la force appliquée par unité de surface à un objet et, en réponse au stress, l'objet est tendu et change de dimension. Ainsi, pour Levitt, le sens biologique du stress est «un facteur externe agissant sur un organisme (par exemple. Les barres de stress hydrique)», tandis que la force est «tout changement physique ou chimique produit par un stress». Levitt a pris ces analogies plus loin, compte tenu des contraintes élastiques et plastiques et leurs modules, mais peu de scientifiques de plantes lui ont suivi dans cette terminologie (cité par Hodson et Bryant, 2012).

La meilleure définition possible du stress en biologie est « la force adverse ou d'influence qui tend à inhiber le fonctionnement du système normal ». On peut en conclure que le stress chez les plantes est difficile à définir, mais on peut maintenir cette définition ; le stress « est l'inhibition de la croissance et d'autres processus par un facteur externe » (Hodson et Bryant, 2012).

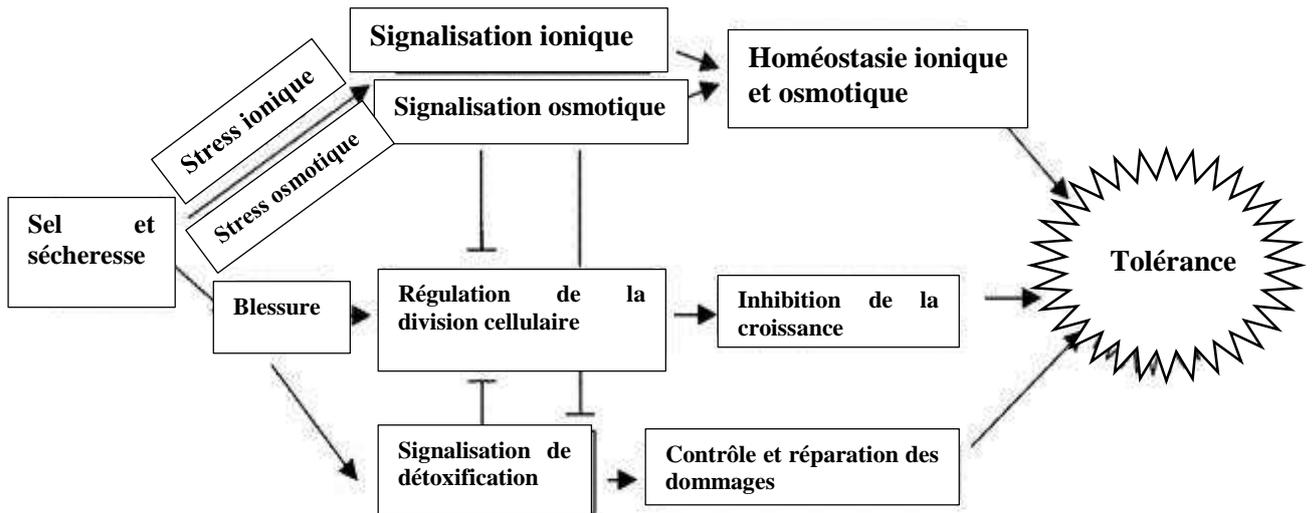
### **3. 2. Définition du stress salin**

Le stress salin désigne soit la surcharge en sel, soit les conséquences physiologiques induites par l'excès de sel (Dutuit et Gorenflot, 2016).

Le stress salin peut être considéré comme le premier facteur de stress chimique rencontré au cours de l'évolution de la vie sur terre. Les premiers organismes vivants étaient des formes marines et même aujourd'hui les biotopes saumâtres sont colonisés par des organismes marins plutôt que par des organismes d'eau douce. Ainsi, dès le début, les organismes doivent avoir développé des mécanismes efficaces pour la régulation ionique et pour la stabilisation des structures protoplasmiques. Après avoir développé la capacité de faire face au sel dans la cellule et d'autres ajustements impliquant l'ensemble de l'organisme, les halophytes se sont bien adaptés pour survivre dans des habitats fortement salins (Larcher, 2003). Le stress salin pose deux problèmes à l'organisme végétal. D'une part, le sel abaisse le potentiel hydrique du sol et menace l'approvisionnement en eau de la plante. D'autre part, la présence de sel dans les tissus de la plante perturbe son fonctionnement physiologique. Donc, hormis les plantes halophytes (végétaux poussant naturellement dans les milieux salins), le sel est un véritable poison pour les plantes (Clergeau et Machon, 2014).

### 3. 3. Effet du stress salin sur les plantes

La salinité affecte presque tous les aspects du développement des plantes, y compris la germination, la croissance végétative, et le développement du système reproducteur. La salinité du sol impose une toxicité ionique, stress osmotique, une carence en nutriments (N, Ca, K, P, Fe, Zn) et le stress oxydatif sur les plantes (Setlow, 2005) (figure I. 13).



**Figure I. 13 :** La démarcation fonctionnelle des voies de signalisation du stress salin et du stress hydrique (stress osmotique et stress ionique) (Zhu, 2002).

#### 3. 3. 1. Stress osmotique

La salinité du milieu est susceptible d'induire un stress supplémentaire, lié à la diminution de la pression osmotique du sol. L'eau du sol devient alors moins disponible même si la nappe est résurgente d'où l'apparition d'un déficit hydrique qui modifie le potentiel hydrique foliaire et la transpiration des plantes (Joseph, 2009). Le stress osmotique se produit lorsque la concentration des molécules en solution en dehors de la cellule est différente de celle à l'intérieur de la cellule. Lorsque cela se produit, l'eau circule dans ou hors de la cellule par osmose, ce qui modifie l'environnement intracellulaire. Ainsi, le stress osmotique est l'une des principales composantes du stress salin (Srivastava et al., 2013). La salinité impose la perte de turgescence dans les tissus végétaux, qui est due à une diminution du potentiel hydrique. Une forme de sécheresse physiologique qui rend de plus en plus difficile l'acquisition d'eau et de nutriments par les

plantes (figure I. 14). La relation du potentiel hydrique extérieur ( $w$  ou  $\Psi$ ) avec la pression hydrostatique ( $P$ ) et la pression osmotique des plantes est la suivante (Hopkins, 2003) :

$$\Psi = P - \pi$$

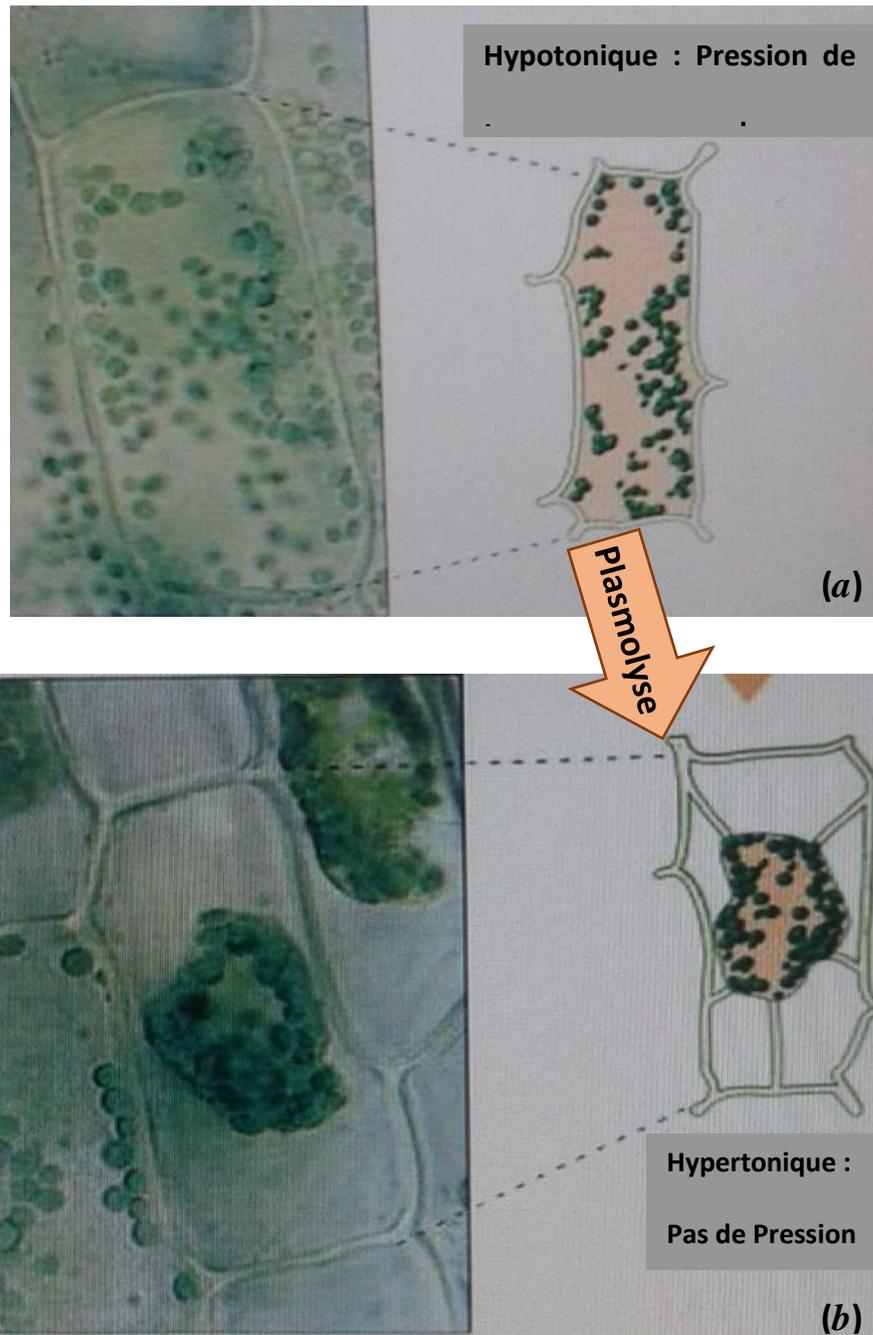
Il est clair de l'équation au-dessus qu'avec la diminution de  $\Psi$ , le maintien de la turgescence exigera une augmentation de  $\pi$  (le potentiel osmotique) de la même magnitude. La perte de la pression hydrostatique affecte la croissance des plantes. Sous stress salin, les plantes échappent à la déshydratation, en réduisant leur potentiel osmotique et en ajustant avec des osmolytes, qui aident dans le transport, l'accumulation et la compartimentation des ions inorganiques et des solutés organiques (Ahmad et *al.*, 2012).

### **3. 3. 2. Toxicité ionique (stress ionique)**

Le stress ionique est principalement causé par la toxicité du sodium pour les plantes. Certaines espèces végétales sont également sensibles à la toxicité du chlore. Dans certains sols salins, la toxicité ionique est encore aggravée par un pH alcalin (Venkateswarlu et *al.*, 2011).

La salinité du sol provoque la formation de  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  qui affecte la composition ionique absorbée par les plantes. Le stress salin affecte directement la croissance des plantes par le stress osmotique et la toxicité ionique provoquée par des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  qui favorisent le déséquilibre dans le métabolisme des éléments nutritifs des plantes.

Les taux élevés des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  dans les cellules végétales sont considérés comme des éléments clés de dommages ioniques. Il existe différentes études et évaluations qui traitent de la connexion des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  homéostasie avec la tolérance au stress salin des plantes. Un ratio de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  élevé peut déranger les différentes voies enzymatiques d'action dans le cytoplasme. Le stress causé par des ions est lié à une baisse de la teneur en chlorophylle d'où une sénescence des feuilles et le début de la chute des feuilles. Le stress ionique diminue par conséquent la photosynthèse, la biomasse et le rendement (Azooz et Ahmad, 2016).



**Figure I. 14** : Effets de l'osmose sur une cellule végétale. (a) les plantes aquatiques vivant dans l'eau douce sont dans un environnement hypotonique. L'eau a donc tendance à pénétrer dans les cellules, créant une pression de turgescence. (b) si la plante est mise dans une solution hypertonique, comme l'eau de mer, les cellules perdent de l'eau et la membrane plasmique se sépare de la paroi cellulaire (Karp, 2010).

### 3. 4. Comportement des plantes vis-à-vis du stress salin

Les plantes sont classées par les écologistes comme **glycophytes** ou **halophytes** en fonction de leur capacité à croître dans un milieu riche en sel. La plupart des plantes sont glycophytes et ne peuvent pas tolérer le stress salin. Les premiers signes de la salinité chez les plantes sont :

- La mauvaise germination.
- La fragmentation de la cuticule et les blessures de la membrane cellulaire augmentent la perte de solutés.
- La croissance végétative des glycophytes est inhibée (diminution de la croissance des pousses et la croissance des racines).
- Les feuilles brûlantes et les marbrures.
- Chez les glycophytes, l'inhibition de la croissance des plantes induite par le sel est accompagnée par un dysfonctionnement métabolique, y compris la diminution du taux photosynthétique et les changements dans l'activité enzymatique photosynthétique.
- La salinité diminue la production des hydrates de carbone ou les hormones de croissance d'où l'inhibition de la croissance.
- Les concentrations en sel élevées peuvent affecter défavorablement l'activité des enzymes en influençant la structure de la protéine.
- La salinité affecte négativement l'équilibre nutritionnel des plantes (Miransari, 2014).

La plupart des cultures céréalières et cultures maraîchères sont glycophytes et sont très sensibles à la salinité du sol, même lorsque la  $CE_e$  du sol  $< 4 \text{ dSm}^{-1}$ . Des cultures telles que le haricot (*Phaseolus vulgaris*), l'aubergine (*Solanum melongena*), le maïs (*Zea mays*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), et la canne à sucre (*Saccharum officinarum*) sont très sensibles, avec un seuil de  $CE < 2 \text{ dSm}^{-1}$ , alors que la betterave sucrière et l'orge sont très sensibles à la salinité pendant la germination, mais ils sont très tolérants pendant les phases ultérieures de développement des cultures (Setlow, 2005).

#### ➤ Les halophytes

Littéralement le mot halophyte signifie « plante du sel » et qui est utilisé pour désigner toute plante capable de croître et de se reproduire dans les zones soumises à une forte salinité pendant la totalité ou une partie substantielle de temps (Squires et Ayoub,

2012). Les halophytes représentent environ 1% de la flore du monde (Jackson et *al.*, 2013).

En fonction des caractéristiques morphologiques et anatomiques, les halophytes sont divisées en :

- Halosucculentes (Halosucculents), telles que *Camphorosma annua*, *Plantago maritima*, *Aster tripolium* et *Atriplex littoralis*, qui végètent dans des conditions croissantes en salinité et en sécheresse en particulier dans la seconde moitié de la saison de croissance et ont pu évoluer en maintenant l'eau dans les feuilles en raison du régime pauvre en eau.
- Halomésomorphes (Halomesomorphs), en termes d'adaptation morphologique et anatomique les halomésomorphes (halomesomorphs), sont situées entre halosucculentes et haloxérophytes : *Taraxacum bessarabicum*, *Scorzonera cana*, *Lotus tenuis*, *Ramunculus pedatus*, *Hordeum hystrix*, *Crypsis alopecuroides*.
- Haloxérophytes (Haloxerophytes) englobe les espèces végétant dans des biotopes qui sont modérément humides au printemps et secs pendant l'été et l'automne, et souvent accompagnés par une forte salinité : *Achillea setacea*, *Artemisia santonica*, *Limonium gmelini*, *Festuca pseudovina* et *Juncus gerardi* (Ahmad et *al.*, 2012).

Les halophytes douées d'une pression osmotique élevée peuvent absorber l'eau dans un sol salé jusqu'à une certaine limite au-delà de laquelle, l'excès de sels bloque l'eau du sol (c'est la sécheresse physiologique) ou intoxique les cellules. Lorsque la concentration en sels est trop forte, les halophytes réagissent de façons différentes, certaines :

- Bloquent leur absorption, *Artemisia maritima*, *Atriplex* ;
- Augmentent leur succulence, réduisent leur transpiration. Salicornes ;
- Excrètent des sels par leurs feuilles, *Tamaris* (Faurie, 2011).

De nombreuses halophytes utilisent le sel comme osmoticum pour équilibrer la concentration en milieu extérieur. Chez les halophytes, l'exclusion du sel est le moyen le plus commun pour survivre sous des concentrations élevées en sels. Les halophytes excrètent plus de 50% du sel entrant dans les feuilles. La majorité des plantes cultivées, de nombreuses halophytes dicotylédones et la plupart des monocotylédones halophytes sont de type exclueurs (excluders) du sel, et seulement quelques dicotylédones halophytes sont de type accumulateur du sel. Il est surprenant que les plantes domestiquées et

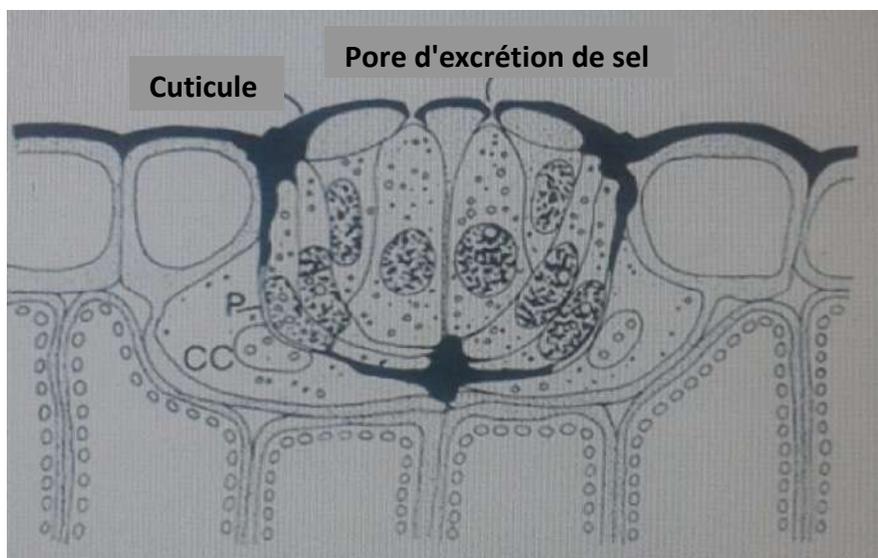
sélectionnées pour la tolérance au sel soient des monocotylédones de type exclueurs, tandis que les espèces naturellement résistantes au sel sont la plupart du temps de type accumulateur du sel (Pandey, 2015).

Les espèces de type exclueurs du sel (avec un mécanisme d'exclusion de sel inefficace) montrent une faible sélectivité des ions salins au niveau de la membrane plasmique des racines et les cellules parenchymateuses du xylème. Ces espèces accumulent rapidement un taux élevé d'ions salins dans les racines. Ces derniers vont rapidement atteindre les pousses y compris les jeunes et les vieilles feuilles. Si ces espèces n'ont pas un mécanisme efficace pour emmagasiner ces sels dans la vacuole et les vieux tissus, la concentration ionique va rapidement atteindre des niveaux de toxicité élevés dans le cytoplasme des jeunes feuilles. Ce type de plantes glycophytes sont relativement plus sensibles à la toxicité saline et ne peuvent pas assurer un mécanisme d'exclusion ionique efficacement. Paradoxalement, les espèces halophytes de type accumulateurs du sel peuvent l'accumuler à des taux extrêmement élevés dans les feuilles (cas des Chénopodiacées) (Carels et *al.*, 2012). Cependant il existe des halophytes à exclusion ionique mais ces dernières doivent synthétiser des solutés osmotiques pour répondre aux exigences de la pression de turgescence. Cette caractéristique adaptative peut être d'une importance même dans les espèces qui ont des glandes de sel ou vessies (Pessarakli, 2016).

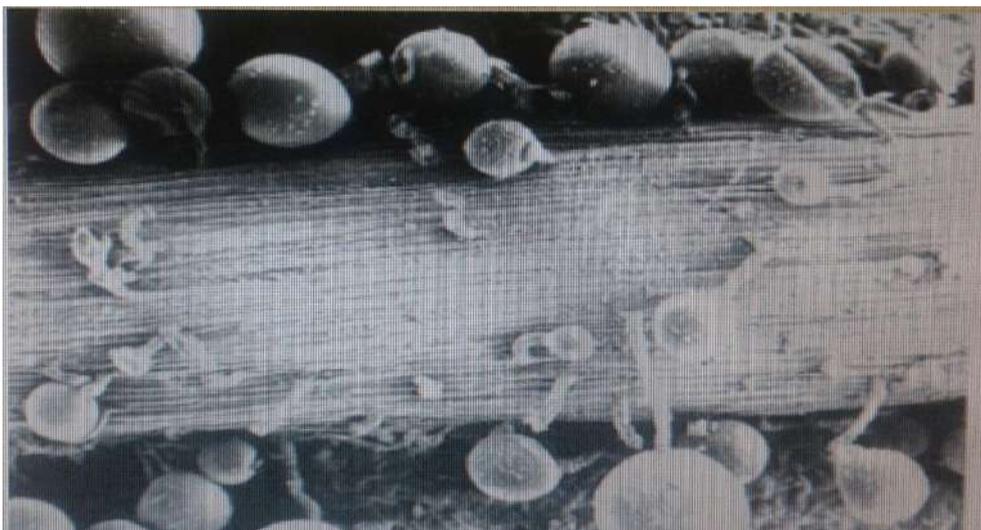
Les plantes de type accumulateur de sel, comme l'arroche (*Atriplex* spp), Salicorne (*Salicornia* spp), *Suaeda* (*Suaeda* spp), sont en général beaucoup plus tolérantes au sel souvent en raison de leurs tissus et leur capacité métabolique qui fonctionne bien dans les conditions de salinité élevée. Ces plantes ont évolué pour tolérer des niveaux élevés en sel dans leurs tissus. Beaucoup sont capables de survivre remarquablement dans une forte salinité, mais toujours succombent à un certain niveau ou seuil de sel au-dessus duquel leur productivité descend brutalement, même si elles peuvent survivre dans des conditions hypersalines (Khan et Weber, 2006). Les caractéristiques des accumulateurs du sel sont : absorption rapide, régulation de la concentration en sel interne et la tolérance de la machinerie métabolique à la concentration élevée d'électrolyte (Sen et Rajpurohit, 2012).

Un autre exemple d'accumulateurs de sel c'est le cas des Plumbaginacées, tamarix et divers plantes de mangrove qui possèdent habituellement des glandes multicellulaires de sel (figure I. 15). Ces cellules épidermiques complexes éliminent le NaCl à partir des cellules de mésophylles, lesquelles sont reliées par de nombreux plasmodesmes et

sécrètent le sel à la surface de la feuille où une couche de cristaux de sel est formée (Mohr et Schopfer, 2012). Chez les *Atriplex*, des poils multicellulaires (1-3 cellules) se développent dans les glandes du sel (figure I. 16). La cellule terminale de ces glandes deviendra une cellule de la vessie (bladder cell) et développe une large vacuole dans laquelle le sel est activement transporté. La cellule ainsi formée est supportée par une ou deux cellules de soutien. Ces cellules sont épaisses, imperméables, cutinisées et ne contiennent pas de vacuole. Elles maintiennent la direction du sel et le débit d'eau. Les ions  $\text{Cl}^-$  s'accumulent dans la vacuole des cellules basales de l'épiderme par transport actif, puis le sel passe des cellules basales vers les cellules de soutien pour être utilisé par la vacuole de la cellule de la vessie (Smith et *al.*, 2009) (figure I. 16).



**Figure I. 15 :** Glandes à sel de *Limonium vulagre* (Mohr et Schopfer, 2012).



**Figure I. 16 :** Chénopodiacées. Poils de la vessie sur la surface inférieure des feuilles de *Chenopodium bonus-henricus* x 90 (Kubitzki et *al.*, 2013).

### **3. 5. Réponses adaptatives des plantes au stress salin**

Les adaptations des halophytes rappellent celles des xérophytes (plantes adaptées à la sécheresse) en particulier en ce qui concerne leur morphologie (apparence de plantes grasses à rameaux articulés : cas des salicornes de Camargue), leur réduction de l'appareil foliaire (exemple des Tamarix) et leur physiologie (excrétion de sels par leurs feuilles et circulation de l'eau assurée par absorption sélective d'ions) (Lamy, 1995).

#### **3. 5. 1. Adaptations morphologiques et anatomiques des halophytes**

##### ➤ *Succulence*

La caractéristique la plus frappante entre les halophytes est qu'elles sont presque toutes des plantes succulentes : les feuilles sont épaisses, charnues (contenant des tissus de stockage d'eau), et plus ou moins translucides. Cela est dû d'une part à l'abondance de suc cellulaire et la pauvreté en chlorophylle, et d'autre part à la petite taille des espaces intercellulaires. Parmi ces espèces à feuilles juteuses et épaisses : *Lotus corniculatus*, *Geranium robertianum*, *Convolvulus arvensis*, *Matricaria inodora*, *Hieracium umbellatum*, *Solanum dulcamara* (Grigore et al., 2014) et plus spécialement les Chénopodiacées (Ahmad et Malik, 2013). La succulence augmente la teneur en eau au sein des grandes vacuoles pour minimiser la toxicité du sel. Le passage des ions de sels vers les vacuoles permet d'écarter la toxicité du cytoplasme et des organelles des cellules (Lieth et al., 2008).

##### ➤ *Cellules productrices de mucilages*

Les plantes succulentes stockent l'eau dans des cellules spécialisées dans les tiges, les feuilles et les racines, souvent sous la forme d'un mucilage qui ne s'évapore pas rapidement (Rickard, 2011).

Les cellules productrices du mucilage et les cellules scléreuses se retrouvent fréquemment entre les cellules palissadiques ou dans le cortex de la tige comme chez *Rhizophora* et *Sonneratia* (Pandey et Chadha, 1993). Chez les halophytes, les cellules productrices de mucilages sont développées, comme chez les xérophytes, le tissu hypodermique aqueux se trouve chez les espèces qui possèdent plus de feuilles coriaces, par exemple dans les plantes des mangroves (Grigore et al., 2014).

##### ➤ *Suc cellulaire*

De grandes quantités de sels (ions) peuvent se produire dans le suc cellulaire d'où l'augmentation de la concentration interne des cellules par apport à la solution du sol

(Grigore et *al.*, 2014). Dans le suc cellulaire environ 87% des ions  $\text{Cl}^-$  sont neutralisés par  $\text{Na}^+$  et seulement 5,8% par  $\text{K}^+$  (Brown, 2013).

➤ ***Tissu palissadique***

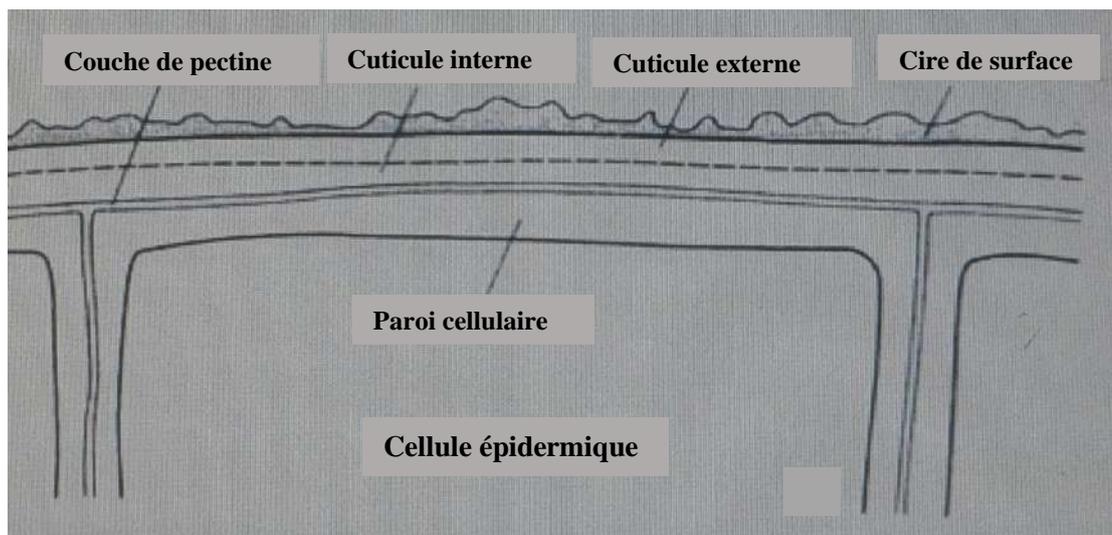
De nombreuses espèces de Chénopodiacées sont caractérisées par des feuilles à mésophylle palissadique qui est situé en périphérie, tandis que les sels en excès sont stockés dans les vacuoles de son cœur charnu parenchymateux (Bowes et Mauseth, 2012).

➤ ***Espaces intercellulaires***

Les espaces intercellulaires sont régulièrement petits. Chez les halophytes succulente, l'excès du  $\text{Na}^+$  peut être pompé à partir des cellules de plantes halophiles à la fois dans l'espace intercellulaire par l'intermédiaire du plasmalemme et dans les vacuoles à travers le tonoplaste (Brouwer et *al.*, 2012). Dans les feuilles âgées, en raison d'une faible densité de trichomes, le sel est accumulé dans des espaces intercellulaires situés dans le mésophylle, participant de cette manière dans l'ajustement osmotique et la protection de l'activité métabolique dans le cytoplasme (Lieth et Mochtchenko, 2013). Une diminution des espaces intercellulaires est souvent observée avec l'augmentation de la salinité afin de réduire la transpiration, comme chez l'*Aster tripolium* ou *Beta vulgaris* ssp. *maritima* (Pessarakli, 2016).

➤ ***Cire***

Certaines halophytes sont caractérisées par des cuticules épaisses ou la sécrétion de la cire sur la surface des feuilles, qui confinent l'évaporation des stomates (comme les espèces d'arroche) (Huddart et Stott, 2013) (figure I. 17).



**Figure I. 17 :** Structure d'une cuticule typique de la plante (épaisseur fortement exagérée) (Forbes et Watson, 1992).

➤ **Revêtement de poils**

La majorité des halophytes sont sans poils. Mais certaines espèces possèdent des poils comme le cas de : *Kochia hirsuta*, *Senecio candicans* et *Tournefortia gnaphalodes*. Les halophytes à poils sont généralement des plantes de sable ; certaines ont des poils spéciaux emmagasinant de l'eau. Ces poils sont larges, sphériques, à paroi mince, ils ont un aspect perlé, comme chez l'*Atriplex*, *Obione* et *Mesembryanthemum* (Grigore et al., 2014).

➤ **Feuilles coriaces et luisantes**

Les feuilles coriaces et luisantes caractérisent les arbres et les arbustes dans les marécages de mangroves et la végétation alliée, par exemple chez : *Rhizophora* et *Nipa fruticans*, et aussi dans les forêts littorales de sable. *Limonium gmelini* et *Lepidium crassifolium* ont aussi des feuilles coriaces (Grigore, 2012).

➤ **Stomates**

Les densités et les ouvertures stomatiques des plantes halophytes sont faibles. Elles sont de quelques dizaines de stomates par mm<sup>2</sup> avec des ouvertures moins de 10 µm de diamètre, par rapport à des centaines de stomates par mm<sup>2</sup>, avec des ouvertures de plus de 15 µm de diamètre chez beaucoup de glycophytes. Les stomates des halophytes sont souvent situés dans des cryptes au-dessous de la surface des feuilles et / ou entourés de papilles ou trichomes. La faible surface, le rapport surface : volume des organes de succulence, organisation stomatique, photosynthèses de type C<sub>4</sub> et cuticules profondes produisent des taux faibles de transpiration par unité de biomasse. Ce qui aide les halophytes à soulever les défis osmotiques de la salinité, par la réduction de l'évaporation (Willey, 2015).

➤ **Trachéides**

Certaines espèces halophytes ont des cellules sécrétoires ou des tissus trachéides arrondis avec des terminaisons de veines. Ces trachéides ont des structures semblables aux glandes de sel et de poils de sel (Dickison, 2000). Les trachéides sont impliquées dans l'équilibre de l'eau des plantes, la tolérance au sel, le support mécanique et le stockage de l'eau ou de l'air. Elles sont situées entre les cellules palissadiques, approximativement perpendiculaires aux épidermes, sans connexion directe ni avec l'épiderme, d'une part, ni avec le système vasculaire de la plante, d'autre part (Grigore et Toma, 2010).

➤ **Lignification**

Il a été démontré que la lignification intense due à l'activité de cambiums successifs peut être stimulée par la salinité. Par conséquent, cela pourrait conférer une résistance mécanique des cellules à la haute pression osmotique de la solution du sol (Grigore et Toma, 2010). Cependant, chez les espèces Chénopodiacées, les organes qui sont touchés par des phénomènes de cambiums successifs, une énorme quantité de lignine a été distinguée dans la structure tertiaire de ces organes (Grigore et al. , 2014).

➤ **Idioblastes**

Idioblastes, sous la forme de cellules de pierre, peuvent se produire dans la palissade ou d'un tissu aqueux (par exemple : *Sonneratia*, *Rhizophora*, *Carapa*, et d'autres plantes de mangroves, et *Scaevola koenigii*) (Grigore et al. , 2014).

➤ **Structures sécrétrices du sel**

Les structures sécrétrices du sel (soit en tant que poils de sel ou des glandes de sel) sont en grande partie rencontrées chez les halophytes. En fait, les halophytes possédant des structures du sel sont incluses dans un groupe distinct, appelé crynohalophytes (excrétant le sel « salt excreting »). La sécrétion est un mécanisme complexe chez les halophytes, comportant des dispositifs spécialisés construits pendant leur évolution afin d'éliminer l'excès des sels d'organes aériens des plantes (Grigore et al. , 2014).

➤ **Structures anatomiques Kranz**

Un autre mécanisme adaptatif lié à la photosynthèse de type C<sub>4</sub>, est la configuration que l'on appelle l'anatomie de type Kranz (*kranz*= couronne), dans la structure des feuilles de certaines espèces Chénopodiacées (Grigore et Toma, 2010). C'est la caractéristique des plantes en C<sub>4</sub> qui représente souvent une organisation particulière « en couronne », dite *anatomie de type Kranz*. Cette disposition fait que la distance de diffusion de CO<sub>2</sub> jusqu'au site initial de carboxylation dans les cellules de mésophylle est courte. Ce faible parcours de diffusion allié à une distribution uniforme de la PEPcase dans le cytosol permet un piégeage plus efficace du CO<sub>2</sub>, d'où l'amélioration de la capture du CO<sub>2</sub> (Hopkins, 2003).

### **3. 5. 2. Adaptations physiologiques**

#### **3. 5. 2. 1. Ajustement osmotique**

Les halophytes sont adaptées à un faible potentiel par leur capacité d'ajustement osmotique. Il est largement admis que la turgescence de la cellule est maintenue par le stockage des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> dans les vacuoles, avec la possibilité d'ajustement par

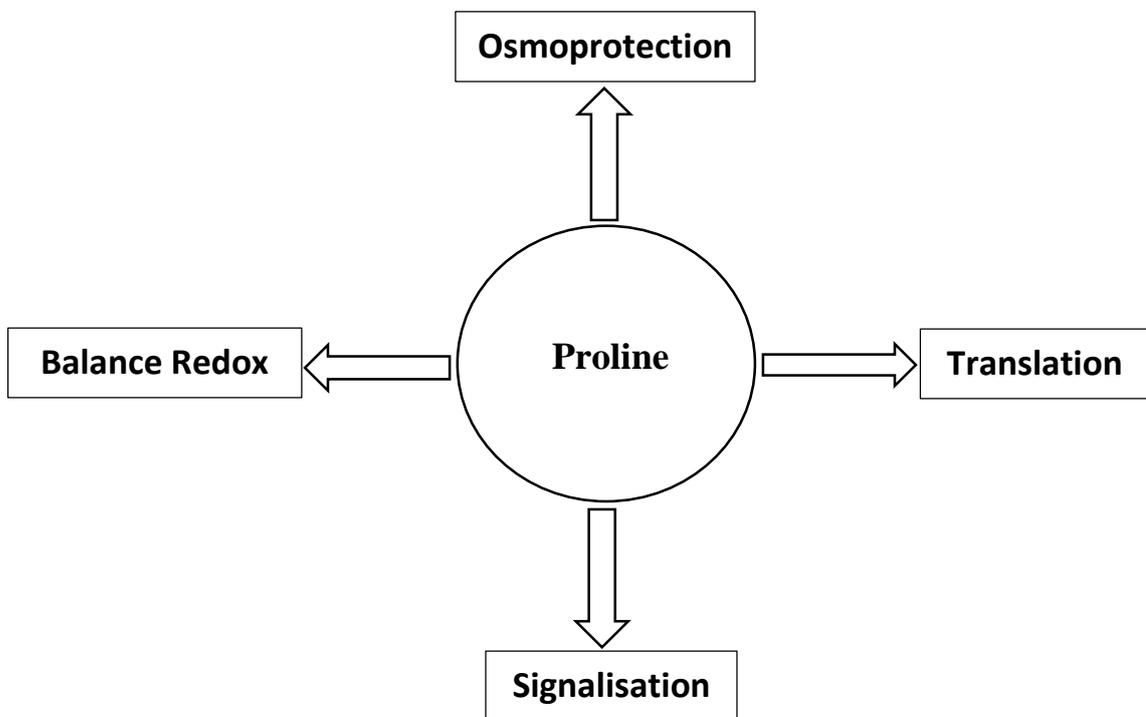
l'accumulation des solutés du cytosol tel que le  $K^+$  et de solutés organiques. Les trois principaux ions inorganiques :  $Na^+$ ,  $K^+$  et  $Cl^-$ , représentent 80 à 95% de la pression osmotique du suc cellulaire chez les halophytes, et par conséquent, les halophytes accumulent des quantités importantes ( $> 10\%$  du poids sec) de  $Na^+$  et  $Cl^-$  dans leurs pousses, principalement dans les vacuoles. Elles ont donc un rapport vacuoles/  $Na^+$  cytosol plutôt élevé ( $\sim 5$ ), et en même temps, un ratio cytoplasme / vacuole  $K^+$  élevé ( $\sim 4$ ) (Turkan, 2011). L'ajustement osmotique permet de maintenir la conductance stomatique et la photosynthèse au faible potentiel hydrique, retarder la sénescence et la mort des feuilles, de réduire l'avortement des fleurs et d'améliorer la croissance des racines et l'extraction de l'eau (Yadav et *al.*, 2010). Chez les halotolérantes l'ajustement osmotique du cytoplasme est atteint par l'accumulation de solutés compatibles. Les deux osmolytes majeurs sont la glycine- bêtaïne et la proline, bien que d'autres tels que l'inositol, le pinitol, le sorbitol, le mannitol et l'ononitol ont été également signalés (Turkan, 2011).

➤ **Osmolytes**

L'ajustement osmotique est habituellement maintenu par la synthèse de solutés compatibles intracellulaires (les osmolytes) par le maintien de l'homéostasie ionique dans le cytoplasme. L'homéostasie ionique est contrôlée par des mécanismes d'absorption sélective d'ions à travers la membrane plasmique et par les flux d'ions à travers le tonoplaste. Chez les plantes, ces procédés sont principalement maintenus par les concentrations cytoplasmiques de  $K^+$ . Sous les conditions salines et quand le ratio  $Na^+/K^+$  dans l'environnement des racines est élevé, l'absorption sélective des ions par la membrane racinaire est perturbée par la fuite des ions  $Na^+$  dans le cytoplasme. Dans ces conditions salines, seuls les halophytes sont capables de maintenir l'ajustement osmotique avec efficacité (Lieth et Mochtchenko, 2013). Dans les solutions salines, les solutés compatibles ont la capacité de préserver l'activité enzymatique, de stabiliser la structure quaternaire des protéines, de désintoxiquer les espèces chimiques réactives de l'oxygène (Reaction oxygen species (ROS)), et de maintenir l'équilibre osmotique à l'intérieur de la cellule par l'afflux d'eau en continu (Dagar et *al.*, 2016). Ces osmolytes ont très moins d'effet sur le pH ou la charge de la balance du cytosol. Un coût énergétique élevé est dépensé pour synthétiser ces composés organiques pour rendre la tolérance des plantes à la salinité plus élevée et permettre ainsi leur survie (Chakraborty et Chakraborty, 2015).

- ***Proline***

La proline joue un rôle clé dans la régulation osmotique des plantes soumises à des contraintes hyperosmotique, principalement la sécheresse et la salinité. Donc elle joue un rôle adaptatif dans la tolérance au stress salin (Ahmad et *al.*, 2012) en contribuant à l'ajustement osmotique, la détoxification des ROS, et la protection de l'intégrité de la membrane (Pessarakli, 2016). La proline agit également comme une source de carbone, d'azote et d'énergie de réserve lors du rétablissement après le stress (Anjum et *al.*, 2014). Chez les plantes, la voie biosynthétique de la proline se fait à partir du glutamate produit par l'action d'une enzyme de détermination,  $\Delta$ 1-synthétase pyroline-5-carboxylate d'éthyle (P5CS). Puis l'enzyme Proline déshydrogénase (PDH), catalyse le produit de la biosynthèse (Tuteja et *al.*, 2012) (figure I. 18).

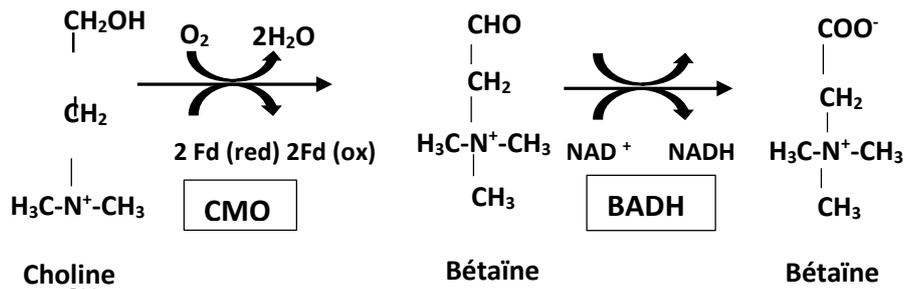


**Figure I. 18 :** Fonction multiple de la proline (Ahmad et *al.*, 2012).

- ***Glycine bétaine***

Glycine bétaine a pour rôle de protéger la plante en maintenant l'équilibre de l'eau entre la cellule végétale et son environnement et par la stabilisation des macromolécules (Tuteja et *al.*, 2012). Elle réduit également la peroxydation des lipides au cours du stress salin (Huang, 2016). Ce composé organique est principalement localisé dans les chloroplastes et joue un rôle essentiel dans l'ajustement des chloroplastes et la protection

des membranes des thylacoïdes, maintenant ainsi l'intégrité de la membrane plasmique et l'efficacité photosynthétique. Les plantes synthétisent la glycine bêtaïne par une oxydation de la choline en deux étapes : choline → bêtaïne aldéhyde → glycine bêtaïne. La première réaction est catalysée par une ferrédoxine-dépendante choline monooxygénase (CMO), et la deuxième étape par une NAD<sup>+</sup> dépendante de la bêtaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH) (Tuteja *et al.*, 2012) (figure I. 19).

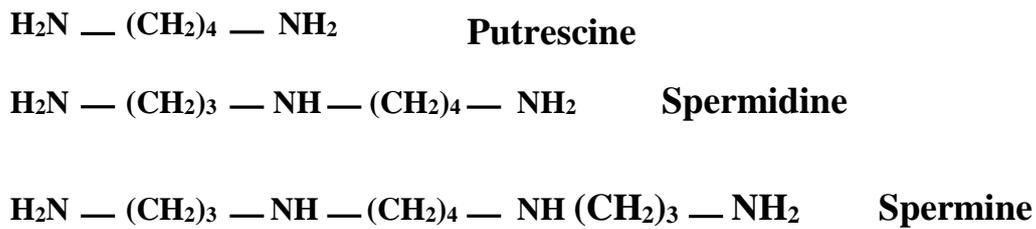


**Figure I. 19** : Biosynthèse de la glycine-bêtaïne (Cherry *et al.*, 2012).

- **Polyamines**

Les polyamines sont des molécules polycationiques à faible poids moléculaire. Elles jouent plusieurs rôles dans la croissance normale et le développement des plantes telle que la régulation de la prolifération cellulaire, l'embryogenèse osmotique, levée de dormance des tubercules et la germination des graines, dans le développement des fleurs et des fruits, et la sénescence (Dagar *et al.*, 2016). La biosynthèse des polyamines part de l'arginine et de la lysine. De plus la synthèse de la spermidine et de la spermine passe par la S-adenosylméthionine, qui est un intermédiaire de la synthèse de l'éthylène. Dans les cellules végétales les polyamines sont fréquemment conjuguées avec des composés phénoliques, comme l'acide hydroxycinnamique appelé également acide coumarique ou l'acide caféique. Ces formes conjuguées peuvent être aussi actives que les formes libres (Hopkins, 2003). Les trois principales polyamines présentes chez les plantes sont : la putrescine (Put), la spermidine (Spd) et spermine (Spm). Elles jouent un rôle important dans les réponses des plantes aux divers stress tel que la salinité, l'osmolarité élevée, l'hypoxie et le stress oxydatif (Ahmad *et al.*, 2013) (figure I. 20). Il a été suggéré que l'augmentation de la concentration de polyamine peut être considérée comme un indicateur du stress chez les plantes. La première démonstration de l'implication des

polyamines dans la réponse au stress a été mise en évidence par l'accumulation de putrescine en réponse au niveau suboptimal de  $K^+$ . Depuis lors, le lien entre les niveaux de putrescine accrus et plusieurs stress abiotiques a été établi. Récemment, il a été démontré l'implication des polyamines dans la protection des plantules contre les effets néfastes de la salinité (Huang, 2016). L'augmentation des polyamines a été révélée chez plusieurs espèces telles que le riz, le sorgho, le maïs et la tomate sous stress salin (Lamattina et Polacco, 2007).



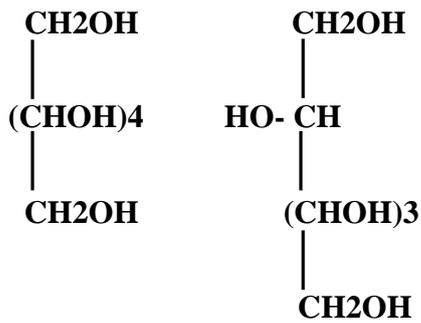
**Figure I. 20** : Structure chimique des trois polyamines communes (Hopkins, 2003).

- **Sucres solubles**

Les sucres solubles comme le saccharose, le tréhalose, etc, sont impliqués dans plusieurs processus métaboliques et se comportent comme des signaux moléculaires, de régulation de différents gènes impliqués dans la photosynthèse, le métabolisme du saccharose et la synthèse d'osmolytes. Sous haute teneur en sel, ces sucres solubles non seulement agissent comme osmoregulateurs mais évitent également la dénaturation des protéines membranaires. Ils aident également à la chélation du  $\text{Na}^+$  avec des granules d'amidon, facilitant ainsi la détoxification (Tripathi et Müller, 2015). Une forte corrélation entre l'accumulation de sucre et la tolérance au stress osmotique a été signalée chez plusieurs espèces végétales (Tuteja et *al.*, 2012).

- **Polyols**

L'accumulation des polyols, le mannitol et le sorbitol a été rapportée chez plusieurs espèces végétales pour assurer la tolérance au stress salin (Tripathi et Müller, 2015). Parmi leurs fonctions dans la physiologie cellulaire et la biochimie : ils sont des solutés compatibles à faible poids moléculaire, qui contribuent à l'élimination des ROS et à l'ajustement osmotique dans le cytosol (Pessarakli, 2016) (figure I. 21).



**Figure I. 21** : Principaux polyols du stress salin (Borg, 2004).

### 3. 5. 2. 2. Systèmes de défense par les antioxydants

Les systèmes de défense par les antioxydants comprenant à la fois les antioxydants enzymatiques (superoxyde dismutase "SOD", catalase et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion) (Miransari, 2014) et les antioxydants non enzymatiques (acide ascorbique, tocophérols, et glutathion "GSH" (Ashraf et *al.*, 2010) qui jouent un rôle important dans la tolérance au stress abiotique. Les plantes contenant des niveaux élevés d'antioxydants peuvent détoxifier les ROS et contribuant ainsi à l'augmentation de la tolérance au sel. Des variations considérables dans la production d'antioxydants, tant enzymatiques et non enzymatiques, en réponse au stress salin sont évidentes au niveau interspécifique ou intraspécifique (Ahmad et *al.*, 2012).

#### ➤ *Antioxydants non enzymatiques*

- *Acide ascorbique*

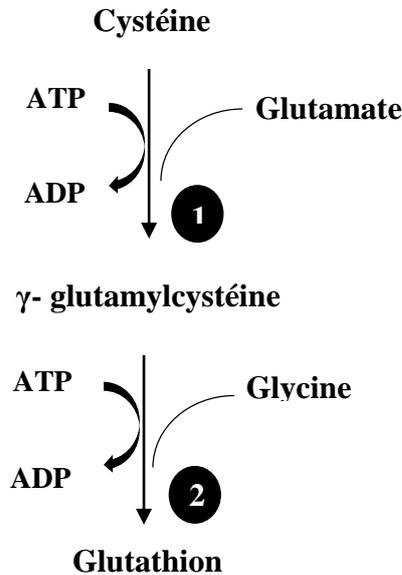
Ascorbate (ASA) ou l'acide ascorbique (vitamine C) est un antioxydant important des tissus végétaux. Il est synthétisé dans le cytosol des plantes supérieures principalement de la conversion de D-glucose à l'ascorbate. Il a été démontré qu'il a un rôle essentiel dans différents processus physiologiques chez les plantes : la croissance, la différenciation et le métabolisme. Il fonctionne comme un réducteur pour de nombreux radicaux libres, ce qui minimise les dommages causés par le stress oxydatif. Les plantes avec un taux élevé en ascorbate montrent une meilleure protection contre le stress oxydatif. L'acide ascorbique réagit avec une gamme de ROS tels que le peroxyde ( $\text{O}_2^-$ ), l'hydroxyl radical ( $\text{OH}^\cdot$ ), et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Ahmad et *al.*, 2012). L'acide ascorbique est un composé naturel, avec son activité antioxydante joue un rôle central dans l'adaptation de la cellule végétale au stress salin (Alhasnawi et *al.*, 2015).

- ***Tocophérols***

Les tocophérols sont des antioxydants lipophiles clés, en particulier les  $\alpha$ -tocophérol qui sont des capteurs efficaces de différents ROS, tel que  $^1\text{O}_2$  (oxygène singulet) et les lipides radicaux (Hakeem et *al.*, 2013).  $\alpha$ -tocophérol est synthétisé dans les chloroplastes et les proplastides, il se trouve dans les membranes des cellules, en particulier dans les membranes de thylakoïdes des chloroplastes et il protège ces membranes des dommages oxydatifs en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique (Biswal et *al.*, 2013). Il est donc indispensable pour la protection des membranes biologiques. Le déficit en tocophérols conduit à une augmentation de la peroxydation des lipides. Sous diverses conditions environnementales défavorables, les tocophérols interviennent en collaboration avec d'autres antioxydants, tels que l'ascorbate (ASC) et le glutathion (GSH), contribuant au maintien d'un état redox approprié particulièrement dans les chloroplastes (Gupta et *al.*, 2016). Différentes espèces végétales peuvent accumuler  $\alpha$ -tocophérol afin d'améliorer leur résistance à la salinité et au déficit hydrique (Hakeem et *al.*, 2013).

- ***Glutathion (GSH)***

Glutathion (GSH qui est la forme réduite) est un élément essentiel du système de défense antioxydant. Il joue un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire redox et la signalisation du stress (Ahmad, 2015). Les concentrations élevées en glutathion chez les plantes résistantes au sel indiquent le rôle primordial du glutathion dans la tolérance au sel (Neumann et *al.*, 2008) dont il assure la protection des membranes en maintenant l' $\alpha$ -tocophérol et la zéaxanthine dans un état réduit. GSH empêche la dénaturation des protéines provoquées par l'oxydation des protéines du groupe thiol sous l'effet du stress (Venkateswarlu et *al.*, 2011). La biosynthèse du glutathion est assurée par la glutathion réductase (GR) qui recycle le glutathion oxydé (GSSG) au glutathion (GSH) en utilisant NADPH pour rétablir la GSH réduite (Khan et *al.*, 2015) (figure I. 22).



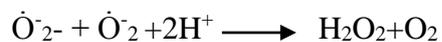
**Figure I. 22 :** Synthèse de glutathion (Roberfroid, 2008).

(1) Glutamylcystéine ; (2) Glutathion synthétase.

➤ *Antioxydants enzymatiques*

• *Superoxide dismutase (SOD)*

Les superoxydes dismutases sont considérés comme étant le mécanisme qui protège les plantes contre l'anion radical superoxyde. Chez les plantes, il existe trois types de superoxyde dismutase, qui se distinguent par la structure de leurs centres actifs : superoxyde dismutase qui contient dans son centre actif du cuivre et du zinc (CuZn-SOD), du manganèse (Mn-SOD) et du fer (Fe- SOD). Tous les superoxydes distumases catalysent la réaction de dismutation avec des taux identiques. Le résultat final est la formation du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène (Roshchina et Roshchina, 2013).



SOD nettoie ces radicaux superoxydes qui se traduisent par la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ainsi produit est éliminé par une catalase ou l'ascorbate peroxidase (APX) (Roshchina et Roshchina, 2013). Une forte augmentation de l'activité de la SOD a été enregistrée chez plusieurs espèces halophytes soumises au stress salin (*Rhizophora stylosa*, *Crithmum maritimum* et *Bruguiera gymnorhiza*) (Jain et Gupta, 2013).

- ***Catalase***

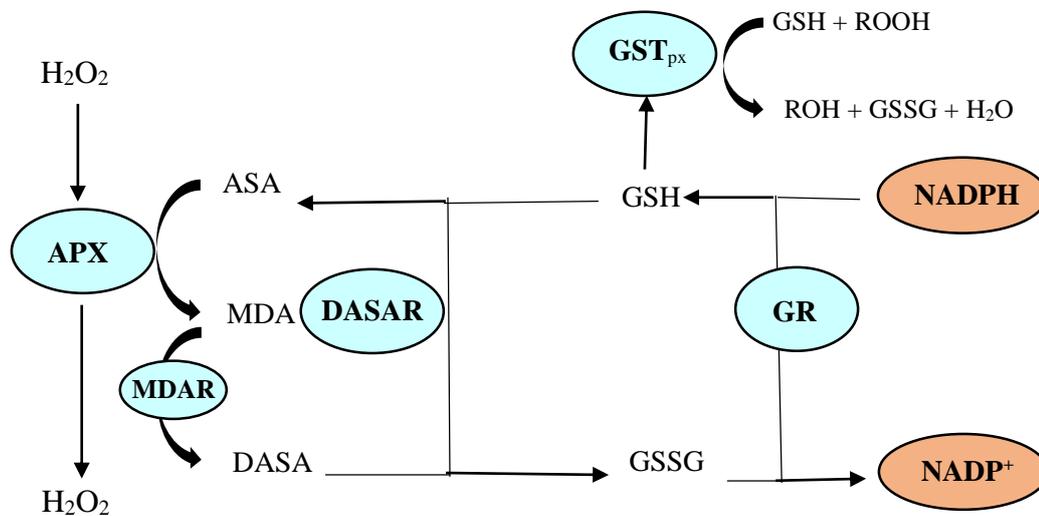
Catalases sont principalement localisées dans les peroxysomes. Elles sont responsables de la conversion de  $2\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ . Elles sont présentes chez tous les eucaryotes aérobies et jouent un rôle important dans la détoxification du  $\text{H}_2\text{O}_2$  produit dans les peroxysomes. Plusieurs formes d'isoenzymes de catalase ont été signalées chez les plantes. L'augmentation de l'activité enzymatique de la catalase aide la plante à s'adapter aux conditions difficiles et à maintenir les processus métaboliques en minimisant le niveau toxique de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sous l'effet du stress salin, cette augmentation de l'activité de la catalase est plus importante chez les plantes tolérantes au NaCl (Ashraf et *al.*, 2010).

- ***Ascorbate peroxidase (APX)***

Ascorbate peroxydase est une enzyme antioxydante essentielle, qui joue un rôle primordial dans la désintoxication ou le nettoyage de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'excès de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est réduit en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$  en présence d'APX. Cinq isoformes différentes de la famille d'ascorbate peroxydase ont été révélées dans différents compartiments de la cellule. L'augmentation de l'activité APX a été observée chez plusieurs plantes tolérantes au sel (Ashraf et *al.*, 2010).

- ***Enzymes du cycle ascorbate-glutathion***

Le cycle ascorbate-glutathion, également appelé cycle de Foyer-Halliwell-Asada, est un moyen efficace pour les cellules végétales d'éliminer le  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans certains compartiments cellulaires où ce métabolite est produit et aucune catalase est présente (Baker et Graham, 2013). Les enzymes du cycle ascorbate-glutathion sont : ascorbate peroxydase (APX), mono-déhydroascorbate (MDHAR), déhydroascorbate réductase (DHAR) et glutathion réductase (GR) (Khan et *al.*, 2015). Ce cycle utilise des antioxydants ascorbate et glutathion non enzymatique dans une série de réactions catalysées par les quatre enzymes antioxydantes, et il a été démontré dans les chloroplastes, le cytosol et les mitochondries des nodules racinaires (Baker et Graham, 2013). Ce cycle élimine le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) des plastes en le transformant en eau (Smith et *al.*, 2009) (figure I. 23). L'association des niveaux élevés d'antioxydants non enzymatiques et l'activité élevée du cycle de l'ascorbate-glutathion avec la tolérance au sel a été observée chez plusieurs espèces végétales (Khan et *al.*, 2015).



**Figure I. 23 :** Cycle d'ascorbate-glutathion (Smith et *al.*, 2009).

**ASA :** Ascorbate ; **MDA :** Monodéhydroascorbate ;

**DASA :** Déhydroascorbate ; **GSH :** Glutathion réduit;

**GSSG :** Glutathion oxydé;

**Enzymes :** **APX :** Ascorbate peroxidase ;

**MDAR :** Monodéhydroascorbate réductase ;

**DASAR :** Déhydroascorbate réductase ;

**GR :** Glutathione réductase ; **GST :** Peroxisomal glutathione S-transferase.

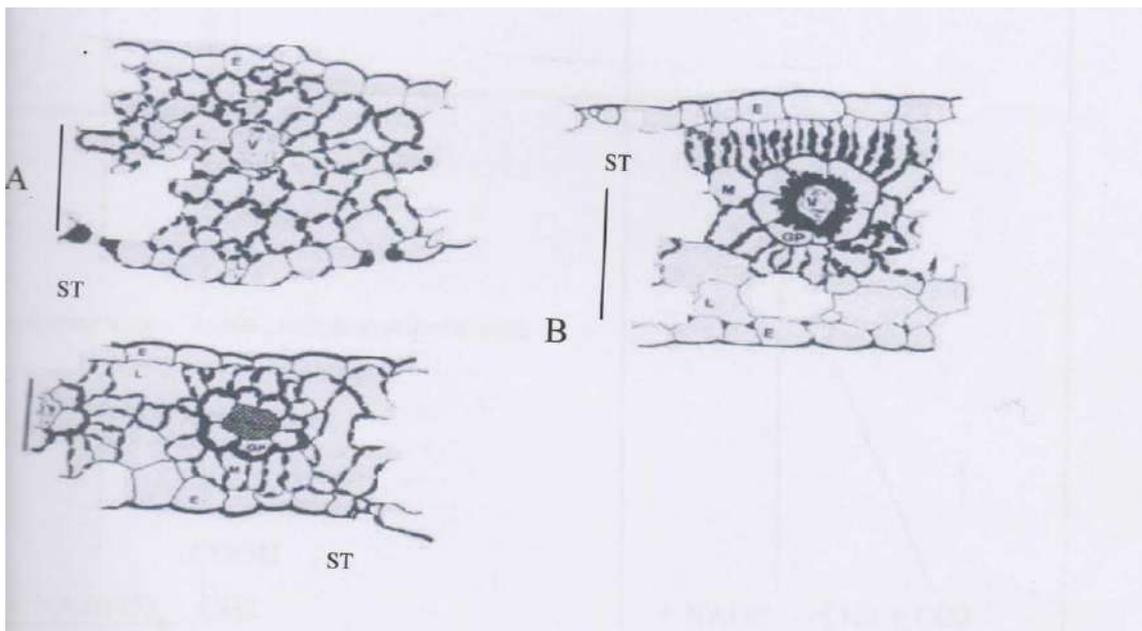
### 3. 5. 2. 3. Aptitude des halophytes à protéger le système photosynthétique

#### ➤ *Fonctionnement des plantes en C<sub>4</sub>*

Dans des conditions du stress osmotique et des températures élevées, les plantes C<sub>4</sub> ont un avantage par rapport aux plantes C<sub>3</sub>, en raison de leur capacité à effectuer la photosynthèse lorsque les stomates sont fermés, et à l'absence de la photorespiration dans les cellules du mésophylle (Madhava Rao et *al.*, 2006). La réduction de l'absorption de CO<sub>2</sub> qui en résulte est compensée par l'efficacité élevée de la fixation du CO<sub>2</sub> et par l'absence de photorespiration qui représente normalement une perte de carbone (Robert et Rland, 1998). La voie de l'acide dicarboxylique C<sub>4</sub> de la photosynthèse est bien représentée parmi les halophytes du désert. Cependant, les plantes possédant la voie photosynthétique normale C<sub>3</sub> se développent aussi bien dans les environnements

désertiques et salins. Les Chénopodiacées comprennent le plus grand nombre de plantes en C<sub>4</sub>, et elles sont très importantes sur le plan écologique dans les zones salines et les déserts arides et froids (Grigore et *al.*, 2014).

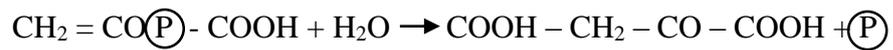
La plupart des espèces C<sub>4</sub> possèdent des taux élevés de photosynthèse, ce qui a conduit certains chercheurs à les désigner comme des plantes «efficaces» (Mold, 2012). La photosynthèse C<sub>4</sub>, et la désintoxication pourraient fournir les principales stratégies efficaces pour améliorer la résistance au sel. En photosynthèse C<sub>4</sub>, les enzymes : phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC), NADP-malique (NADP-ME), et pyruvate, dikinase phosphate (PPDK) participent au processus de contrôle de la concentration du CO<sub>2</sub>. Ces enzymes sont présentes chez toutes les plantes, et jouent un rôle important dans le maintien du pH et la reconstitution des composés intermédiaires du cycle de Krebs, ce qui contribue à la biosynthèse des acides aminés et d'autres composés et fournissant du NADPH pour la biosynthèse et le système antioxydant (Pessaraki, 2014).



**Figure I. 24 :** Anatomie des feuilles de plantes C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> (Weil et *al.*, 2001).

- A : Monocotylédone C<sub>3</sub> : *Avena sativa*
- B : Dicotylédone C<sub>4</sub> : *Gomphena celosioides*.
- C : Monocotylédone C<sub>4</sub> : *Zea mays*.
- ST: stomate.
- V : Tissus vasculaires
- M : Cellules du mésophylle
- E : Epiderme
- GP : Gaine périvasculaire
- L : Lacune

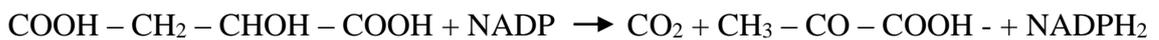
Les feuilles des plantes en C4 possèdent deux types de cellules chlorophylliennes (figure I. 24) : au niveau du mésophylle, dans le cytoplasme, de l'acide phosphoenolpyruvique est carboxylé pour donner de l'acide oxaloacétique :



Puis, dans les chloroplastes, le NADPH<sub>2</sub> provenant de la photosynthèse réduit cet acide oxaloacétique en acide malique (ou partiellement en acide aspartique s'il y a en même temps amination) :



Cet acide malique va migrer dans les cellules chlorophylliennes de la gaine périvasculaire où il sera décarboxylé en CO<sub>2</sub> + acide pyruvique :



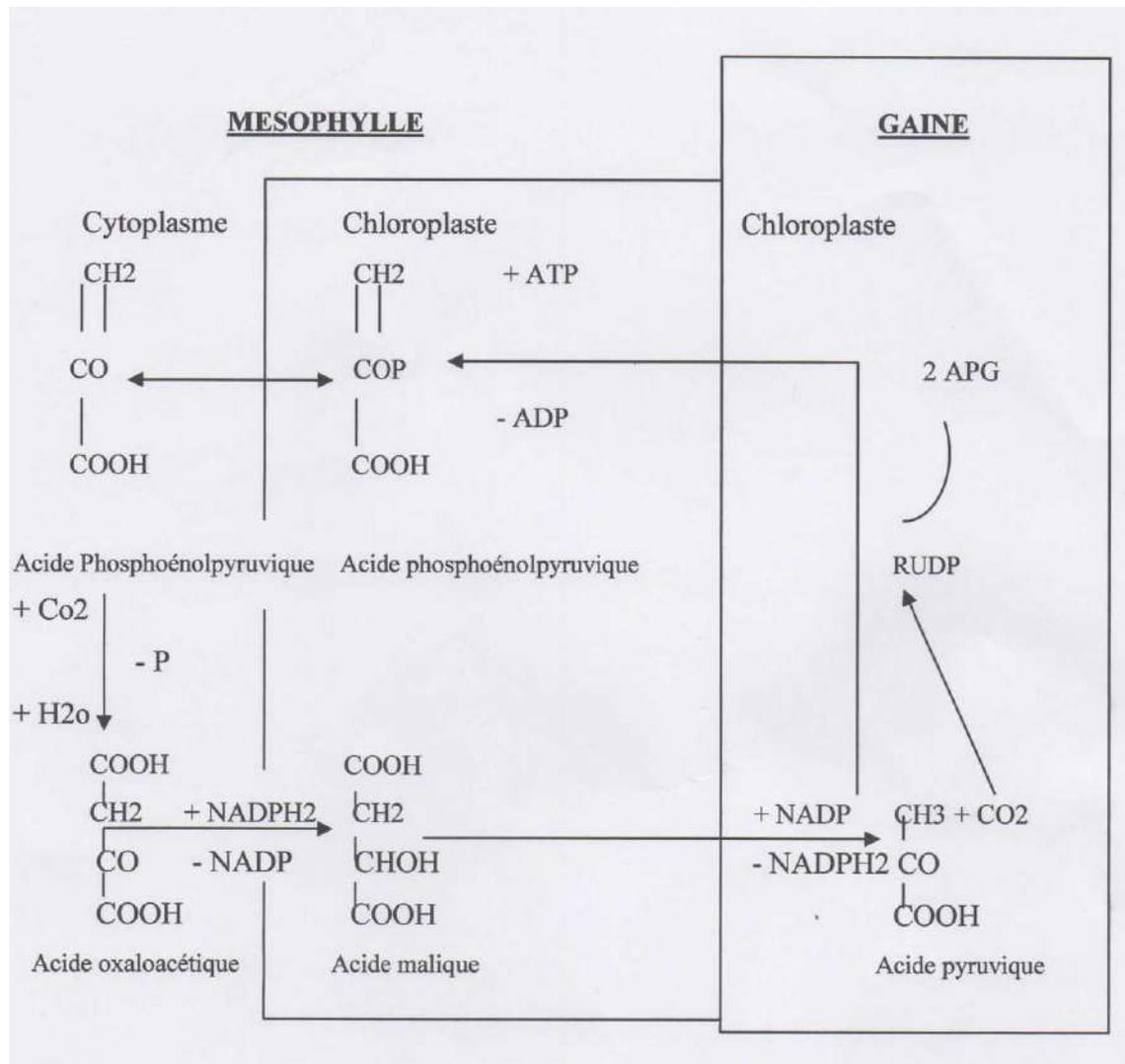
Le CO<sub>2</sub> servira à la carboxylation du ribulose diphosphate dans un cycle de Calvin classique, tandis que l'acide pyruvique repassera dans les cellules du mésophylle où, utilisant l'ATP provenant de la photosynthèse de ces cellules, il donnera de l'acide phosphoenolpyruvique grâce auquel le cycle pourra recommencer.

La photosynthèse des cellules du mésophylle ne comportent pas de cycle de Calvin et sert uniquement à fixer le CO<sub>2</sub> ; les dépenses énergétiques sont donc plus grandes que chez les plantes en C3 ; cependant le rendement globale est meilleur car la concentration en CO<sub>2</sub> des cellules de la gaine se trouvent augmentées, les pertes par photorespiration sont pratiquement nulles (Deysson, 1982) (figure I. 25).

#### **3. 5. 2. 4. Variation des lipides membranaires au cours du stress salin**

La haute résistance au sel des plantes dépend de la préservation de l'intégrité de la membrane cellulaire. Une certaine variation dans la sensibilité de la membrane plasmique au sel, chez les plantes sensibles et tolérantes peut être expliquée par des différences dans la composition ou la structure de la membrane plasmique. La composition lipidique des membranes est un facteur important dans la résistance des plantes supérieures au sel, étant donné que les caractéristiques de la structure et la perméabilité de la matrice lipidique des membranes cellulaires végétales dépendent fortement de cette composition. Les caractéristiques de la structure et la perméabilité de la matrice lipidique déterminera la

composition ionique et la concentration en osmorégulateurs organiques du cytoplasme de la cellule dans les conditions salines. En outre, les lipides sont nécessaires pour le fonctionnement de l'ATPase  $H^+$  -translocation de la membrane (Kuiper et Bos, 2012).



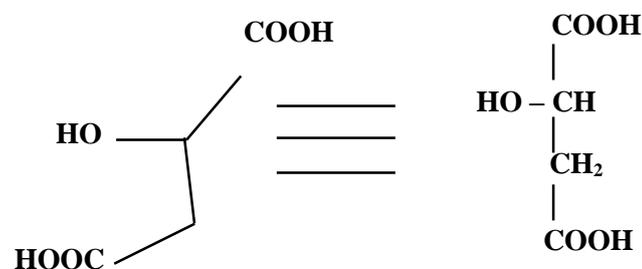
**Figure I. 25 :** Fonctionnement photosynthétique des plantes en C4 (Deysson, 1982).

Les lipides jouent un rôle important dans la régulation de la perméabilité sélective de la membrane cellulaire et peuvent jouer un rôle dans la résistance au sel des plantes. Les stérols libres, qui se trouvent dans le plasmalemme et le tonoplaste, sont très efficaces dans la régulation de la perméabilité ionique. Ils diffèrent dans le degré de contrôle de la perméabilité des membranes cellulaires végétales, le cholestérol étant le plus efficace et le sitostérol étant le moins efficace. Dans les racines de *Plantago maritima*, le niveau de sitostérol a été réduit avec l'augmentation de la salinité, ce qui indique que le niveau accru de cholestérol est devenu plus efficace dans la régulation de la perméabilité. Une

observation similaire a été enregistrée chez les agrumes, où le sitostérol a été remplacé par le stigmastérol lorsque les racines ont été exposées au NaCl. La régulation du métabolisme des stérols peut être un facteur dans la régulation du flux d'ions chez les plantes dans les conditions salines (Kuiper et Bos, 2012). Une résistance élevée au sel chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) a été liée à la diminution de la teneur en galactolipides dans la membrane des chloroplastes ce qui facilite le transport du Cl<sup>-</sup> à travers les membranes. Les effets de la salinité sur les lipides membranaires sont en grande partie en raison des effets ioniques plutôt que le stress osmotique. L'accumulation du sel dans les cellules affecte les enzymes de synthèse de lipides telles que la galactosyltransférase, et l'acylase dans les chloroplastes (Huang, 2016).

### 3. 4. 2. 5. Synthèse des acides organiques

Une particularité de nombreux tissus végétaux réside dans le pouvoir d'accumuler de grandes quantités d'acides organiques libres aussi bien dans les racines que dans les tiges, les bourgeons, les fruits....etc. Grâce à des transporteurs spécifiques, les acides organiques peuvent s'accumuler en grandes quantités sans modifier sensiblement le pH vacuolaire (le fonctionnement des pompes à protons responsables de l'acidité vacuolaire se trouve seulement ralenti). Parmi les divers acides organiques, le malate (figure I. 26) joue un rôle majeur dans les cycles tricarboxylique et glyoxylique, la photosynthèse des plantes C<sub>4</sub>, le maintien du pH et l'ouverture des stomates (Guignard, 2000). Les acides organiques particulièrement le malate et le citrate étaient les éléments dominants dans le maintien de l'équilibre ionique intracellulaire sous stress salin (Fageria, 2014). Chez les glycophytes, les concentrations d'acides organiques diminuent sous stress salin (Jenks et al., 2009). Chez les halophytes (tels que les espèces d'*Atriplex*), l'augmentation du potentiel osmotique des tissus foliaires est principalement assurée par l'accumulation de grandes quantités d'acides organiques (Rundel et Gibson, 2005).



**Figure I. 26 :** Acide malique (Guignard, 2000).

### 3. 5. 2. 6. Synthèse des protéines spécifiques aux stress salin

Le sel induit des modifications qualitatives et quantitatives dans la synthèse des protéines (Hirt et Shinozaki, 2004).

#### ➤ *Protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins)*

Les protéines LEA (*Late Embryogenesis Abundant proteins*) sont présentes chez les animaux et les plantes. Elles protègent d'autres protéines contre l'agrégation, la dessiccation ou un stress osmotique (Ahmad et *al.*, 2013). Ces protéines ont une composition en acides aminés biaisée, elles sont très hydrophiles, riches en glycine et restent solubles même en ébullition (Toppi et Skowronska, 2013). Les protéines LEA ont été qualifiées de protéines LEA en raison de leur découverte dans des graines en maturation et elles sont également signalées à être exprimées soit constitutivement ou en réponse au stress dans les tissus végétaux (Ahmad et *al.*, 2013). Ces protéines sont également actives dans les graines qui contiennent des niveaux élevés en acide ascorbique (ascorbic acid : ABA) (Pandey, 2015). En réponse au stress, les protéines LEA sont accumulées dans les tissus végétatifs chez les Monocotylédones et les Dicotylédones et agissent comme des chaperons pour empêcher le repliement ou la dénaturation des protéines (Toppi et Skowronska, 2013). Elles sont accumulées au cours de la phase tardive de la formation des graines et dans les tissus végétatifs dans des conditions de sécheresse, la chaleur, le froid et le stress salin. Une température haute, la salinité, et la sécheresse peuvent provoquer la dénaturation et le dysfonctionnement de nombreuses protéines. Les protéines LEA aident à protéger contre le stress en contrôlant le repliement et la conformation des deux protéines de structure (membrane cellulaire) et fonctionnelles (enzymes) (Tuteja et *al.*, 2012).

#### ➤ *Protéines HSP (Heat-Shock Protein)*

De nombreux auteurs ont confirmé que les protéines HSP semblent être régulées à la hausse en réponse au stress salin (Steinberg, 2012). Les protéines HSP agissent comme des chaperons moléculaires. Ils sont responsables du contrôle de pliage et de la conformation des deux protéines structurales et fonctionnelles. Parmi les cinq familles conservées de HSP (Hsp100, Hsp90, Hsp 70, Hsp60 et sHsp), les petites protéines de choc thermique (small heat-shock proteins : sHSPs) sont les plus répandues chez les plantes, dont la taille varie de 12 à 40 kDa. Récemment, il a été suggéré que SHPS pourrait

agir comme antioxydant dans la protection du transport complexe-I électrons dans les mitochondries au cours du stress salin. En outre, sHsps sont impliquées dans de nombreux processus de développement celui de l'embryon, la germination des graines, les embryogenèses somatiques, le développement du pollen et la maturation des fruits. Les Hps peuvent également protéger les plantes contre le stress oxydatif (Gaur et Sharma, 2013).

#### ➤ *Protéines kinases*

Les protéines kinases de divers familles sont des intégrateurs centraux du stress abiotique des plantes qui interviennent dans les processus physiologiques d'adaptation et la régulation de l'homéostasie osmotique et ionique (Jain et *al.*, 2014). Trois type de protéines kinase peuvent exister : Les protéines Kinases dépendantes du calcium (CDPKs), les kinases de type SOS2 (Salt Overly Sensitive 2) et PKS (Protein Kinase S). Ces protéines jouent un rôle important dans l'activation d'un promoteur inductible par le stress répondant au froid, au sel et à l'obscurité (Hawkesford et Buchner, 2013).

### **3. 5. 3. Réponse génétique des plantes au stress salin**

#### **3. 5. 3. 1. Gènes liés au stress salin**

De nombreux gènes liés à la réponse des plantes au stress hydrique et salin ont été identifiés et caractérisés. La plupart des gènes ainsi identifiés sont considérés comme des candidats potentiels pour améliorer la tolérance au stress abiotique. Dans la majorité des cas, ces gènes sont surexprimés dans la plante (s) cible.

#### **3. 5. 3. 1. 1. Gènes de Choline monooxygénase (CMO) et Bétaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH)**

Le gène de Choline monooxygénase (CMO) et le gène de bétaïne aldéhyde déshydrogénase (BADH) sont clairement impliqués dans la synthèse de la bétaïne. CMO synthétisant la bétaïne aldéhyde à partir de la choline. BADH convertit la bétaïne aldéhyde à la bétaïne. Il a été signalé que la glycine bétaïne (GB) a pour rôle de protéger les végétaux supérieurs contre les agressions du sel / osmotique non seulement par le maintien de l'ajustement osmotique, mais aussi en protégeant le complexe (PSII) de photosystème II en stabilisant les protéines complexes PSII extrinsèques, en présence de sel ou dans des conditions extrêmes de température ou du pH. De nombreuses cultures agronomiques importantes, telles que le riz, la pomme de terre, la tomate et le tabac ne peuvent pas synthétiser la glycine bétaïne. Par conséquent, les plantes synthétisant les gènes surexpression de la GB peuvent provoquer la production d'une quantité suffisante

de cette dernière, ce qui assure la tolérance de ces plantes au stress salin. La surexpression des gènes codant pour la bétaine aldéhyde décarboxylase de l'halophyte *Suaeda liaotungensis* a amélioré la tolérance à la salinité des plants du tabac (Tuteja et al., 2011). Le gène de la choline déshydrogénase (*codA*) d'*Arthrobacter globiformis* a aidé la tolérance à la salinité chez le riz (Vinocur et Altman, 2005). Le gène COM a été obtenu avec succès à partir d'épinards par purification partielle. Le gène de BADH purifié a déjà été obtenu et ces gènes ont été clonés avec succès (Preedy, 2015). Les deux enzymes ont été exprimées séparément dans les chloroplastes du tabac (CMO) et carotte (BADH) afin d'améliorer la tolérance au stress hydrique et salin chez les plantes (Dan et Ow, 2011). Pessaraki (2016) souligne que le riz transgénique par le gène CMO provenant de l'épinard a montré une tolérance améliorée au stress salin. L'introduction du gène (OCM), cloné à partir de *Atriplex hortensis* dans le coton, a montré une amélioration de la résistance au stress salin (Zhang et al., 2009). Le gène BADH était surexprimé dans les plants de la luzerne transgénique (*Medicago sativa* L) à l'aide de la transformation par *Agrobacterium* (Yan et al., 2012). Récemment, chez les plants du blé une surexpression du gène BADH a été enregistrée, ce qui a permis une meilleure tolérance à la sécheresse et à la chaleur, en améliorant la capacité des feuilles à la photosynthèse (Wang et al., 2010).

### **3. 5. 3. 1. 2. Gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter**

Les gènes qui ont pour fonction de maintenir l'équilibre ionique jouent un rôle important dans les mécanismes de la tolérance des végétaux au sel. Parmi ces gènes, le gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter qui joue un rôle clé dans la réduction du stress salin. Certains chercheurs ont trouvé que le gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter de la membrane de la vacuole pourrait réduire les dégâts de Na<sup>+</sup> dans le cytoplasme par le transfert de ce dernier vers les vacuoles, ce qui améliore ainsi la tolérance des plantes au sel (Zhang, 2016). Le gène *AtNHX*, codant pour un transporteur vacuolaire d'*Arabidopsis thaliana*, présentait une surexpression dans l'*Arabidopsis* transgénique, la tomate, le colza, le riz, le tabac, le maïs et les plantes de fétuque élevée (Murphy, 2011). Chez l'*Aphanothece halophytica* plusieurs Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gènes ont été révélés (Tripathi et Müller, 2015).

### **3. 5. 3. 1. 3. Gène P5CS contrôlant l'accumulation de la proline**

Sous le stress hydrique et salin, la proline est censée être synthétisée à partir du glutamate par l'enzyme  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthétase et réductase (P5CS et P5CR, respectivement) (Setlow, 2012). L'accumulation de la proline dans les

transformants à surexpression du muté était le double de celui de transformants surexprimant le gène P5CS de type sauvage sous l'effet du stress salin. La génération du tabac exprimant un gène antisens d'*Arabidopsis* codant pour la proline déshydrogénase conduit à une concentration accrue de la proline avec une accrue tolérance au sel. Des niveaux élevés de la proline ont également été induits dans des cellules du tabac soumises à un stress salin par surexpression du gène NtHAL3 codant pour une protéine putative impliquée dans la voie du co-enzyme A (CoA) est une coenzyme de transfert de groupements acyle intervenant dans de très nombreuses voies du métabolisme (cycle de Krebs, bêta-oxydation) (Tuteja et al., 2012). De même, un gène P5CS isolé du riz a été transformé à nouveau dans le riz, où plus d'expression conduit à une meilleure biomasse racinaire et un meilleur développement des fleurs dans des conditions du stress hydrique et du sel (Igarashi et al., 1997). Dans un autre ensemble d'expérimentations, un gène P5CS de *Vigna aconitifolia* a été introduit dans des plants de blé en utilisant le transfert de gènes par *Agrobacterium*. Les analyses de l'expression du gène transféré chez le blé, et des tests de salinité ont révélé une augmentation de la tolérance au sel des plants transgéniques du blé (Sawahel et Hassan, 2002).

#### **3. 5. 3. 1. 4. Gènes Late embryogènèse abundant protéines (LEA)**

Les protéines LEA (Late embryogènèse abundant) sont présentes chez les animaux et les plantes qui protègent d'autres protéines de l'agrégation de la dessiccation ou les contraintes osmotiques associées à basse température. LEA ont été qualifiées de protéines LEA en raison de leur découverte dans des graines en maturation mais celles-ci sont également rapportées à être exprimées soit constitutivement, soit en réponse à un stress dans les tissus végétaux (Ahmad et al., 2013). Les protéines LEA sont divisées en groupes sur la base de motifs de séquences conservées. Cinq de ces groupes ont été caractérisés au niveau moléculaire et structural. Parmi les groupes des protéines LEA, ceux appartenant au groupe 3 sont prévus pour jouer un rôle dans la séquestration des ions qui sont concentrés pendant la déshydratation cellulaire. Les protéines groupe 1 LEA sont prévues pour avoir une meilleure capacité de rétention d'eau, alors que les protéines du groupe 5 sont renforcées pour séquestrer les ions lors de la perte d'eau (Kole, 2013). Une surexpression constitutive de *HVA1*, une protéine de groupe 3 LEA d'orge a conféré la tolérance au déficit hydrique du sol et au stress du sel chez les plants de riz transgéniques (Pessaraki, 2016). Ces observations suggèrent que les protéines LEA jouent un rôle important dans la protection des plantes en conditions du stress salin, et que les gènes

LEA tiennent un potentiel considérable pour leur utilisation comme outils moléculaires pour l'amélioration génétique de la tolérance des cultures à la salinité (Pessaraki, 2016)

### **3. 5. 3. 1. 5. Gènes Plasma membrane protein 3 (PMP3)**

Les gènes Plasma membrane protein 3 (PMP3), comprennent un groupe de petits polypeptides hydrophobes qui jouent un rôle important dans la maintenance de l'homéostasie ionique. Ils sont hautement conservés entre les espèces, y compris la levure (Navarre et Goffeau, 2000), les animaux (Medina et al., 2007), la mousse (Reski et al., 2004), et les plantes supérieures (Fu et al., 2012). Chez les plantes, de multiples variantes structurelles de PMP3 protéines existent, qui sont codées par des familles multigéniques (Yu et al., 2015). Un total de huit gènes ZmPMP3 sensibles au sel, la sécheresse, le froid ont été clonés à partir du Maïs. La plupart de ces gènes sont capables de maintenir le potentiel de membrane, ce qui permet successivement la régulation de l'homéostasie ionique intracellulaire (Ahmad et al., 2013). Parmi les gènes PMP3 liés au stress abiotique chez les plantes sont les suivants : Le ESI3 d'agropyre (*Lophopyrum elongatum*), *OsRC12-5*, *OsLti6a / b*, et R1G1B du riz (Li et al., 2014), *AtRC12A / B / D / F* de l'*Arabidopsis (Arabidopsis thaliana)* (Medina et al., 2007), et *ZmPMP3-2 / 3/4* à partir du maïs (*Zea mays*) (Fu et al., 2012).

### **3. 5. 3. 1. 6. Gènes codant pour les aquaporines (AQP)**

Depuis longtemps les chercheurs se demandaient comment l'eau traverse la bicouche de lipides des membranes. Ils ont constaté par ailleurs que la migration de l'eau est plus rapide que ne laisse prévoir l'osmose seule. Maintenant il est connu que c'est la présence de canaux à eau, appelés aquaporines qui permettent une augmentation de la vitesse de passage de l'eau. Ces aquaporines sont présentes chez les animaux et les plantes ; dans ces dernières on les trouve dans la membrane plasmique et dans le tonoplaste (Johnson et al., 2011). Chez l'*Arabidopsis*, 30 gènes différents au moins codent des protéines du type des aquaporines. Les aquaporines accélèrent le mouvement de l'eau mais ne modifie en rien la direction du mouvement. Elles sont importantes pour le maintien des équilibres hydriques et pour assurer le flux dans le xylème (Johnson et al., 2011). Les aquaporines (AQP) qui régulent et médient le débit d'eau transmembranaire au cours de différents processus physiologiques, sont devenues cruciales dans le contexte des voies de la réponse au stress (Cabot et al., 2014). Plusieurs études ont rapporté l'activation transcriptionnelle des gènes AQP par différents stress environnementaux indiquant une corrélation positive entre la réglementation des AQP et

la tolérance au stress abiotique chez les plantes (Sreedharan et *al.*, 2015). En effet, des études récentes menées sur des espèces Monocotylédones ont rapporté que la surexpression hétérologue des gènes AQP dans des plantes transgéniques confère une tolérance améliorée au froid, le sel et le stress hydrique. La surexpression de la TaAQP8 chez le tabac transgénique a amélioré sa tolérance au stress salin (Hu et *al.*, 2012). La surexpression de la AQP de la membrane plasmique inductible par le stress a amélioré la tolérance à la sécheresse, le sel et au froid chez les plantes des bananes transgéniques (Sreedharan et *al.*, 2013).

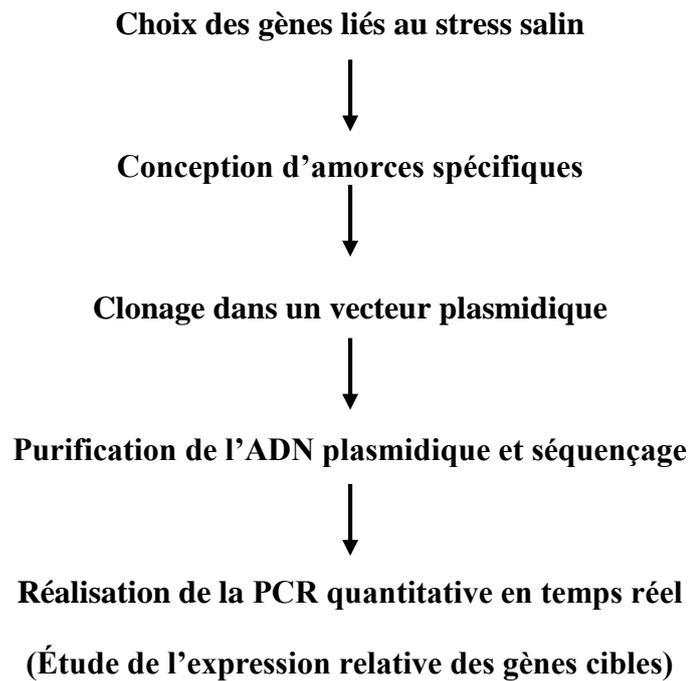
#### **4. Etude de l'expression des gènes liés au stress salin**

L'expression des gènes, encore appelée expression génique ou expression génétique est un ensemble de mécanismes qui assurent la transcription et la transformation de l'information génétique (Raven et *al.*, 2017). Elle consiste également à caractériser et quantifier les produits d'expression de l'ADN (les ARN messagers : le transcriptome) de manière à identifier, dans un tissu, dans un état et à un moment donné du développement, les séquences actives et donc à révéler ainsi le niveau d'expression des gènes dont elles sont issues (Tagu et Moussard, 2003). Cette expression des gènes peut être étudiée par la PCR quantitative en temps réel (PCRq en temps réel). Le processus d'étude de cette expression des gènes peut être récapitulé dans la figure I. 27.

##### **4. 1. Extraction et purification des acides nucléiques**

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. Vu qu'il existe une grande diversité de méthodes d'extraction et de purification des acides nucléiques, le choix de la technique la plus adéquate repose généralement sur les critères suivants :

- L'acide nucléique cible,
- L'organisme source,
- Le matériel de départ (tissu, feuille, graine, matériel transformé, etc.),
- Les résultats escomptés (rendement, pureté, temps de purification requis, etc.),
- L'application en aval (PCR, clonage, étiquetage, transfert d'ADN, RT-PCR, synthèse d'ADNc, etc.) (Somma, 2004).



**Figure I. 27** : Les étapes de l'étude de l'expression des gènes.

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériel biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité de débris cellulaires. Les procédures de lyse courantes sont les suivantes :

- la rupture mécanique (ex. : broyage ou lyse hypotonique).
- le traitement chimique (ex. : lyse détergente, agents chaotropiques, réduction des thiols).
- et la digestion enzymatique (ex. : protéinase K).

Après la lyse cellulaire et l'inactivation du nucléase, les débris cellulaires peuvent être aisément retirés par filtrage ou par précipitation (Somma, 2004). La purification des acides nucléiques se fait par extraction grâce aux solvants organiques (chloroforme, phénol) qui permettent de séparer les *acides nucléiques* des protéines et des polysaccharides, puis par précipitation sélective à l'alcool éthylique : à haute force ionique, l'éthanol à forte concentration précipite presque totalement les acides nucléiques. Puis le précipité peut être récupéré par centrifugation (Paech et Tracey, 2013). Il existe beaucoup de kits d'extraction et de purification de l'ADN dans le commerce tels que

RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) ; Ambion® Cells-to-CT™ Kits (ThermoFisher Scientific) ; EZ-10 Spin Column Plant RNA Mini-Preps Kit (CliniSciences).

## **4. 2. Mise en évidence des gènes candidats**

### **4. 2. 1. Recherche bibliographique des gènes candidats et alignements**

L'identification des gènes candidats est réalisée afin d'identifier le gène recherché. Ces gènes candidats peuvent être identifiés à partir des différentes publications scientifiques traitant la résistance aux stress salin. La séquence de ces gènes est ensuite recherchée dans les bases de données nucléotidiques. Toutes les séquences homologues disponibles dans les bases de données sont également recherchées. Ainsi, pour chaque gène candidat, des alignements de séquences protéiques provenant de différentes espèces végétales proches de l'espèce étudiée sont réalisés à l'aide du logiciel d'alignements (logiciel d'alignements multiples). Les deux logiciels d'accès libre, basés sur des programmes heuristiques, les plus utilisés pour aligner par pair des séquences polypeptidiques sont appelés BLAST (pour Basic Local Alignment Search Tool) et FASTA. Les deux programmes visent à obtenir le meilleur compromis entre sensibilité et sélectivité (Voet et Voet, 2005). Si l'on veut aligner en même temps plus de deux séquences, afin d'obtenir des alignements de séquences multiples, on doit recourir à un autre type de programme. Un des plus utilisés, CLUSTAL, est d'accès libre pour usage interactif via le *web* ([http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/.](http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/)) (Voet et Voet, 2005).

### **4. 2. 2. Conception des amorces**

Ces amorces nucléotidiques comportent de façon idéale 20 bases nucléotidiques. La séquence de ces amorces est déterminée à partir de la séquence d'ADN cible déposée dans les banques informatiques des données. Le % de CG doit être voisin pour les deux amorces afin d'optimiser la température d'hybridation de ces amorces au cours des réactions de la PCR. Ces amorces sont dites «amorces dégénérées» car elles peuvent contenir quelques résidus d'inosine (Denis, 2007) et un mélange d'amorces avec des bases alternatives à des positions déterminées pour tenir compte des différences entre les gènes des espèces qui seront alignées pour dériver la séquence d'amorce. Le choix d'amorces est basé sur les critères suivants :

- La longueur : le nombre statistique minimum de nucléotides composant une amorce doit être égal à 17. En pratique, le nombre de nucléotides se situe entre 20 et 30 bases.

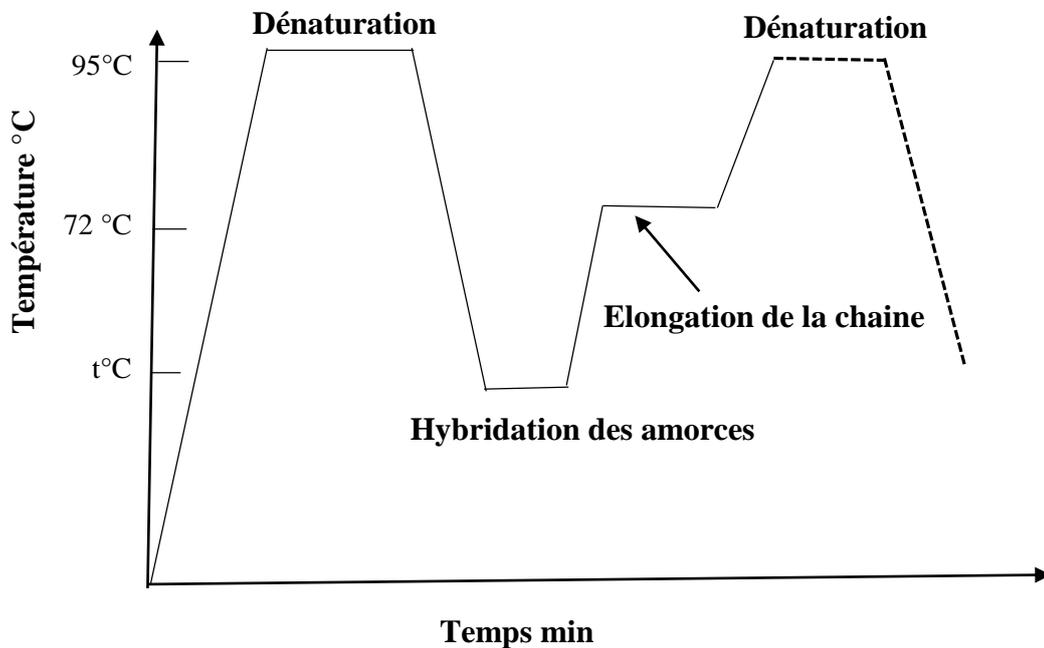
- La séquence : les séquences des deux amorces du même couple doivent présenter le maximum de divergences et plus particulièrement à l'extrémité 3', afin d'éviter leur cohybridation.
- La teneur en G + C doit être d'environ 50 %. La richesse en GC améliore la stabilité du duplex amorce-matrice. La concentration : les concentrations optimales pour 30 à 40 cycles varient entre 10 et 50 pmoles de chaque amorce.
- Le nombre de cycles : pour obtenir un signal détectable sur gel, il faut une amplification dans les conditions optimales en n cycles. Il faut noter qu'un nombre de cycles trop élevé provoque l'accumulation de produits non spécifiques.
- La température d'hybridation [Th] est spécifique d'une amorce. Elle se calcule à partir du Tm des amorces.  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$  pour un oligonucléotide inférieur à 25 nucléotides (Chiaroni et *al.*, 2011).

Il existe des programmes informatiques pour assister et optimiser la conception des amorces (Read et Donnai, 2008). Le logiciel Primer3 est un logiciel de conception d'amorces ou de sonde, très couramment utilisé.

#### **4. 2. 3. Amplification par PCR des gènes candidats**

Il s'agit de l'amplification des gènes candidats par PCR via l'utilisation d'amorces dégénérées. La PCR (polymerase chain reaction) est une réaction qui permet l'amplification de fragments d'ADN de manière exponentielle. C'est une réaction cyclique qui repose sur le principe de la réplication de l'ADN par une ADN polymérase. Mais, dans ce cas la réplication ne se fait entre deux origines de réplication, mais entre deux amorces se fixant chacune sur un brin de l'ADN matrice (figure I. 28). Chaque cycle comporte trois étapes :

- Dénaturation de l'ADN matrice à 95°C.
- Hybridation des amorces (annealing) entre 55°C et 72°C (température fonction de la Tm des amorces ; donc essentiellement de leur séquence et de leur longueur).
- Extension des amorces par l'ADN polymérase à 72°C (température optimale de fonctionnement de la *Taq* polymérase) à partir de l'extrémité 3' des amorces (Branger, 2012).



**Figure I. 28 :** Schéma représentatif des étapes de la PCR (Lonvaud-funel et *al.*, 2010).

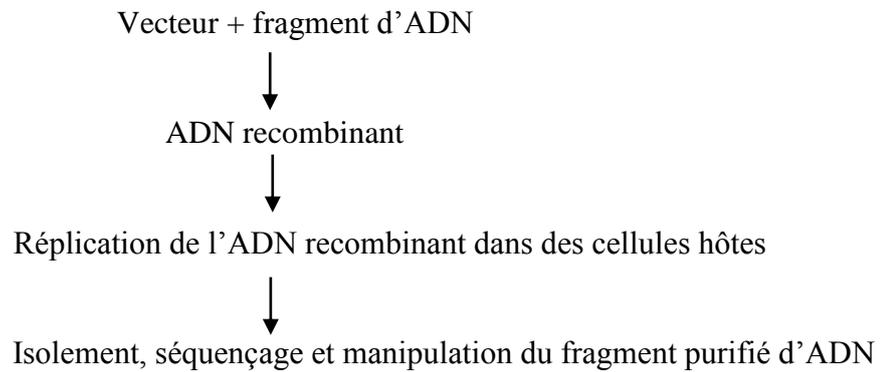
#### **4. 2. 4. Révélation des fragments amplifiés**

La révélation des fragments amplifiés est réalisée par électrophorèse sur gel, suivie par la visualisation du gel sous Ultraviolets (UV) en colorant le gel avec des composés tels que le bromure d'éthidium qui se lie à l'ADN et fluorescent sous la lumière des UV.

#### **4. 3. Clonage et séquençage des produits d'amplification**

##### **4. 3. 1. Clonage de l'ADN par les techniques de l'ADN recombinant**

Le clonage d'ADN consiste à former *in vitro* des molécules d'ADN recombinant en insérant des fragments d'ADN d'intérêt à des molécules d'ADN vectoriel. Les molécules d'ADN recombinant sont ensuite introduites dans des cellules hôtes, dans lesquelles elles se répliquent et produisent un grand nombre de molécules d'ADN recombinant (Lodish 2005) (figure I. 29). Le clonage des ADNc est également très important pour analyser la structure et l'expression des gènes (Karp, 2010).

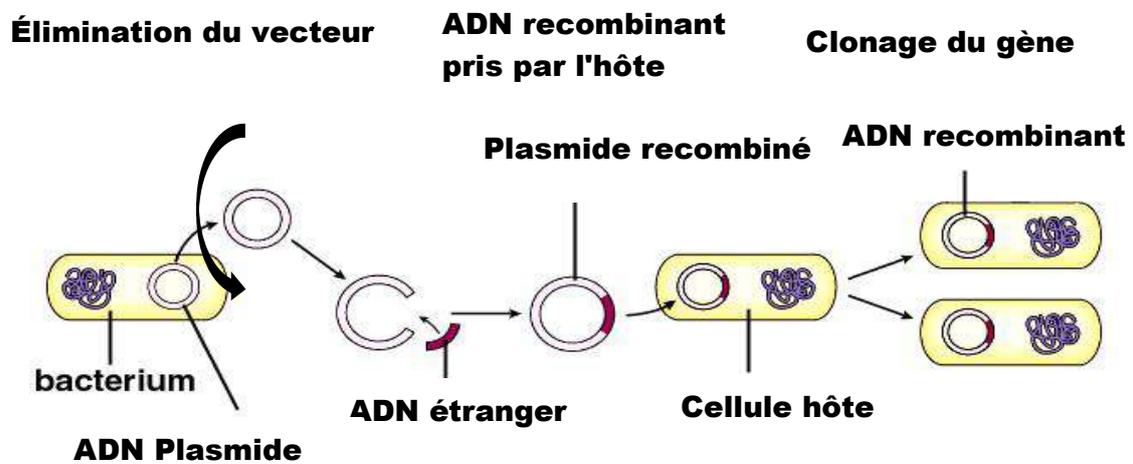


**Figure I. 29 :** Schéma récapitulatif du principe du clonage par les techniques de l'ADN recombinant (Lodish, 2005).

#### **4. 3. 1. 1. Construction de l'ADN recombinant**

La construction de l'ADN recombinant consiste à (figure I. 30) :

- Choisir le type d'ADN donneur :
  - ADN génomique.
  - ADN complémentaire (ADNc).
  - ADN obtenu par synthèse chimique.
- Couper l'ADN donneur et le vecteur à l'aide d'enzymes de restrictions
- Relier les molécules d'ADN (ADN donneur-vecteur).
- Amplifier chaque ADN recombinant à l'aide de la machinerie bactérienne (Cain et *al.*, 2006).



**Figure I. 30 :** Récapitulation des étapes de la construction de l'ADN recombinant (Cain et *al.*, 2006).

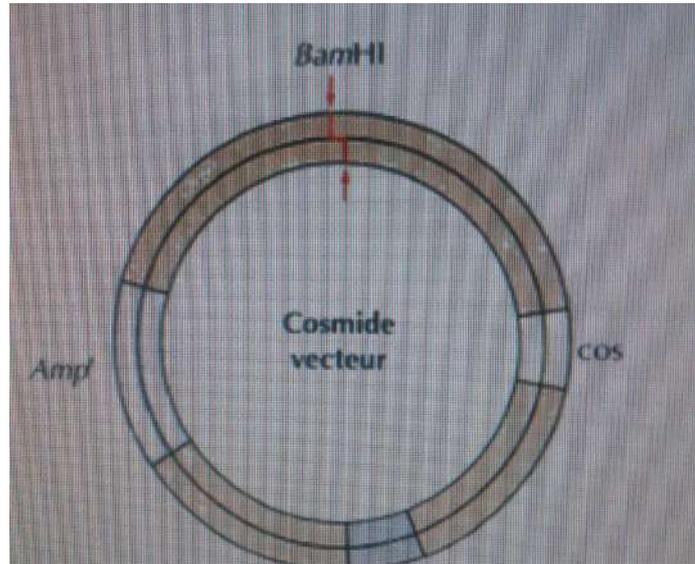
#### a/ - Vecteur

Pour multiplier l'ADN dans une cellule hôte, il faut un vecteur capable de se répliquer dans la cellule hôte après avoir été introduit. Il y a quatre types de vecteurs de clonage. Les plasmides, les phages, les cosmides et les chromosomes artificiels. Les vecteurs de clonage possèdent au moins trois composants : une origine de réplication, un marqueur de sélection et un multisite de clonage (Prescott et *al.*, 2010). Les deux vecteurs les plus fréquents sont les plasmides et les chromosomes artificiels (Raven et *al.*, 2011).

#### ➤ Vecteurs plasmidiens

Les vecteurs plasmidiens (petits chromosomes circulaires) sont habituellement utilisés pour cloner des morceaux d'ADN relativement courts, jusqu'à 10 kilobases (kb) environ. Un tel vecteur doit posséder trois éléments :

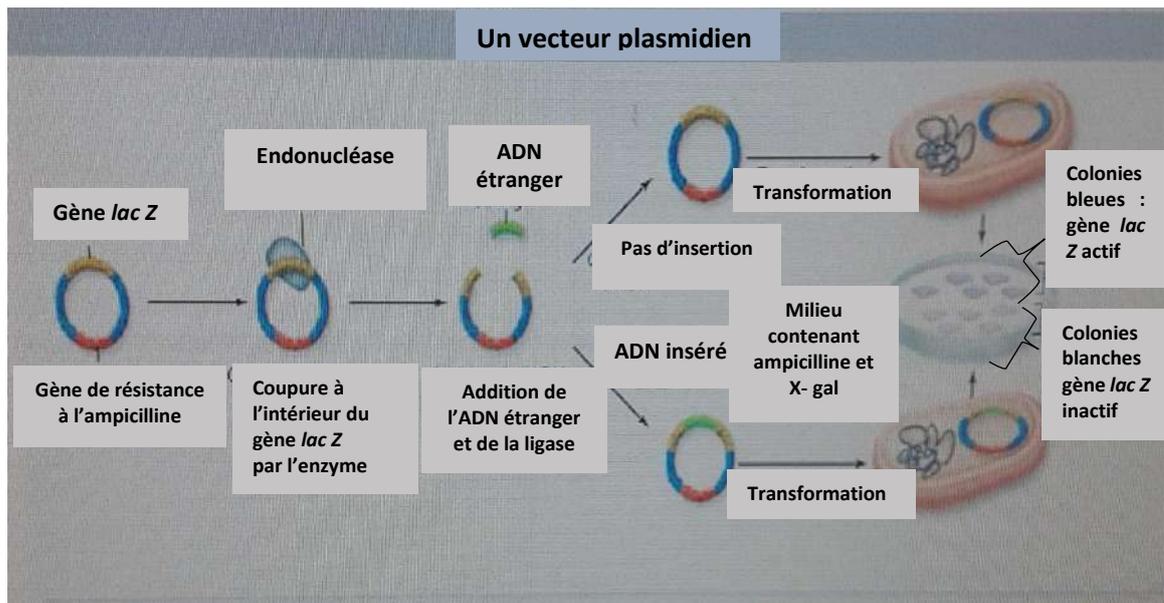
- Une origine de réplication permettant sa réplication dans *E. coli* indépendamment du chromosome de la cellule hôte.
- Un marqueur de sélection (généralement la résistance à un antibiotique).
- Un ou plusieurs sites de restriction particuliers où il est possible de placer l'ADN étranger (figure I. 31).



**Figure I. 31 : Structure du plasmide.**

Clonage en vecteur cosmicien. Un cosmide est un plasmide portant des sites cos, qui font que l'ADN s'en- capsule pour former des particules de phage. La ligature du fragment d'ADN se fait au niveau d'un site de clonage (par exemple, *Bam*HI) (Cooper, 1999).

Avec les techniques décrites, un fragment d'ADN est inséré dans une région du plasmide possédant des sites de clonage multiples (SCM). Cette région renferme plusieurs sites de restriction particuliers : quand le plasmide est coupé par les enzymes correspondantes, on obtient un plasmide linéaire. Si l'ADN d'intérêt est scindé par la même enzyme de restriction, on peut le souder à ce site, après quoi l'ADN du plasmide est introduit dans les cellules par transformation (Johnson et *al.*, 2011). Les vecteurs plus récents utilisent le gène de la  $\beta$ -galactosidase, enzyme qui scinde un galactoside (un sucre) comme le lactose. Une couleur bleue apparaît quand l'enzyme scinde dans le substrat artificiel X-gal. Dans ces plasmides, l'insertion de l'ADN étranger interrompt le gène de  $\beta$ -galactosidase et empêche la synthèse d'une enzyme fonctionnelle. Quand les cellules sont étalées après transformation sur un milieu contenant à la fois l'antibiotique (pour sélectionner les cellules contenant le plasmide) et X-gal, restent blanches, cela indique que ces cellules contiennent de l'ADN inséré, alors que les cellules qui en sont dépourvues sont bleues (Raven et *al.*, 2011) (figure I. 32).



**Figure I. 32 :** Clonage moléculaire avec vecteur : Les plasmides sont coupés au sein du gène  $\beta$ -galactosidase (*lac z*) et l'on ajoute l'ADN étranger et la ligase. L'ADN étranger inséré dans *lac Z* interrompt la séquence codante et inactive le gène. L'étalement des cellules sur un milieu contenant l'antibiotique ampicilline sélectionne les cellules renfermant le plasmide. Le milieu contient aussi X-gal : si *lac Z* est intact (au-dessus), l'enzyme exprimée coupe X-gal et donne des colonies bleues. Si *lac Z* est inactivé (en bas), X-gal n'est pas coupé et les colonies restent blanches (Raven et *al.*, 2011).

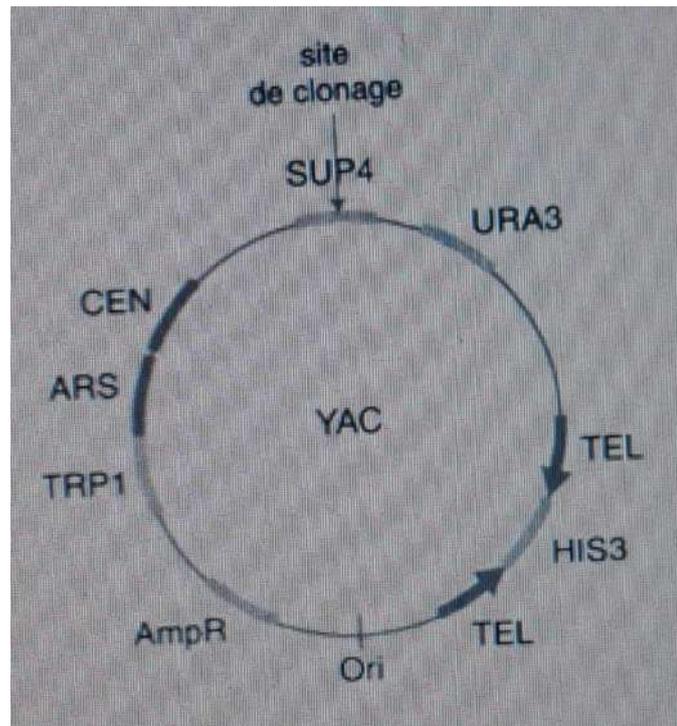
### ➤ Chromosomes artificiels

La taille des molécules susceptibles d'être clonées dans des vecteurs plasmidiens a limité l'analyse des génomes à grande échelle. Pour trouver une solution, les généticiens ont décidé de construire des chromosomes artificiels de levure (YAC) et de bactéries (BAC : Chromosome Artificiel de la Bactérie).

Les chromosomes artificiels de la levure (Yeast artificial chromosome : YAC) sont capables d'accueillir des ADN étrangers de 1000 kb (un million de paires de bases). Les YAC contiennent tous les éléments d'un chromosome de levure nécessaire à leur répllication et à leur ségrégation dans deux cellules filles en mitose : une ou plusieurs origines de répllication, des télomères aux extrémités des chromosomes et un centromère auquel les fibres fusoriales peuvent s'attacher pendant la séparation des chromosomes. En plus de ces éléments, les YAC sont construits de manière à contenir un gène dont le produit permet de séparer les cellules qui possèdent ce type de chromosome de celles qui en sont dépourvues et le fragment d'ADN qui doit être cloné (Karp, 2010). Ils sont caractérisés par la structure suivante (figure I. 33) :

- **CEN** = centromère.
- **TEL** = extrémités télomériques.
- **A** et **B** = marqueurs de sélection.
- **ORI** = origine de réplication.

Les YAC (Yeast artificial chromosome) (Chromosome artificiel de levure) ont montré leur efficacité pour le clonage de gènes, la cartographie physique de génomes entiers (Cooper, 1999) et la transgénèse (Petersen et *al.*, 1997).



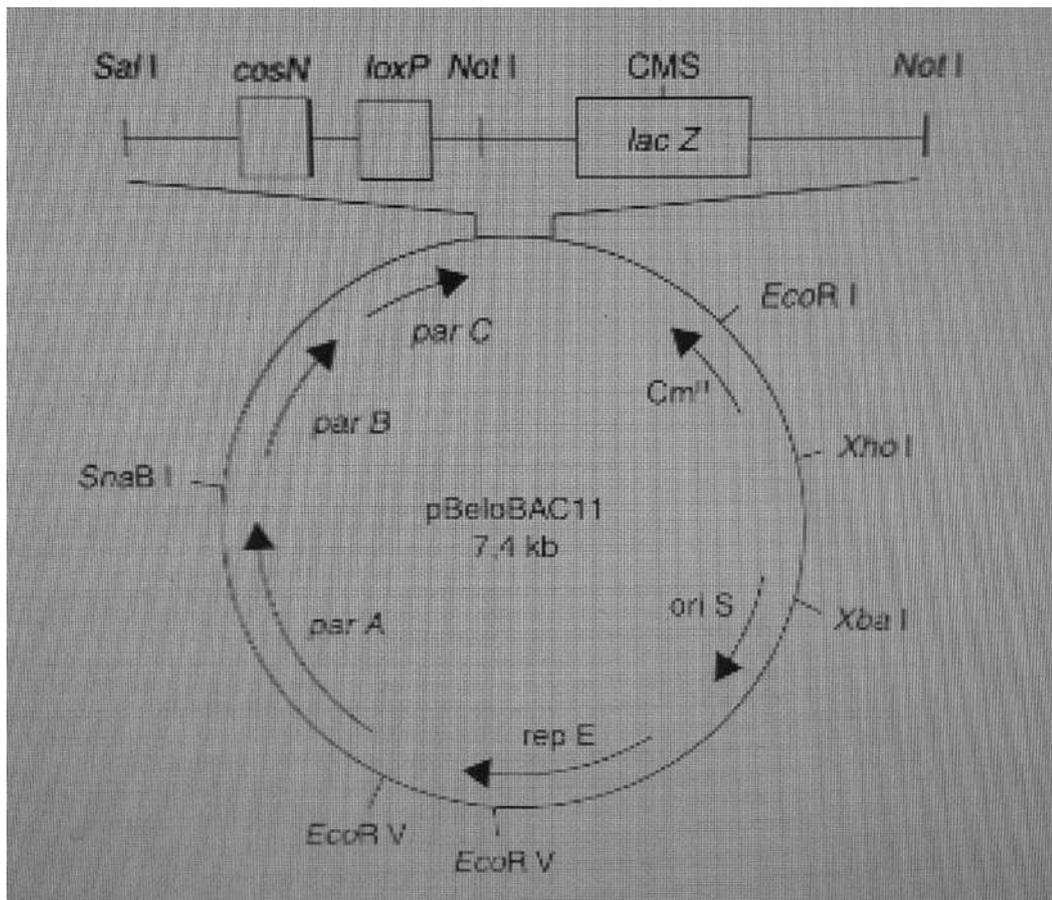
**Figure I. 33** : Structure d'un vecteur YAC (Tagu et Moussard, 2003).

Les BAC (Chromosome Artificiel de la Bactérie) sont des vecteurs servant à cloner de grands fragments d'ADN (100 à 300 kb) dans les cellules d'*E. coli* (Pinkert, 2014). Ils sont utilisés en biotechnologie comme vecteur d'expression et de transformation des cellules, ou comme vecteur de clonage. Ils sont caractérisés par la structure suivante :

- *oriS* : origine de réplication
- *repE* : réplication du plasmide à partir de l'*oriS* ; maintien du nombre de copies à 1-2 par cellule
- *parA*, *parB* : stabilité du plasmide ; incompatibilité avec d'autres facteurs F (*parB*)

- $CM^R$  : gène de résistance au chloramphénicol Site de clonage dans le gène  $lacZ'$  : crible de sélection blanc/bleu (figure I. 34).

Un vecteur BAC est un vecteur maintenu dans *E. coli*. Ils ont l'avantage, par rapport aux vecteurs YAC, de présenter une fréquence plus faible de clones chimériques (intégration de plusieurs fragments dans un même vecteur et recombinaison entre fragments) et ont une plus grande stabilité (Samouelian et *al.*, 2009). Les avantages et les inconvénients de chaque type de plasmide peuvent être récapitulés dans le tableau I. 5.



**Figure I. 34 :** Structure d'un vecteur BAC (Chromosome Artificiel de la (Bactérie) (Pinkert, 2014).

**Tableau I. 5 :** Choix du vecteur : avantages et inconvénients (Tagu et Moussard, 2003).

Nature	Cellule hôte	Taille de l'insert	Usage majeur	Avantages	inconvénients
ADN circulaire	bactérie	0.1 à 10 kb	Banque ADNc	Manipulation aisée	Petit insert
ADN viral linéaire	bactérie	10 à 20 kb	Banque génomique et ADNc	Insert plus important	Manipulation moins aisée
ADN circulaire	bactérie	40 kb	Banque génomique		
Chromosomes artificiel de levure	levure	200 à 1000 kb	Banque génomique	Clonage de grands fragments d'ADN : possibilité de couvrir tout le génome avec un nombre restreint de vecteurs recombinants	instabilité
Chromosome artificiel de bactérie	bactérie	100 à 500 kb	Banque génomique	Clonage ADN plus aisé efficace clones + stables en bactéries	Taille des fragments limitée

### b/- Enzymes de restriction

C'est la découverte et la caractérisation des enzymes de restriction qui ont permis le développement de la technologie de l'ADN recombinant. Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des endonucléases c'est à dire des enzymes qui coupent à l'intérieur d'un acide nucléique, les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides. Elles sont produites par des bactéries et agissent comme des ciseaux en coupant l'ADN au niveau de séquences cibles spécifiques (Zahran et *al.*, 2010). La nomenclature de ces enzymes est la suivante : Les trois premières lettres, écrites en Italique, sont composées de la lettre initiale du genre et les deux premières lettres du nom de l'espèce bactérienne à partir de laquelle l'enzyme a été isolée (par exemple. *Eschrichia coli* = *Eco*). Après, en caractères romains, est la désignation de la souche bactérienne (par exemple : *EcoR*). Enfin un chiffre romain donne le numéro d'ordre de caractérisation de l'enzyme (par exemple : *EcoRI*) (Mulhardt, 2010).

Les sites de restriction sont souvent de type palindrome, c'est à dire qu'ils sont identiques sur les deux brins de l'ADN (mais antiparallèles sur l'autre brin). Les enzymes de restrictions peuvent donner deux types de coupures : la coupure « à bouts francs » et La coupure à bouts collants (Kulkarni, 2002) (figure I. 35). Dans le cas de la coupure « à bout francs (blunt ends) », l'enzyme coupe l'ADN à la même position sur les deux brins pour former les bouts francs donc l'hydrolyse des liaisons phosphodiester se fait au centre de symétrie du palindrome. Toutes les paires de nucléotides restent appariées : les

fragments qui en résultent sont dits « à bouts francs » (Clark et Pazdernik, 2015) (figure I. 36). Des fragments et vecteurs porteurs de bouts francs peuvent être réunis par l'ADN ligase de T4 (ligature de bouts francs). La coupure à bouts collants (ou à extrémités cohésives (cohesive ends or sticky ends) est caractérisée par les extrémités du brin simple résultant de la coupure d'une molécule d'ADN à un niveau différent sur chaque brin ; qui peut se recombiner avec les extrémités produites par la même enzyme sur un autre fragment (Read et Donnai, 2008) (figure I. 36). Il existe trois types d'enzymes de restriction, mais seul le type II agit à des endroits précis. Ces derniers sont les mieux connus et les plus utilisés (tableau I. 6). Les types I et III sont moins précis et ne sont guère utilisés pour le clonage et la manipulation de l'ADN (Raven et *al.*, 2011). Ce type d'enzymes possède à la fois l'activité endonucléase et méthylase. Ces enzymes reconnaissent une séquence d'ADN spécifique mais coupent en un endroit plus ou moins éloigné du site reconnu. Les enzymes de type I coupent 1000 à 5000 paires de bases plus loin du site de reconnaissance (Dubey, 2014). Les enzymes de type III consomment de l'ATP et coupent une vingtaine de nucléotides après la séquence de reconnaissance (Dubey, 2014). Le troisième type de système de restriction-modification : le type II est le plus abondant et le plus étudié. Les enzymes de restriction de type II ne possèdent que l'activité endonucléase et qui reconnaissent une séquence de 4 à 6 paires de bases. Elles ne consomment pas d'ATP et leur site de coupure est le même que leur site de reconnaissance, le magnésium joue le rôle de cofacteur dans la réaction de clivage (Whitford, 2013). Toutes les endonucléases de type II sont des protéines homodimériques et sont structurellement très proches les unes des autres (Tropp, 2011).

### **c/- Ligation**

Les deux parties d'ADN libres (ADN étranger et ADN plasmide) se rencontrent à l'aide d'une enzyme appelée l'ADN ligase et se combinent (ligature) pour former un plasmide modifié (Russell et *al.*, 2013) (figure I. 37). La ligature s'effectue à l'aide d'une ADN ligase, elle aboutit à la formation d'un plasmide chimère circulaire, clos (fermé par des liaisons covalentes). L'ADN ligase est une enzyme qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester covalente entre deux groupes, 3'-OH et 5'-phosphate, adjacents. Il existe une autre méthode pour réunir les séquences d'ADN, celle de la ligature de bouts francs. Cette méthode est fondée sur la capacité de l'ADN ligase du phage T4 de lier de façon covalente les extrémités des deux molécules d'ADN même si elles ne sont pas

cohésives, plus précisément si elles n'ont pas d'extrémités 3' ou 5' monocaténaire complémentaire (Garrett et Grisham, 2000).

**Tableau I. 6 :** Quelques enzymes de restriction de type II et leur site de reconnaissance (Voet et Voet, 2016).

<b>Enzyme</b>	<b>Séquence de connaissance</b>	<b>Micro-organisme</b>
AluI	AG GC*T	<i>Arthrobacter luteus</i>
BamHI	G GATC*C	<i>Bacillus anmyloliuefaciens</i> H
BglI	GCCNNNN NGCC	<i>Bacillus globigii</i>
BglII	A GATCT	<i>Bacillus globigii</i>
EcoRI	G AA TTC	<i>Escherichia coli</i> RY13
EcoRII	CC*(AT)GG	<i>Escherichia coli</i> R245
EcoRV	GA T ATC	<i>Escherichia coli</i> J62 Plg74
HaeII	RGCGC Y	<i>Haemophilus aegyptius</i>
HaeII	GG C*C	<i>Haemophilus aegyptius</i>
HindIII	A* AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>4</sub>
HpaII	C C*GG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
MspI	C* CGG	<i>Moraxella</i> species
PstI	CTGCA* G	<i>Providencia stuartii</i> 164
PvuII	CAG C*TG	<i>Proteus vulgaris</i>
SaII	G TCGAC	<i>Streptomyces albus</i>
TapI	T CGA*	<i>Thermus aquaticus</i>
XhoI	C TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>

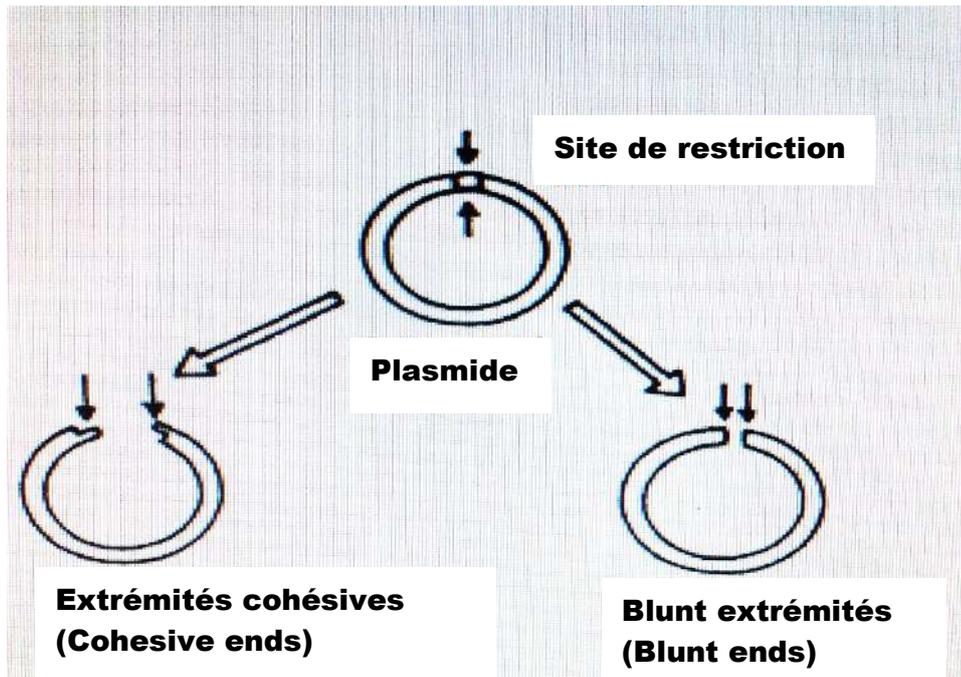
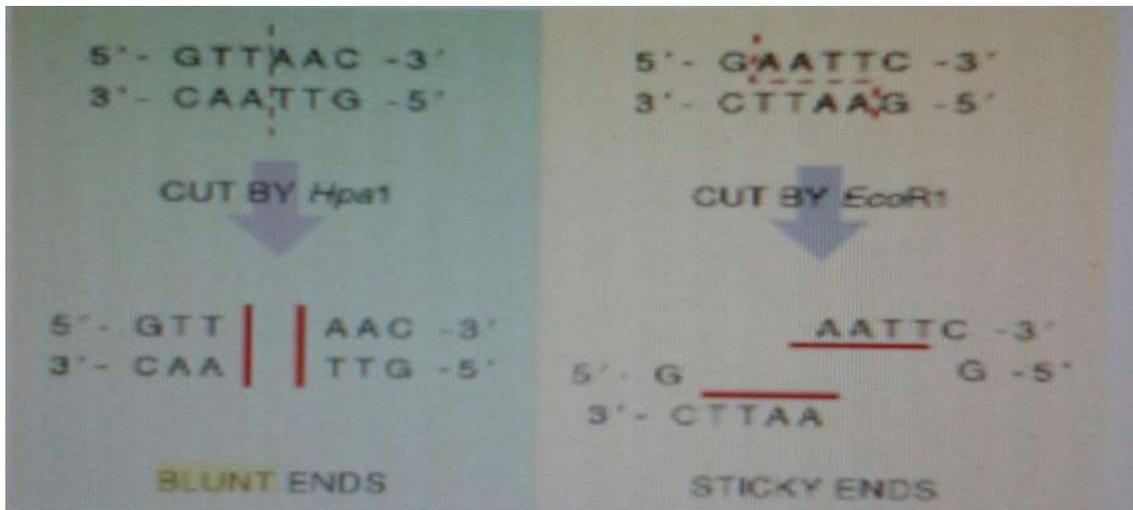
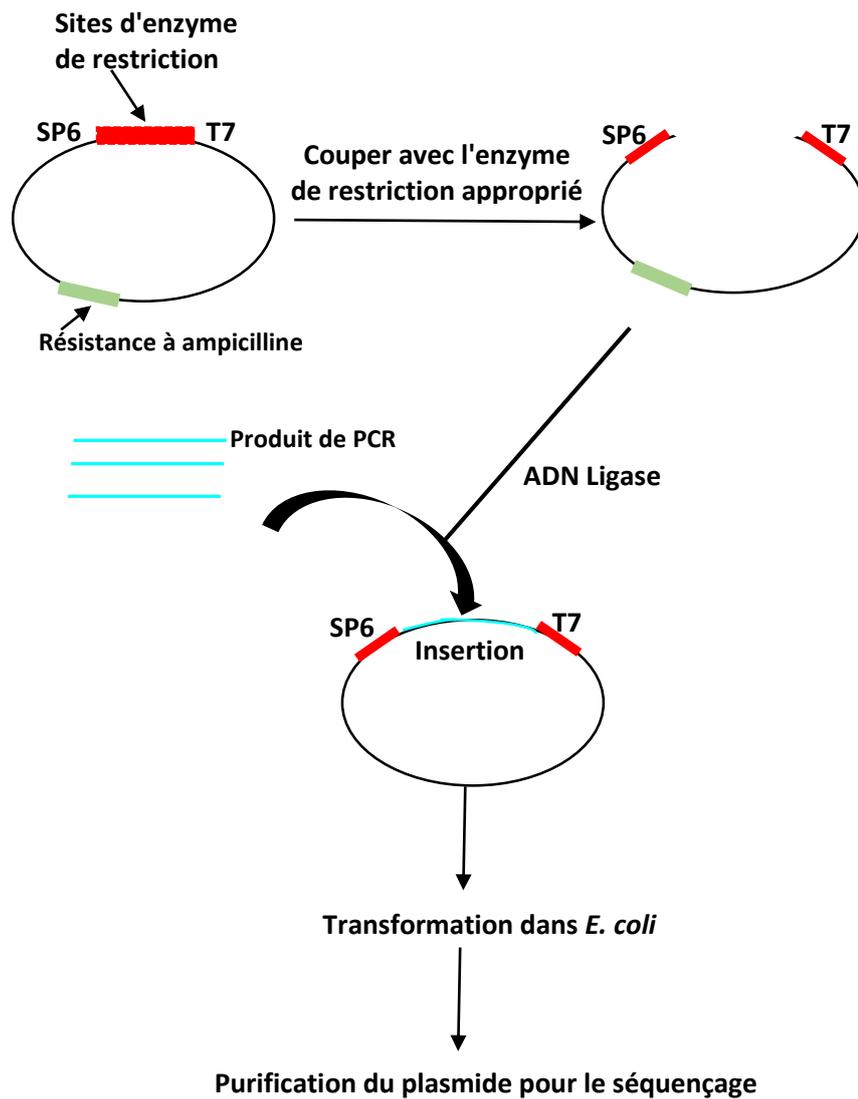


Figure I. 35 : Représentation schématique de l'action de l'enzyme de restriction (Kulkarni, 2002).



Figures I. 36 : Différents types de coupure par les enzymes de restriction (Clark et Pazdernik, 2015).



**Figure I. 37 :** Insertion du produit de PCR (ADN) dans le plasmide (ligation)  
(Becker, 2002).

#### **4. 3. 1. 2. Amplification de l'ADN recombinant**

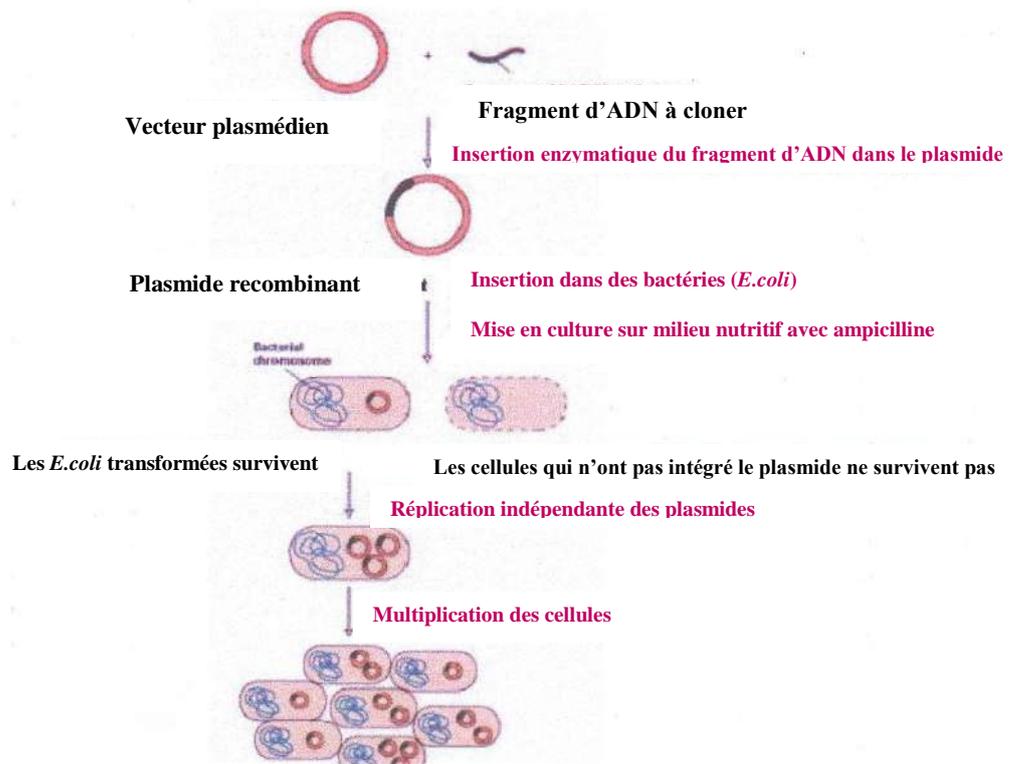
L'ADN recombinant ligaturé pénètre dans une cellule bactérienne par transformation. Après son entrée dans la cellule hôte, le vecteur plasmidique est capable de se répliquer car les plasmides possèdent habituellement une origine de réplication. Maintenant que l'insert d'ADN cible donneur est intégré dans le plasmide, l'ADN donneur est automatiquement répliqué en même temps que le vecteur. Chaque plasmide recombinant qui pénètre dans une cellule formera de multiples copies de lui-même à l'intérieur de celle-ci. Puis de nombreux cycles de division cellulaire auront lieu et les vecteurs recombinants subiront encore d'autres cycles de réplication. La colonie résultante de bactéries contiendra des milliards de copies de l'insert d'ADN donneur de départ (figure I. 38). Cet ensemble de copies amplifiées du fragment unique d'ADN donneur est le clone d'ADN (Cooper, 1999).

#### **4. 3. 1. 3. Sélection des bactéries transformées**

La sélection des bactéries transformées est assurée par l'ajout de l'antibiotique au milieu de culture. Les plasmides utilisés possèdent toujours au moins un gène qui confère la résistance à un antibiotique déterminé. Les cultures bactériennes destinées à la transformation sont par contre sensibles à cet antibiotique. La sélection des bactéries transformées est alors simple : les bactéries qui n'ont pas intégré de plasmides meurent tandis que les autres continuent à se multiplier. Cette première sélection permet donc d'obtenir une culture formée uniquement de bactéries transformées. Il faut encore s'assurer que les bactéries obtenues par cette première sélection aient bien incorporé un plasmide recombiné avec la totalité du gène étranger. Les plasmides en seront extraits et leur qualité sera testée à l'aide de sondes génétiques ou par des techniques permettant de déchiffrer la séquence de nucléotides des molécules d'ADN. Ces méthodes sont appelées le séquençage (Susanne, 1997)

#### **4. 3. 1. 4. Criblage des transformants**

Parmi les transformants ayant intégré un plasmide, il s'agit de sélectionner ceux qui ont intégré le plasmide muni de l'insert. Le criblage des transformants positifs peut se faire de deux manières : un criblage par restriction ou bien un criblage par PCR.



**Figure I. 38** : Représentation schématique du principe du clonage (Cooper, 1999).

### ➤ Criblage par restriction

Ce type de criblage convient lorsque l'on procède à un clonage classique avec un fort taux de réussite. Une dizaine de clones sont sélectionnés, à partir desquels des minipreps (provenant de la minipréparation d'ADN plasmidique) d'ADN plasmidique sont préparées. Les étapes de la miniprep consistent à lyser les cellules par un détergent en milieu alcalin (SDS-NaOH) afin de libérer l'ADN génomique et plasmidique. L'ADN génomique et les protéines sont précipitées par de l'acétate de sodium. Le précipité est séparé par centrifugation, le surnageant contient l'ADN plasmidique. Celui-ci est précipité avec de l'éthanol à 95 % et lavé avec de l'éthanol à 70 % pour dissoudre les sels et restituer ses propriétés physico-chimiques. L'ADN est précipité par un volume double d'éthanol ou un volume égal d'Isopropanol après l'ajout de cations qui neutralisent les charges négatives de la molécule. Les minipreps sont ensuite digérées avec les enzymes de restriction correspondant aux sites d'insertion du clonage.

Le produit de restriction est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les clones ayant intégré un plasmide muni de l'insert souhaité montreront deux bandes après restriction : le vecteur linéarisé et l'insert (Davidovic, 2003).

#### ➤ *Criblage par PCR*

Ce type de criblage est recommandé lorsque le clonage est réalisé sur de petits fragments d'ADN ( $\leq 1\text{Kb}$ ) dont le taux de réussite est plus élevé. Il permet en effet de cribler de nombreux transformants sans passer par l'étape des minipreps. Pour le criblage par PCR de transformants lors d'un clonage, il est possible de réaliser la PCR directement à partir de la colonie, sans passer par l'étape intermédiaire de miniprep. A l'aide d'un cure-dent stérile, la colonie est prélevée et étalée dans le fond du tube à PCR. Pour lyser les cellules, le tube est mis au choc thermique. Ensuite les réactifs, les amorces spécifiques et les oligos de PCR sont ajoutés au tube et la PCR est ainsi réalisée. Les produits PCR issus de chaque colonie sont séparés sur gel. Seuls les transformants ayant intégré un plasmide muni de l'insert montreront une bande au poids moléculaire attendu, ce qui permet de les discriminer (Davidovic, 2003).

#### **4. 3. 1. 5. Séquençage de l'ADN purifié (séquençage des clones)**

Lorsqu'un clone d'ADN spécifique a été étudié, le séquençage constitue généralement une étape critique, car il permet de déterminer l'enchaînement des désoxyribonucléotides et en conséquence de déterminer si le clone comprend toute la longueur du message, s'il contient une extrémité 5' avec un codon d'initiation AUG, ainsi qu'une portion non traduite nécessaire à l'initiation correcte de la traduction du message en protéine (Chlyah et Demarly, 1993). Le séquençage passe généralement par une série de procédés automatisés dans des installations centralisées qui séquent quotidiennement des centaines d'échantillons. Les résultats sont interprétés par ordinateur et stockés dans des banques de données faciles à analyser avec les logiciels disponibles. Il existe deux techniques de séquençage, la technique dite enzymatique (méthode de Sanger-Coulson) ainsi que la technique chimique (méthode d'Allan Maxam et Walter Gilbert). Grâce au développement de la PCR, cette méthode de Sanger-Coulson est considérée comme la méthode la plus utilisée actuellement. Dans cette méthode, on part d'une population de molécules identiques, soit un produit de la PCR, soit un fragment d'ADN clone. L'ADN modèle est mélangé à une amorce complémentaire de l'extrémité 3' d'un brin de la région à séquencer. Si le modèle est un produit de la PCR, l'amorce de séquençage peut être une (mais une seule) dans des amorces de la PCR. Le mélange

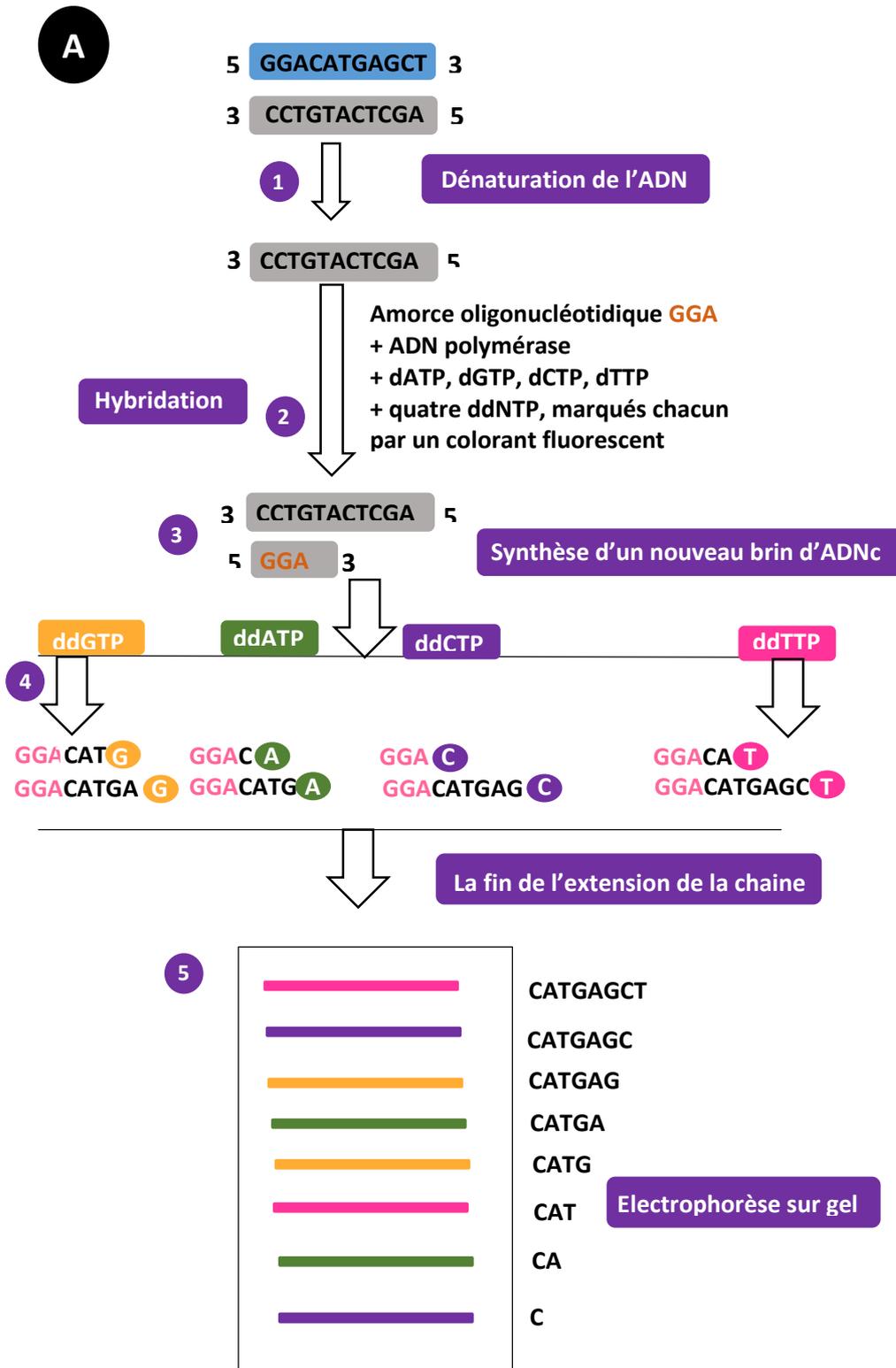
réactionnel contient aussi l'ADN polymérase résistante à la chaleur *Taq*, les précurseurs des quatre dideoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) et une faible concentration de précurseurs modifiés, appelés dideoxyribonucléosides triphosphates ou ddNTP. Ces ddNTP (ddATP, ddCTP, ddTTP et ddGTP) sont modifiés par addition d'un colorant fluorescent différent à leur extrémité 3' (Karp, 2010). Les étapes de base du séquençage sont récapitulées dans la figure I. 39 (A, B et C).

#### **4. 4. Étude de l'expression de génique par PCR quantitative (qPCR)**

PCR quantitative permet aux biologistes d'étudier rapidement l'expression des gènes dans des conditions variables. Cette expression génique quantitative est liée particulièrement au gène lorsqu'il est exprimé en une étape ou d'un tissu de développement particulier en réponse à une perturbation physiologique particulière (Cseke et *al.*, 2016).

##### **4. 4. 1. Transcription réverse (synthèse de l'ADNc)**

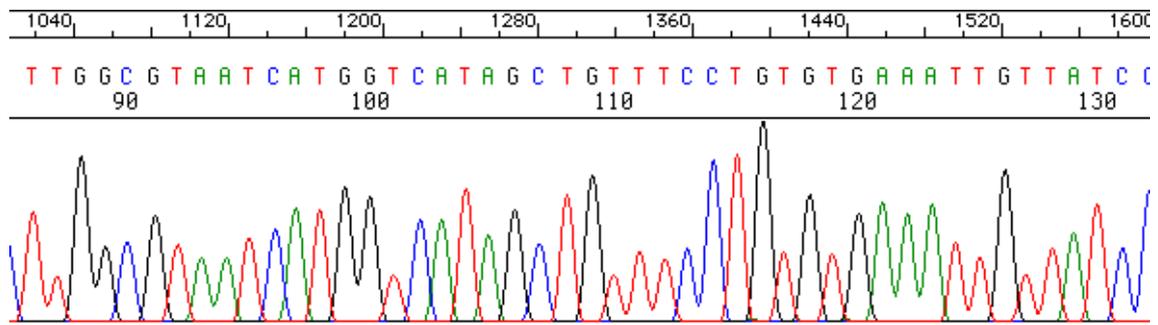
Contrairement à l'ADN, l'ARN, trop instable, ne peut être ni cloné, ni amplifié par PCR, ni séquencé. Dans la plupart des cas, étudier l'ARN impose donc dans un premier temps une rétrotranscription de l'ARN en ADN. C'est cette copie qui sera analysée. Cela revient à inverser le sens normal de l'information génétique (de l'ADN vers l'ARN) (Read et Donnai, 2008). Le produit final de l'action de la transcriptase réverse sur un ARNm est une molécule d'ADN à double hélice appelée ADN complémentaire (ADNc). L'ensemble de l'ARN extrait est soumis à une transcription inverse puis une réaction de PCR est réalisée sur l'ADNc total avec des amorces spécifiques du gène à étudier. Une librairie d'ADNc peut être fabriquée par transcription inverse à partir du pool total d'ARN d'un tissu puis en clonant les ADNc en série. Les bibliothèques d'ADNc tissus-spécifiques sont très utiles pour identifier les gènes et leurs profils d'expression (figure I. 40).



**Figure I. 39 (A) :** Etapes du séquençage (méthode de Sanger-Coulson) (Karp, 2010).

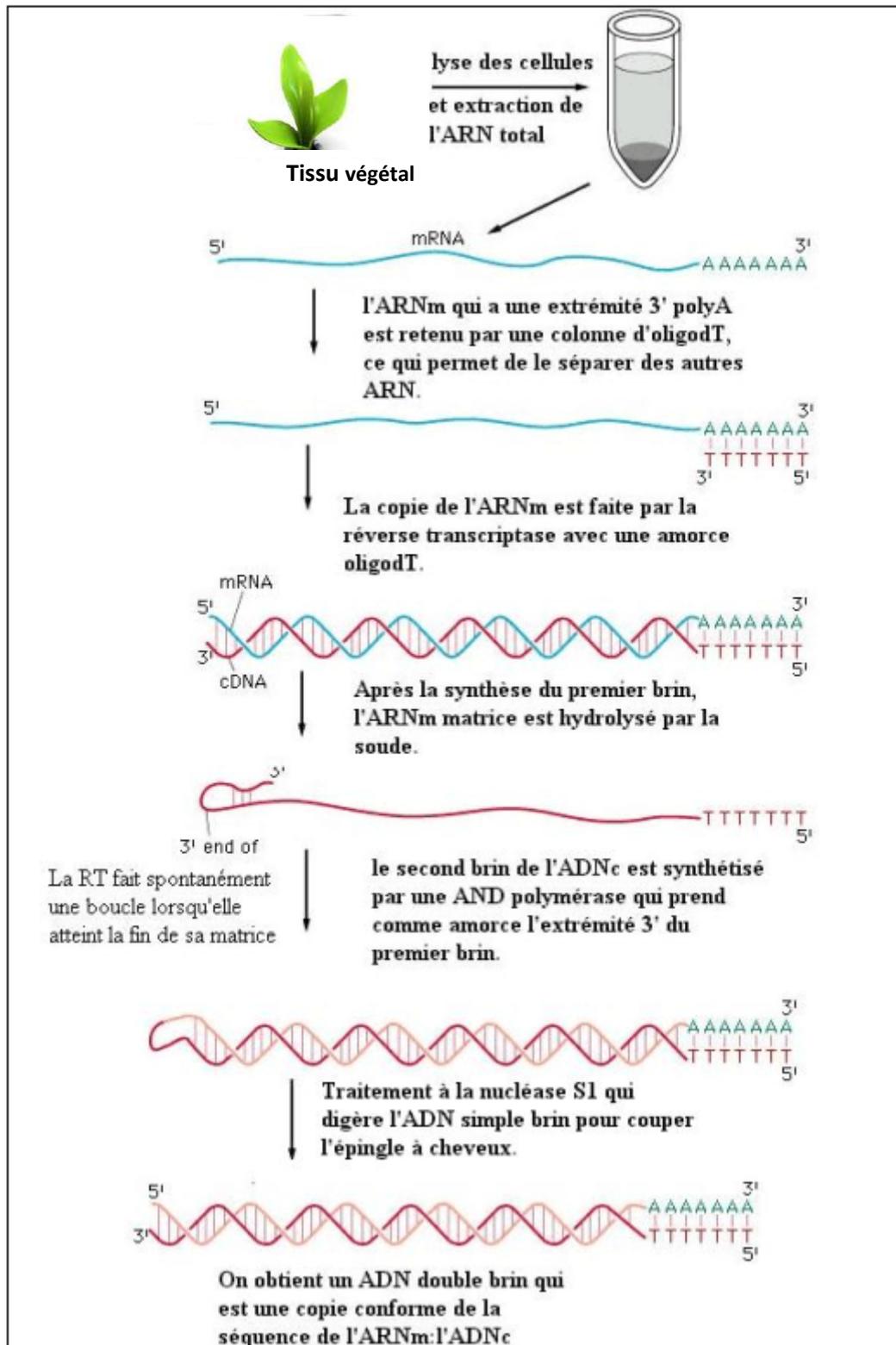
**B**

Les Pistes du gel dans lesquelles les molécules filles fluorescentes sont séparées. La couleur de la bande est déterminée par le didéoxynucléotide de l'extrémité 3' du brin d'ADN.

**C**

La séquence des nucléotides du brin modèle est interprétée par un ordinateur qui « lit » le gel de bas en haut en se basant sur l'intensité et la longueur d'onde de la lumière fluorescente. L'ordinateur donne un « électrophérogramme » montrant l'intensité et la couleur de la fluorescence détectée et l'interprétation de la séquence d'ADN.

**Figure I. 39 (B et C) :** Les Pistes du gel et interprétation de la séquence par ordinateur (Karp, 2010).



**Figure I. 40** : Schéma récapitulatif de la Transcription réverse et de la synthèse de l'ADNc (Tagu et Moussard, 2003).

#### **4. 4. 2. Conception des amorces**

La conception des amorces est représentée au niveau de la page 59 (Voir sous titre 4. 2. 2. Conception des amorces).

#### **4. 4. 3. Choix des gènes cibles ou candidats**

Le stress salin entraîne le déclenchement de plusieurs gènes, tels que les gènes impliqués dans la biosynthèse d'osmoticum comme la choline mono-oxygénase (CMO) et  $\Delta$ 1-pyrroline-5- carboxylate synthétase (P5CS) (Ueda et *al.*, 2004). La recherche de gènes candidats peut avoir plusieurs objectifs, soit la compréhension des mécanismes de tolérance, soit l'analyse de la diversité de séquence ou d'expression de ces gènes chez les plantes stressées. Ces gènes peuvent être classés en trois groupes fonctionnels majeurs : 1) ceux qui contrôlent l'assimilation et le transport du sel ; 2) ceux qui possèdent une fonction osmotique ou protectrice ; et 3) ceux qui permettent à la plante de croître plus rapidement dans un sol salin (Munns, 2005).

#### **4. 4. 4. Sélection des gènes de ménage**

Un gène de ménage (Housekeeping Gene HKG) est un gène qui s'exprime dans tous les types cellulaires et dont les produits assurent les fonctions indispensables à la survie des cellules. Il ne subisse donc pas de régulation (Batt, 2014). En quantification relative, l'expression d'un gène cible est exprimée par rapport à un gène de référence d'expression stable sous forme d'un rapport (la liste de certains gènes de ménage est représentée dans le (tableau I. 7).

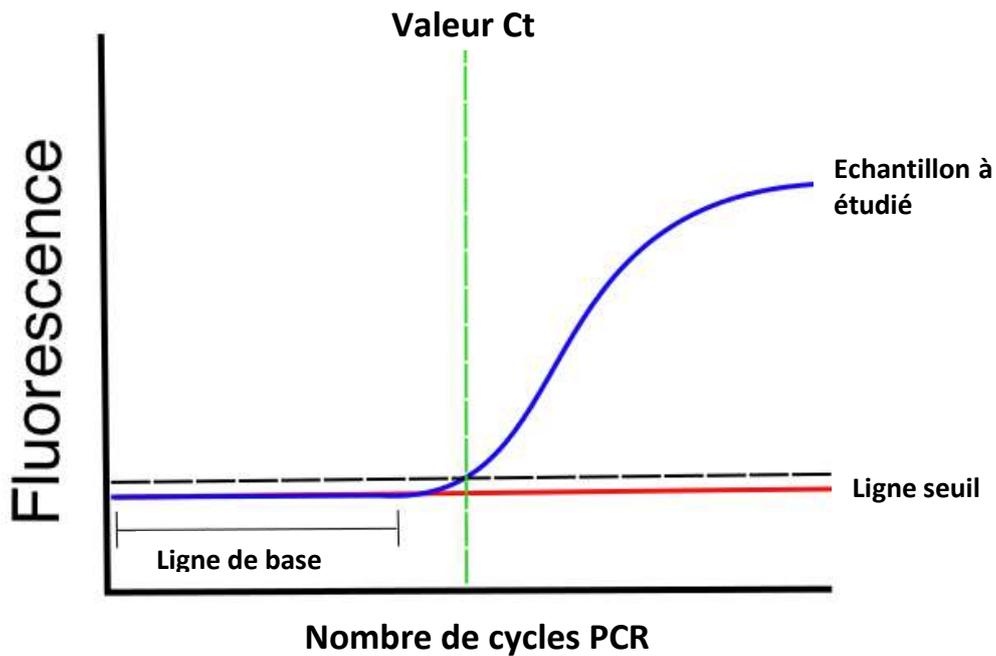
#### **4. 4. 5. Réaction de PCR quantitative en temps réel**

La PCR quantitative (qPCR) appelée également la PCR quantitative en temps réel, dont l'ancienne appellation « PCR en temps réel » tend à être abandonnée à cause de la confusion induite par la terminologie anglaise RT-PCR (reverse transcription PCR ou real-time PCR). La PCRq est un outil puissant pour l'analyse en biologie moléculaire et en biotechnologies. (Dooms et *al.*, 2014). Cette méthode peut être utilisée pour évaluer l'expression différentielle des gènes. C'est une méthode rapide, quantitative et peut être appliquée dans un système à haut-débit d'échantillonnage. Elle est quantitative : c'est-à-dire qu'elle permet de répondre à la question : combien y a-t-il d'ADN ou d'ARN matrice (l'ARN étant converti en ADN par la transcriptase) dans un échantillon donné ? (Prescott et *al.*, 2010).

**Tableau I. 7** : Liste de certains gènes de ménage (Housekeeping Gene HKG)  
(Nicot et *al.*, 2005).

Nom	Numéro d'accèsion	séquence d'amorce 5'-3'	séquence d'amorce 5'-3'	Longueur (bp)	T <sub>m</sub> (°C)
<b>β-tubulin ef1a L2</b>	609267	ATGTTCAAGCGCAAGGCTT	TCTGCAACCGGGTCATTCAT	101	79
	AB061263	ATTGAAACGGATATGCTCCA	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA	101	79
	39816659	ATTGAAACGGATATGCTCCA	CATTCTCTCGCCGAAATCG	121	82
<b>18S rRNA</b>	X67238	GGGCATTCTGATTTTCATAGTCAGAG	CGGTTCTTGATTAATGAAAACATCCT	101	75
<b>aprt</b>	CK270447	GAACCGGAGCAGGTGAAGAA	GAAGCAATCCCAGCGATACG	121	80
<b>Actin</b>	X55749	GCTTCCCGATGGTCAAGTCA	GGATTCCAGCTGCTTCCATTC	101	81
<b>Cyclophilin</b>	AF126551	CTCTTCGCCGATAACCACTCC	TCACACGGTGAAGGTTGAG	121	81
<b>Hsp20.2</b>	BQ511516	TGTTGAAGTTGGGTCTTAGCATA GAAG	CCTCCAGTGCAGGCATGTC	76	78

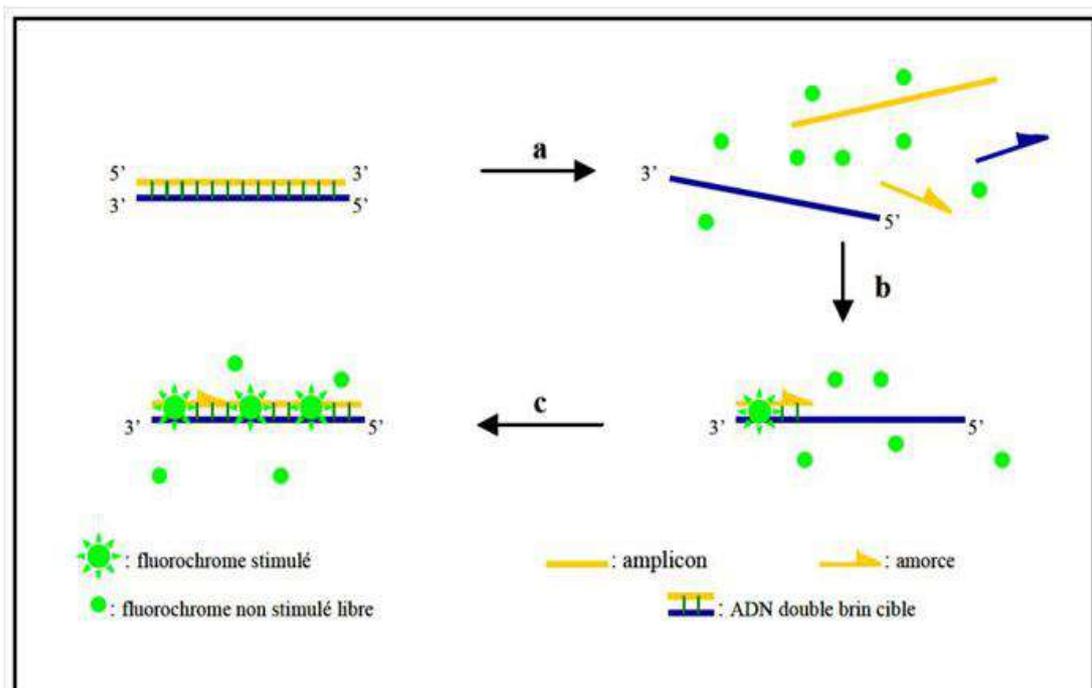
Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable. Cette PCR autorise une mesure de la quantité d'ADN amplifié à chaque cycle et non à la fin de l'expérience. Afin de quantifier les niveaux de transcription des gènes choisis, l'ARN doit tout d'abord être transformé en ADN complémentaire (ADNc) par une étape de rétrotranscription (RT). Par la suite, les ADNc sont amplifiés par PCR, à l'aide d'amorces spécifiques à un seul gène. Il s'agit d'une PCR en temps réel, puisque des mesures de fluorescence sont prises à chaque cycle d'amplification (Rioux, 2009). Ainsi, chaque échantillon se voit attribué une valeur de Ct (threshold cycle ou cycle seuil) correspondant. Le cycle seuil Ct est le nombre de cycles de la PCR où le signal de la fluorescence atteint la valeur du seuil. Ct est directement lié à la quantité d'ADN cible présent au début de la PCR (Guillaume, 2009). Ces mesures de Ct permettent de déterminer la quantité initiale de l'ADNc qui se trouvait dans l'échantillon (figure I. 41).



**Figure I. 41 :** Cycle seuil Ct (Threshold level) sur une courbe d'amplification PCRq en temps réel (Guillaume, 2009).

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes (Poitras et Houde, 2002). Ces sondes couplant généralement un fluorochrome et un « quencheur » qui absorbe la fluorescence du fluorochrome, les deux étant physiquement séparés lors de l'amplification, ce qui entraîne l'apparition d'un signal (Mattiuzzo, 2009). La méthode de PCR quantitative en temps réel à base de SYBR Green (marqueur) consiste à suivre l'apparition en temps réel de l'ADN double brin grâce à un marqueur n'interférant pas avec l'activité de la polymérase. Ce marqueur montre peu de fluorescence en solution mais dès qu'il s'intercale dans l'ADN double-brin plus précisément dans son sillon mineur une grande amélioration fluorescente peut apparaître (Singh et *al.*, 2017) (figure I. 42). Cette fluorescence est en relation avec la quantité d'amplicons. Plus la quantité de ces derniers augmente en fonction des cycles de la PCR, plus le signal de fluorescence sera élevé, ce qui permet ainsi le suivi de l'amplification et, par la suite, la quantification des transcrits cibles (Acton, 2013). Le

SYBR Green est un marqueur qui permet une quantification très sensible mais non spécifique. La méthode SYBR Green est peu coûteuse par rapport à d'autres méthodes de PCR en temps réel dans lesquelles les sondes sont marquées avec des colorants fluorescents. L'un des inconvénients de ce colorant SYBR Green I c'est qu'il peut se lier au double brin d'autres produits tels que les dimères d'amorces (figure I. 43), ce qui provoque une amplification non spécifique (Makowski, 2005).



**Figure I. 42 :** Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay). (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) À la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel (Poitras et Houde, 2002).

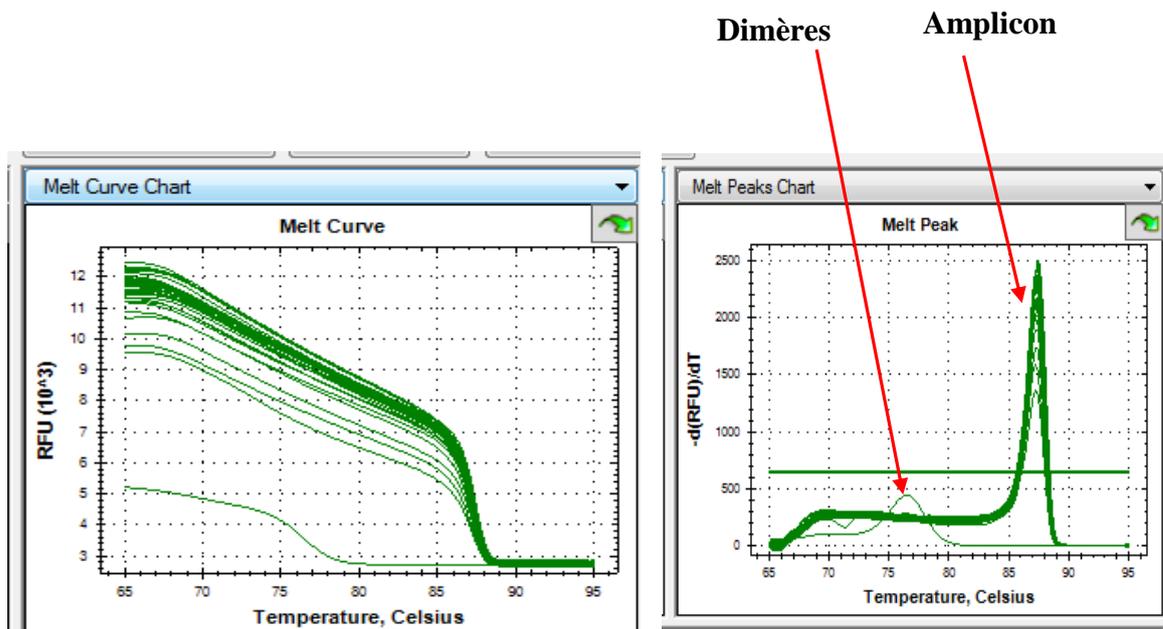


Figure I. 43 : Courbe de fusion.

#### 4. 4. 6. Analyse des données

Il existe deux types de quantification possibles grâce à la qRT-PCR (RT-PCR quantitative) : la quantification relative et la quantification absolue.

**La quantification absolue :** Les premiers travaux basés sur cette approche ont été réalisés par Michael Becker-Andre dès 1989 (Becker-Andre and Hahlbrock, 1989). Cette quantification est utilisée pour déterminer le nombre de copies de l'ARN spécifique par cellule ou unité de masse en utilisant une courbe étalon (Stanta, 2011) en s'appuyant sur des dilutions standards de concentration connue, la concentration absolue du gène cible est ainsi déterminée (Walker et Rapley, 2009). Ce type de quantification est plus utilisé pour déterminer le nombre absolu de particules infectieuses (virus, bactéries) dans des échantillons biologiques (Martell et *al.*, 1999). Elle est définie par l'équation exponentielle suivante (Pugnière, 2012) :  $N_c = N_0 \times (1+\varepsilon)^c$  (1.14)

Où :  $N_c$  est le nombre de copies détectées au bout du cycle  $c$   
 $N_0$  est le nombre de copies initialement présentes dans le tube  
 $\varepsilon$  est l'efficacité d'amplification de la réaction

Pour **la quantification relative**, l'expression d'un gène cible est mesurée par rapport à un ou plusieurs gènes de référence (Acton, 2013). Pas besoin de standards de concentration connue. Les gènes les plus souvent utilisés comme références sont des gènes dits « de ménage » «housekeeping» dont l'expression doit être constante (Lorkowski et Cullen, 2006). Des amorces de gène de référence (ou amorces de contrôle

interne) sont incluses lors de la Relative RT-PCR afin de permettre la normalisation de l'échantillon. Les amorces du contrôle interne et les amorces du gène cible sont alors combinées lors des réactions de qRT-PCR. Les données issues de cette quantification sont exprimées en un rapport du produit du gène cible au produit de contrôle interne (Murphy, 2011). C'est grâce aux **valeurs de Ct** (cycle threshold) que les niveaux de transcription des gènes peuvent être comparés entre les conditions testées (Weissensteiner et *al.*, 2003). Dans la qRT-PCR, le nombre de cycles nécessaires à la fluorescence pour atteindre un seuil de détection spécifique est appelé (seuil de cycle= cycle threshold) Ct. La valeur de Ct est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN dans l'échantillon (Patrinos et *al.*, 2009). Cette valeur est prise dans la phase exponentielle, là où la pente est linéaire. On place le seuil (ligne rouge) dans cette phase, et le Ct se mesure là où la courbe PCR croise le seuil (figure 41). Le seuil est différent pour chaque essai de la PCRq en temps réel (chaque gène testé), et il est le même pour tous les échantillons testés avec ce gène spécifique (Franklin et Čellárová, 2017).

➤ **Normalisation des résultats**

La normalisation se fait avec des gènes de référence est une étape très importante de l'expression relative des gènes par q RT-PCR. Il est généralement présumé que ces gènes ont une expression ubiquitaire, stable entre les différents tissus, entre les individus, et quelles que soient les conditions expérimentales. L'utilisation de ce contrôle endogène permet en théorie de contrôler toutes les étapes du protocole expérimental, son expression reflétant non seulement la quantité et la qualité de l'ARN utilisé, mais aussi les efficacités de la qRT-PCR. Donc elle permet de s'assurer que les différences d'expression calculées ne sont pas causées par des variations entre les échantillons ou des erreurs de manipulation, comme la quantité variable d'ARN ajoutée lors de l'étape de rétro-transcription (Bustin et *al.*, 2005).

La formule utilisée pour calculer l'expression relative des gènes est la suivante (Livak et Schmittgen, 2001) :

$$\text{Expression relative} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ Cible} - Ct \text{ Référence}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ témoin}$$

## CHAPITRE II

### MATERIELS ET METHODES

#### 1. Matériel végétal

Les semences d'*Atriplex halimus* proviennent de deux régions distinctes de l'Algérie. La population steppique (P1) provient de la wilaya de Djelfa, la population du littoral (P2) provient de la wilaya de Tipaza. Les semences de l'halophyte *Crithmum maritimum* proviennent de la wilaya de Tipaza. Les fruits sont décortiqués manuellement dans le but d'extraire la graine de l'enveloppe. La wilaya de Djelfa est comprise entre 2° et 5° de longitude Est et entre 33° et 35° de latitude Nord. Elle est caractérisée par un climat méditerranéen avec une saison estivale de 6 mois environ, sèche et chaude, le semestre hivernal (Octobre- Avril) étant par contre pluvieux et froid (Le Houérou et al ., 1977). Avec un total de précipitation de 313,67mm/ans (entre 1990 et 2012), et des moyennes de température maximale et minimale (Max : 34,18°C – min : 0,22°C) respectivement. Les taux de salinité varient de 0.9 à plus de 1.9 mmho/cm (Rahmani, 2016). La wilaya de Tipaza se situe à latitude 36°35'22"N et longitude 2°26'5"E. Son climat est chaud et tempéré avec huit mois humides d'octobre à mai et quatre mois secs de juin à septembre. Les précipitations annuelles moyennes sont de 631 mm et une température moyenne annuelle de 18.5 °C (1999-2005). La CE du sol dépasse 6 mmho/cm (Bouderbala, 2015).

## 2. Semis et conditions de culture

Les graines ont été semées dans des pots contenant du sable moyen séché à raison de dix pots par traitement pour l'*A. halimus* et six pots pour *C. maritimum*. Immédiatement après le semis, les graines ont été irriguées avec de l'eau distillée jusqu'à l'apparition des feuilles cotylédonaires. Le dispositif expérimental utilisé est un dispositif expérimental homogène à randomisation totale aléatoire. La culture a été conduite dans un Phytotron à 25°C, avec une photopériode de 16 heures de lumière (90  $\mu\text{mol de m}^{-2}\text{s}^{-1}$  de tubes fluorescents blancs chauds) et 8 heures d'obscurité (figure II. 1). Ensuite, l'irrigation était poursuivie avec une solution nutritive (pH 5,6 ; Morard, 1973, adapté par Morard, 1995) (Tableau II. 1 et 2). Le stress salin a été appliqué juste après l'apparition de la première paire de feuilles (concentrations de NaCl : 0, 34, 85, 171 et 256 mM pour l'*Atriplex halimus* et 0, 34, 85, 171, 256, 341, 427 and 512 mM NaCl pour *Crithmum maritimu*). La conductivité électrique a été mesurée (Tableau II. 3 et 4) et elle était constante tout au long de l'expérience. Les plantes ont été cultivées pendant six semaines sous ces conditions salines. Les feuilles et les racines destinées pour les différentes analyses ont été choisies parmi plus d'une plante pour chaque analyse.

## 3. Paramètres étudiés

Les paramètres étudiés sont d'ordres physiologiques, biochimiques et génétiques. Les échantillons destinés aux différentes analyses ont été prélevés après une semaine, deux semaines et six semaines de la date d'application des différentes concentrations en NaCl. En général, les différentes analyses ont été effectuées sur les feuilles et les racines.



**Phytotron**



*Atriplex halimus*



*Crithmum maritimum*

**Figure II. 1 :** Mise en culture des deux espèces étudiées (*Atriplex halimus* et *Crithmum maritimum*).

**Tableau II. 1 :** Solution nutritive, macroéléments (Morard, 1995).

	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Na</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>Cl</b>
<b>Macro-éléments</b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ca<sup>+</sup></b>	<b>Mg<sup>++</sup></b>	<b>Na<sup>+</sup></b>	<b>No3<sup>-</sup></b>	<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	<b>SO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	<b>Cl<sup>-</sup></b>
<b>Concentration (mM)</b>	7	5	1.5	-	15	2	1.5	-

**Tableau II. 2 :** Solution nutritive, microéléments (Morard, 1995).

<b>Micro-éléments</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>B</b>	<b>Mo</b>
<b>Concentration (mM)</b>	0,089	0,008	0,0009	0,001	0,024	0,0001

**Tableau II. 3 :** Conductivité électrique des différents traitements salins (*Atriplex halimus*)

<b>Concentrations en NaCl (mM)</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>85</b>	<b>171</b>	<b>256</b>
<b>Conductivité électrique (ms) à 25°C</b>	2,34	5,78	10,93	18,75	25

**Tableau II. 4 :** Conductivité électrique des différents traitements salins

<b>Concentrations en NaCl (mM)</b>	<b>0</b>	<b>34</b>	<b>85</b>	<b>171</b>	<b>256</b>	<b>341</b>	<b>427</b>	<b>512</b>
<b>Conductivité électrique (ms) à 25°C</b>	2,34	5,78	10,93	18,75	25	34,25	43	54 ,14

### 3. 1. Paramètres physiologiques

Cette catégorie de paramètres s'adresse au comportement de l'organisme entier, en général à un stade juvénile chez les deux populations : taux de survie, taux de croissance relative, teneur relative en eau et utilisation des ions majeurs du milieu et l'aptitude de la plante de protéger le système photosynthétique.

#### 3. 1. 1. Taux de survie, taux de croissance relative et teneur en eau

**Le taux de survie et la hauteur des plants** (Pour chacun des 10 pots pour *A. haliums* et des 6 pots pour *C. maritimum*) ont été enregistrés sur une période de six semaines. Notant que pour toutes les plantes survivantes, la hauteur moyenne par pot a été calculée. **Le taux de croissance relative** (RGR = Relative growth rate) a été calculé à partir des données de la hauteur des plantes (Wang, 2011) et ce après une semaine, deux semaines et six semaines sous traitement salin. Trois répétitions d'échantillons provenant de plus d'une plante ont été choisies au hasard pour déterminer la teneur en eau après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin : les feuilles et les tissus racinaires ont été séchés à 105 ° C jusqu'à un poids sec constant. **La teneur en eau** (TE) a été déterminée par la relation :

$$TE (\%) = MF - MS / MF * 100.$$

#### 3. 1. 2. Taux de chlorophylle

La concentration en chlorophylle a été mesurée par spectrophotométrie UV après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin : 100 mg de matière végétale (en triple) ont été broyées dans 80% d'acétone. Les extraits ont été centrifugés à 3000 tr / min pendant 10 minutes dans une microcentrifugeuse (à minispin Eppendorf), puis l'absorption du surnageant a été mesurée à 652 nm. Les concentrations en chlorophylle (mg / mL) ont été déterminées par la formule : Chlorophylle mg / mL = absorbance à 652 nm × 5,8 (Plummer, 1989), puis converties en µg/g MF.

#### 3.1. 3. Dosage des ions K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>

Les ions ont été extraits avec HNO<sub>3</sub> et analysés par photométrie à flamme (en utilisant un spectrophotomètre Cecil 6000) au niveau des feuilles et racines après une semaine, deux semaines et six semaines sous les conditions salines. Des échantillons secs triplés (100 mg, séchés pendant 1 h à 105 ° C avant pesée) ont été placés dans des capsules de silice et introduits dans un four à moufle froid dont la température a été élevée progressivement à 520 ° C (pendant 2 h) et laissés pendant une nuit au frais. Les échantillons ont été ensuite placés dans un dessiccateur pendant 15 minutes et les cendres

ainsi obtenues ont été dissoutes dans 2 ml de HNO<sub>3</sub> (0,5 N), bouillies pendant 20 min, filtrées et ajustées avec de l'eau distillée à 50 ml. Nous avons également calculé le rapport entre K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>.

### **3. 2. Paramètres biochimiques**

L'étude des paramètres d'ordre biochimique peut nous donner une idée sur les caractères cellulaires liés à la tolérance au stress salin tel que : l'accumulation de substances organiques liées au stress salin.

#### **3. 2. 1. Dosage de la proline**

La technique utilisée pour le dosage de la proline est celle de Troll et Linsley (1955). En utilisant un réactif approprié : ninhydrine, la proline donne avec la ninhydrine une coloration jaune (Stryer, 1959).

Trois prélèvements de 100 mg de tissus foliaires et de tissus racinaires ont été effectués pour chaque traitement après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Les échantillons ainsi prélevés ont été introduits respectivement dans des tubes à essais aux quels nous avons ajouté 2 ml d'éthanol à 40%. Puis ils ont été chauffés au bain- marie à 85 °C pendant 60 minutes pour éviter la volatilisation de l'alcool. Après refroidissement, 1 ml de l'extrait a été prélevé auquel a été ajouté 1 ml d'acide acétique et 1 ml du réactif de ninhydrine dont sa préparation était la suivante : (120 ml d'eau distillée + 300 ml d'acide acétique + 80 ml d'acide orthophosphorique à densité de 1,7 + 25 mg de ninhydrine). Le mélange (extrait et réactif) a été porté ensuite à ébullition durant 30 minutes. Après refroidissement 5 ml de benzène ont été ajoutés dans chaque tube : deux phases se séparent, la phase supérieure colorée enjaune indique la présence de la proline alors que la phase inférieure est sans proline. La détermination des densités optiques des différents échantillons a été faite à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 528 nm. Des solutions étalons de proline ont été préparées à partir d'une solution mère à 0,125% dans HCl (0,3N). Les dilutions ont été faites avec HCl (0,3N) afin d'obtenir des concentrations de 0,1 ; 0,2 et 0,4 µg/ml. Une courbe étalon a été établie pour calculer la concentration en proline des différents échantillons.

#### **3. 2. 2. Dosage des sucres solubles**

Le dosage des sucres solubles a été réalisé par la méthode de l'antrone (Plummer, 1989) au niveau des feuilles et des racines après une semaine, deux semaines et 6 semaines du traitement salin.

L'extraction des sucres solubles a été faite après macération du matériel végétal prélevé (trois prélèvements de 100 mg de tissus foliaires et racinaires de chacun des traitements) dans 3 ml d'éthanol à 80% et laissé pendant 48 heures, puis chauffé au bain-marie à 70°C pendant 30 minutes. 2 ml ont été prélevés de l'extrait préalablement dilué 10 fois avec de l'éthanol à 80% auquel nous avons ajouté 4 ml du réactif composé de 0,2 g d'anthrone pure additionné à 100 ml d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Le réactif doit être préparé au moins 4 heures à l'avance. Après agitation, les tubes ont été placés au bain - marie à 92°C pendant 8 minutes, puis refroidis pendant 30 minutes dans la glace et à l'obscurité. L'absorbance a été lue à la spectrophotométrie à une longueur d'onde de 585 nm, et la lecture a été faite d'après la courbe d'étalonnage établie avant le dosage.

### **3. 2. 3. Dosage de la glycine-bétaine**

La glycine-bétaine a été mesurée selon la méthode de Grieve et Grattan (1983). Le tissu végétal (150 mg de tissus foliaires, en trois exemplaires) a été séché à 80 ° C à poids constant et finement broyé, puis secoué mécaniquement avec 20 ml d'eau déionisée pendant 24 h à 25 °C. Les échantillons ont été ensuite filtrés à travers du papier filtre Whatman, les filtrats ont été dilués à 1: 1 avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N et refroidis dans de la glace pendant 1 h. Le réactif KI-I<sub>2</sub> froid (15,7 g d'iodure et d'iodure de potassium (20 g) dissous dans 100 ml d'eau) a été ensuite ajouté et les réactifs ont été rapidement soumis à un vortex. Les tubes ont été stockés à 4 ° C pendant 16 h puis centrifugés à 10 000 g pendant 15 min à 0 ° C dans une microcentrifugeuse (Allegra Beckman Coulter microcentrifuge). Le surnageant a été soigneusement aspiré avec un tube de verre fin et les cristaux de periodide ont été dissous dans 9 ml de 1,2-dichloroéthane. Après 2 h à température ambiante, l'absorbance était mesurée à 365 nm en utilisant comme standard la glycine bétaine (Sigma Aldrich Poole UK) exprimée en mg g<sup>-1</sup> MS.

### **3. 2. 4. Dosage des solutés totaux**

La concentration des solutés totaux dans les racines et les feuilles au cours du temps a été calculée en divisant la somme des concentrations du K<sup>+</sup>, de la proline, des sucres solubles et de la glycine bétaine par la quantité d'eau présente dans le tissu végétal, en fonction de la teneur en eau en%.

### **3. 2. 5. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Le dosage du peroxyde d'hydrogène a été réalisé par un kit nommé (Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit) (Molecular Probes, Invitrogen). Ce kit a été utilisé pour mesurer les concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les feuilles après 6 semaines dans

des conditions salines. Les feuilles fraîches ont été broyées dans de l'azote liquide, puis 500 µl de tampon phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, pH 6,5) ont été ajoutés à 50 mg de tissu congelé broyé. Après centrifugation à 13 000 tr/min pendant 5 min dans une microcentrifugeuse Eppendorf Minispin, 50 µL du surnageant ont été incubés avec 0,2 U ml<sup>-1</sup> de peroxydase de raifort (horseradish *peroxidase*) et 100 mM de réactif Red Amplex (10-acétyl-3,7-dihydrophénoxazine) à température ambiante pendant 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance (à 560 nm) a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (Tecan, Suisse).

### **3. 2. 6. Mesure de l'activité de la catalase**

L'activité de la catalase a été mesurée par spectrophotométrie à 240 nm. Pour cela, 250 mg de feuilles (en trois exemplaires) ont été broyées avec 10% de polyvinylpolypyrrolidone et 10 ml de tampon K-phosphate 100 mM (pH 7,0). L'homogénat a été filtré à travers quatre couches de mousseline (cheesecloth), et le filtrat a été ensuite centrifugé pendant 20 min à 27 000 x g à 4 ° C. L'activité enzymatique a été mesurée sur le surnageant obtenu. Toutes les étapes suivies pour préparer l'extrait enzymatique ont été réalisées à 0- 4°C. L'activité catalase a été déterminée en suivant le procédé d'Aebi (1984) : 1 mL de mélange réactionnel contient 0,05 ml d'extrait, 50 mM de tampon K-phosphate (pH 7,0), 0,1% (v / v) de Triton X-100 et 0,1 ml De H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10,5 mM. La réaction a été effectuée à 25 ° C pendant 2,5 min. Une unité d'activité de catalase est définie comme la quantité d'enzyme qui décompose 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / min dans les conditions de dosage décrites.

### **3. 2. 7. Quantification de l'acide ascorbique**

L'acide ascorbique a été extrait par un procédé de congélation (Nojavan et *al.*, 2008). Les tissus foliaires (100 mg de poids frais, en trois répétition) ont été congelés dans de l'azote liquide puis mélangés avec 5 ml d'une solution contenant 5% d'acide métaphosphorique (MPA). Le mélange a été ainsi homogénéisé pendant 5 min, puis centrifugé à 2000 tr/min pendant 10 min dans une microcentrifugeuse (Allegra Beckman Coulter microcentrifuge). Toutes les extractions ont été effectuées sous une lumière réduite et à 4 ° C. L'analyse HPLC a été effectuée en utilisant une procédure d'élution isocratique avec un détecteur UV à 240 nm. La séparation a été effectuée sur une colonne 5 µm RP C18 de 250 mm x 4,6 mm (Kinetex-Phenomenex). La phase mobile est constituée de 0,5% de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2,25 avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) - acétonitrile (2% du volume final). Un volume d'injection de 20 µl est utilisé dans des analyses quantitatives. Pour

éviter la perte d'acide ascorbique, les solutions standards et les échantillons extraits ont été protégés de la lumière à l'aide de flacons ambrés.

#### **4. Etude de l'expression relative des gènes**

##### **4. 1. Choix des gènes liés au stress salin**

Les gènes étudiés dans notre cas sont les suivants : le gène Choline monooxygénase (CMO) et le gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter. Il est à signaler que le gène CMO a été étudié seulement chez l'*Atriplex halimus* par contre le gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter a été étudié chez les deux espèces : *Atriplex halimus* et *Crithmum maritimum* et ce au niveau des feuilles et des racines après six semaines sous les conditions salines.

##### **4. 2. Conception des amorces dégénérées**

La conception des amorces dégénérées a été établie par le programme NCBI Primer-BLAST. Concernant l'*Atriplex halimus*, les amorces du gène (CMO) sont (séquence 5'-3') : CMOatriplexF: CGAACCTGCCTTCTATGCTC et CMOatriplexR : AAGGGCATACGAAACAYGAC. Ces amorces proviennent d'un alignement des gènes CMO de : l'*Atriplex nummularia* (AB112481), l'*Atriplex prostrata* (AY082068) et l'*Atriplex hortensis* (AF270651) (figure II. 2). Les amorces du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter sont (séquence 5'-3') : Na-HF : GATGTGGGAAACGGAAACC et Na-HR: CAAATTGTTGGTGCTTTGTT. Ces amorces proviennent d'un alignement de l'*Atriplex dimorphostegia* (AY211397) et l'*Atriplex gmelini* (AB038492) (figure II. 3). Notant que ces mêmes amorces concernant le gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter ont été utilisées pour le *Crithmum maritimum* (figure II. 3).

1	gi   19743663   gb   AY082	-----	1
2	gi   8571467   gb   AF2706	-----ATTTGGTTGATCATTCATCTCATCACCTCCTTATATATATATAA	45
3	gi   31879439   dbj   AB11	ACAATATTGAAGAATACAAGCTAAAGCTTAAGCTCAAGTATTTATTTATTTGTTGATCATTCATCTCATCACCTCCTTACATA	80
	gi   19743663   gb   AY082	-----AATCATGGCAGCAAGTGCACAACAACAAT	27
	gi   8571467   gb   AF2706	ATAAATTAATAAATATTAACAAGGAAGTGT--AAGTTTGTGATCATAACAATCATGGCAGCAAGTGCACAACAACAAT	124
	gi   31879439   dbj   AB11	TTATATTAATAAATATTAACAAGGAAGTGTTTAAGTTTGTGATCATTCAACAATCATGGCAGCAAGTGCACAACAACAAT	160
	gi   19743663   gb   AY082	GTTGCTAAAATACCCAACACTACTGTTTGGGAATACCAAATTCATCCTCAAACAATTCCTACTGATCCTTCAAATAACATCG	107
	gi   8571467   gb   AF2706	GTTGCTAAAATACCCAACACTACTGTTTGTGGAATACCAAATTCATCCTCAAACAATTCCTACTGATCCTTCAAATAACATCG	204
	gi   31879439   dbj   AB11	GTTGCTAAAATACCCAACACTACTGTTTGTGGTATACCAAATTCATCCTCAAACAATTCCTACTGATCCTTCAAATAACATCG	240
	gi   19743663   gb   AY082	TCCAAATTCACAAACTAATFACTACAAAAGCCCCCTACTTAAAGTCCCGTACTCCTAATAAACCCGTTAACGCCGTCGCT	187
	gi   8571467   gb   AF2706	TCCAAATTCACAAACTACTACTACTAATAGCCCCCTACTTAAAGTCCCGTACTCCTAATAAACCCGTTAACGCCGTCGCT	284
	gi   31879439   dbj   AB11	TCCAAAATTCACAAACTACTACTACTAATAGCCCCCTACTTAAAGTCCCGTACTCCTAATAAACCCGTTAACGCCGTCGCT	320
	gi   19743663   gb   AY082	GCCCCGGCTTTTCCGTCCGCAACCACCAATCACACCACCCTCCGCGGTCCATCCAATCACTTGTCAAGGATTTTCGATCC	267
	gi   8571467   gb   AF2706	GCCCCGGCTTTTCCGTCCGTAACCACCACATCACACCACCCTCCGTCGTCATCCAATCACTTGTCAAGGATTTTCGATCC	364
	gi   31879439   dbj   AB11	GCCCCGGCTTCCGTCCGTAACCACCACCACACCTCCACTCCGCGGTCCATCCAATCACTTGTCAAGGATTTTCGATCC	400
	gi   19743663   gb   AY082	TTCTAATCCGGCCGAGGATGCTTTTACTCCTCCTAGCTCTTGGTATACCGAACCTGCCTTCTATGCTCATGAAGTTGACC	347
	gi   8571467   gb   AF2706	TTCTAATCCGGCCGAGGATGCTTTTACTCCTCCTAGCTCTTGGTATACCGAACCTGCCTTCTATGCTCATGAAGTTGACC	444
	gi   31879439   dbj   AB11	TTCTAATCCGGCCGAGGATGCTTTTACTCCTCCTAGCTCTTGGTATACCGAACCTGCCTTCTATGCTCATGAAGTTGACC	480
	gi   19743663   gb   AY082	GTATCTTTTACAAAGGATGCTCAAGTCCAGGGTACAGTCAAGTTAAGGAGGCTAACCAATATTTTACCAGGACGTTA	427
	gi   8571467   gb   AF2706	GTATCTTTTACAAAGGATGCTCAAGTCCAGGGTACAGTCAAGTTAAGGAGGCTAACCAATATTTTACCAGGACGTTA	524
	gi   31879439   dbj   AB11	GTATCTTTTACAAAGGATGCTCAAGTCCAGGGTACAGTCAAGTTAAGGAGGCTAACCAATATTTTACCAGGACGTTA	560
	gi   19743663   gb   AY082	GGAAATGTTGAATATTTGGTGAAGTCGAGATGGTGAAGGAAAAGTTCATGCATTTTACAATGTTTGCACCCATCGTGCATC	507
	gi   8571467   gb   AF2706	GGAAATGTTGAATATTTGGTGAAGTCGAGATGGTGAAGGAAAAGTTCATGCATTTTACAATGTTTGCACCCATCGTGCATC	604
	gi   31879439   dbj   AB11	GGAAATGTTGAATATTTGGTGAAGTCGAGATGGTGAAGGAAAAGTTCATGCATTTTACAATGTTTGCACCCATCGTGCATC	640
	gi   19743663   gb   AY082	TATTCTTGCTTGTGGAAGTGGCAAAAATGTCGTGTTTCGTATGCCCTTATCATGGATGGGTATATGGCATGAATGGAAAGCC	587
	gi   8571467   gb   AF2706	TATTCTTGCTTGTGGAAGTGGCAAAAAGTTCGTGTTTCGTATGCCCTTATCATGGATGGGTATATGGCATGAATGGATCGC	684
	gi   31879439   dbj   AB11	TATTCTTGCTTGTGGAAGTGGCAAAAAGTTCGTGTTTCGTATGCCCTTATCATGGATGGGTATATGGCATGAATGGATCGC	720
	gi   19743663   gb   AY082	TTACGAAAGCTTCGAAAGCAACAGCAGAACAACTAATCCCGATGAAGTGGGCTTGTACCCTAAAAGTTGCAGAA	667
	gi   8571467   gb   AF2706	TTACGAAAGCTTCGAAAGCAACAGCAGAACAACTAATCCCGATGAAGTGGGCTTGTACCCTAAAAGTTGCAGAA	764
	gi   31879439   dbj   AB11	TTACGAAAGCTTCGAAAGCAACAGCAGAACAACTAATCCCGATGAAGTGGGCTTGTACCCTAAAAGTTGCAGAA	800
	gi   19743663   gb   AY082	TGGGCCCCATTTATACTCATCAGTTTACACAGATCAAGCCGTGAAGTAGGTGACGTTGGATCTGAATGGCTTGGTAGTTG	747
	gi   8571467   gb   AF2706	TGGGCCCCATTTATACTCATCAGTTTACACAGATCAAGCCGTGAAGTAGGTGACGTTGGATCTGAATGGCTTGGTAGTTG	844
	gi   31879439   dbj   AB11	TGGGCCCCATTTATACTCATCAGTTTACACAGATCAAGCCGTGAAGTAGGTGACGTTGGATCTGAATGGCTTGGTAGTTG	880
	gi   19743663   gb   AY082	TGCTGAAGATGTTAAGGCCATGCTTTTGACCCGAATCTCAGTTTATTAATAGGAGTGAATTTCCAATTGAATCTAATT	827
	gi   8571467   gb   AF2706	TGCTGAAGATGTTAAGGCCATGCTTTTGACCCGAATCTCAGTTTATTAATAGGAGTGAATTTCCAATTGAATCTAATT	924
	gi   31879439   dbj   AB11	TGCTGAAGATGTTAAGGCCATGCTTTTGACCCGAATCTCAGTTTATTAATAGGAGTGAATTTCCAATTGAATCTAATT	960
	gi   19743663   gb   AY082	GGAAATTTTTCAGTGACAACCTATTTGGATAGCTCGTACCATGTTTCCCTTATGCACACAAATACTATGCAACTGAACTCGAC	907
	gi   8571467   gb   AF2706	GGAAATTTTTCAGTGACAACCTATTTGGATAGCTCGTACCATGTTTCCCTTATGCACACAAATACTATGCAACTGAACTCGAC	1004
	gi   31879439   dbj   AB11	GGAAATTTTTCAGTGACAACCTATTTGGATAGCTCGTACCATGTTTCCCTTATGCACACAAATACTATGCAACTGAACTCGAC	1040

- 1 *Atriplex postrata*
- 2 *Atriplex hortensis*
- 3 *Atriplex nummularia*

Figure II. 2 : Alignement de séquences (ou alignement séquentiel) du gène CMO de l'*Atriplex postrata*, l'*Atriplex hortensis* et l'*Atriplex nummularia*.

gi   19743663   gb   AY082	TTTGA	CACTTACCAAACCGATATGGTTGGAAATGTCACGATTCAAAGGGTGGCTGGGACTTCAAACAATGGTTTTAGTAG	987
gi   8571467   gb   AF2706	TTTGATACTTACCAAACCGATATGGTTGGAAATGTCACGATTCAAAGGGTGGCTGGGACTTCAAACAATGGTTTTAATAG		1084
gi   31879439   dbj   AB11	TTTGATACTTACCAAACCGATATGGTTGGAAATGTCACGATTCAAAGGGTGGCTGGGACTTCAAACAATGGTTTTAATAG		1120
gi   19743663   gb   AY082	AA	TTGGAAGCTCAAGCCTTCTATGCTTTTGCATACCCAAACTTTGCTGTGAAAGGTATGGCCCTTGGATGACTACTATGC	1067
gi   8571467   gb   AF2706	ACTTTGGAAGCTCAAGCCTTCTATGCTTTTGCATACCCAAACTTTGCTGTGAAAGGTATGGCCCTTGGATGACTACAATGC		1164
gi   31879439   dbj   AB11	ACTTTGGAAGCTCAAGCCTTCTATGCTTTTGCATACCCAAACTTTGCTGTGAAAGGTATGGCCCTTGGATGACTACAATGC		1200
gi   19743663   gb   AY082	ATATTGTTCCATTAGGACCAAGGAAATGCAAACTAGTGGTGGACTACTATATTGAAAAATCAAAGCTGGACGACAAGGAT		1147
gi   8571467   gb   AF2706	ATATTGTTCCATTAGGACCAAGGAAATGCAAACTAGTGGTGGACTACTATATTGAAAAATCAAAGCTGGACGACAAGGAT		1244
gi   31879439   dbj   AB11	ATATTGTTCCATTAGGACCAAGGAAATGCAAACTAGTGGTGGACTACTATATTGAAAAATCAAAGCTGGACGACAAGGAT		1280
gi   19743663   gb   AY082	TACATCGAAAAGGGCATAGCAATCAATGATAATGTGCAGAAAGAAGATGTGGTGTGTGTGAAAGCGTCCAAAAAGGGTT		1227
gi   8571467   gb   AF2706	TACATCGAAAAGGGCATAGCAATCAATGATAATGTGCAGAAAGAAGATGTGGTGTGTGTGAAAGCGTCCAAAAAGGGTT		1324
gi   31879439   dbj   AB11	TACATCGAAAAGGGCATAGCAATCAATGATAATGTGCAGAAAGAAGATGTGGTGTGTGTGAAAGCGTCCAAAAAGGGTT		1360
gi   19743663   gb   AY082	GGAGACACCAGCATATCGTAGTGGAGATATGTGATGCCAATTGAGAAAGGAATTCACCATTTCACCTGCTGGTTACACC		1307
gi   8571467   gb   AF2706	GGAGACACCAGCATATCGTAGTGGAGATATGTGATGCCAATTGAGAAAGGAATTCACCATTTCACCTGCTGGTTACACC		1404
gi   31879439   dbj   AB11	GGAGACACCAGCATATCGTAGTGGAGATATGTGATGCCAATTGAGAAAGGAATTCACCATTTCACCTGCTGGTTACACC		1440
gi   19743663   gb   AY082	AAGTCTTGAAGTGATTGCACCCAGATTATCTATAATCTTGGTTTCTTTCCTTCTATGATTGGATATTATAATAATAAGTA		1387
gi   8571467   gb   AF2706	AAGTGTGGAAGTGATTGCACCCAGATTATCTATAATCTTGGTTTCTTTCCTTCTATGATTGGATATTATAATAA---GTA		1481
gi   31879439   dbj   AB11	AAGTGTGGAAGTGATTGCACCCAGATTATCTATAATCTTGGTTTCTTTCCTTCTATGATTGGATATTATAATAA---GTA		1513
gi   19743663   gb   AY082	AAATTATAATGTCATCATTTAGTTGAGATTGTTATTAGAGTTGAGCGTATGCTCCTTAGTAACGTGTGTATGTTGTTAAG		1467
gi   8571467   gb   AF2706	AAATTATAATGTCATCATTTAGTTGAGATTGTTATTAGAGTTGAGCGTATGCTCCTTAGTAACGTGTGTATGTTGTTAAG		1561
gi   31879439   dbj   AB11	AAATTATAATGTCATCATTTAGTTGAGATTGTTATTAGAGTTGAGCGTATGCTCCTTAGTAACGTGTGTATGTTGTTAAG		1588
gi   19743663   gb   AY082	TGTTTGGTTATGGGC	AAAAATGTTTGTATTGCTAGAAATTTTATAATAATAGTATGGTGTGCTGATGTCCAATATAAATAAA	1547
gi   8571467   gb   AF2706	TGTTTGGTCAATGGTA	AAAAATGTTTGTATTGCTAGAAATTTTATAATAATAGTATGGTGTGCTGATGTCCAATATAAATAAA	1641
gi   31879439   dbj   AB11	---TTGGTCATGGGC	AAAAATGTTTGTATTGCTAGAAATTTTATAATAATAGTATGGTGTGCTGATGTCCAATATAAATAAA	1665
gi   19743663   gb   AY082	GACCATAGCACCCCTTCCCTACTTAAGAAATAATATCCCATACATATTTTCAGGGGAAGCTATGAGATTGTCATGAAC		1627
gi   8571467   gb   AF2706	GAA	CATAGCACCCCTTCCCTACTTAAGAAATAATATCCCATACATATTTTCAGGGGAAGCTATGAGATTGTCATGAAC	1718
gi   31879439   dbj   AB11	CACCATAGCACCCG	TTTCCTACTTAAGAAATAATATCCCATACATATTTTCAGGGGAAGCTATGAGATTGTCATGAAC	1693
gi   19743663   gb   AY082	ATTAATTTTCGGAC	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1669
gi   8571467   gb   AF2706	A	-----AAAAAAAAAAAAA-----	1732
gi   31879439   dbj   AB11	-----	-----	1693

**Figure II. 2 (suite) :** Alignement de séquences (ou alignement séquentiel) du gène CMO de l'*Atriplex prostrata*, l'*Atriplex hortensis* et l'*Atiplex nummularia*.

## Antipoter Atriplex/Crithmum

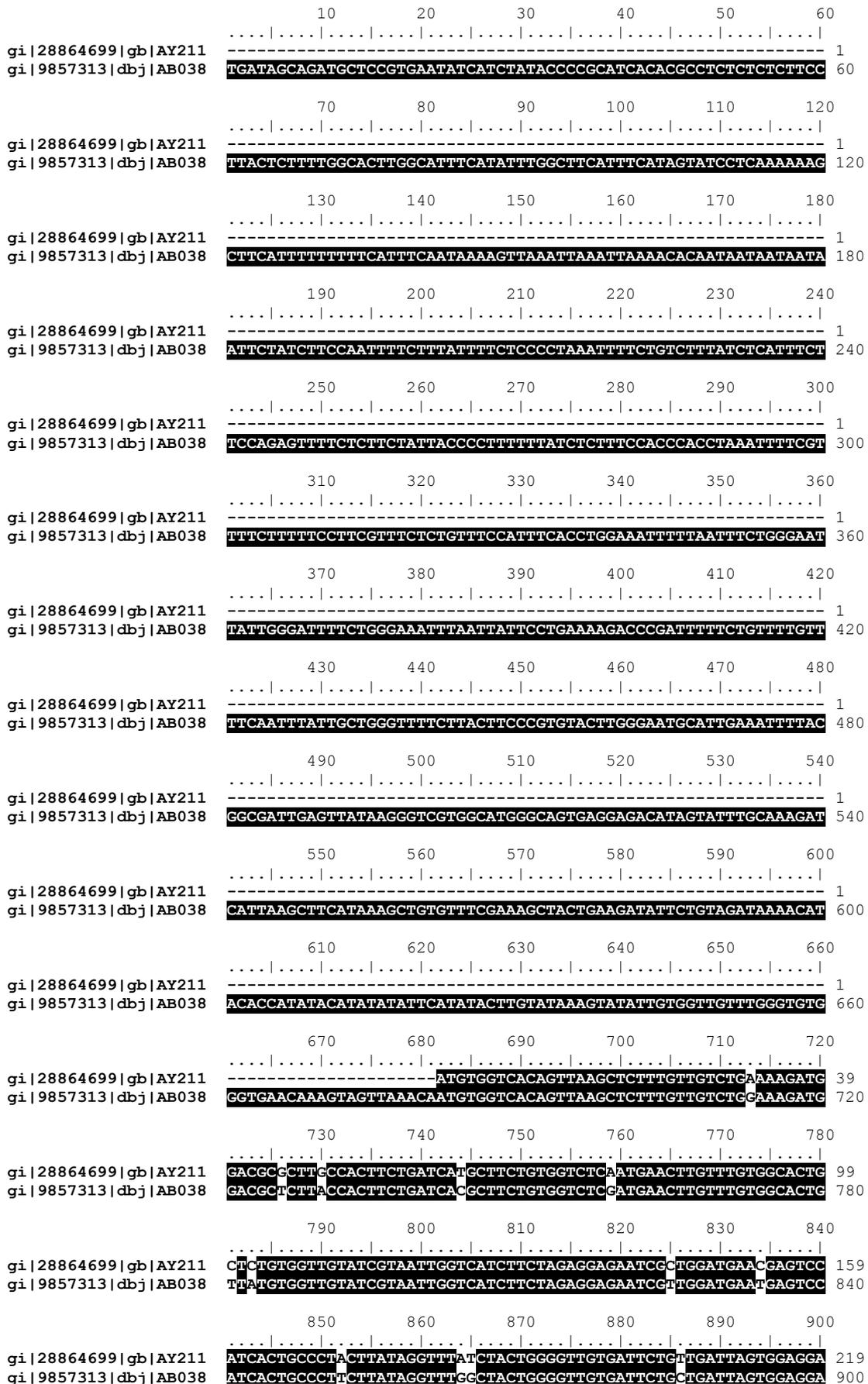


Figure II. 3 : Alignement de séquences (ou alignement séquentiel) du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antipoter de l'*Atriplex dimorphostegia* et l'*Atriplex gmelini*.

```

          910      920      930      940      950      960
gi|28864699|gb|AY211 AAGAGTTCACATCTTTTGGTCTTCAGTGAAGATCTTTTCTTCATATACCTTCTTCCGCCA 279
gi|9857313|dbj|AB038 AAAAGTTCACATCTTTTGGTCTTCAGTGAAGATCTTTTCTTCATATACCTTCTTCCGCCG 960

          970      980      990      1000     1010     1020
gi|28864699|gb|AY211 ATTATATTAAATGCAGGCTTTCAGTGAAGAAGAAGCAGTTCTTCCGCAACTTCATTACT 339
gi|9857313|dbj|AB038 ATTATATTCAATGCAGGCTTTCAGTGAAGAAGAAGCAGTTCTTCCGCAACTTCATTACT 1020

          1030     1040     1050     1060     1070     1080
gi|28864699|gb|AY211 ATCCTATTCTTTGGAGCTGTTGGTACATTGGTATCATTACCATCATATCTCTGGGAGCG 399
gi|9857313|dbj|AB038 ATCTCTATTGTTGGAGCTGTTGGTACATTGGTATCATTACCATCATATCTCTGGGAGCG 1080

          1090     1100     1110     1120     1130     1140
gi|28864699|gb|AY211 TTGTCAATTTTAAAGAAATTGGATATCGGTACTCTGGAGTTGGCTGACTATCTTGCAATT 459
gi|9857313|dbj|AB038 TTGTCAATTTTAAAGAAATTGGATATCGGTACTCTGGAGTTGGCTGACTATCTTGCAATT 1140

          1150     1160     1170     1180     1190     1200
gi|28864699|gb|AY211 GGTGCAATATTTGCTGCCACAGATTCTGTTGTCACACTGCAGGTTCTTAATCAGGATGAG 519
gi|9857313|dbj|AB038 GGTGCAATATTTGCTGCCACAGATTCTGTTGTCACACTGCAGGTTCTTAATCAGGATGAG 1200

          1210     1220     1230     1240     1250     1260
gi|28864699|gb|AY211 ACCCCTCTGCTCTACAGTCTGGTCTTTGGCGAGGGTGTTCCTAAAGATGCCACATCAGTG 579
gi|9857313|dbj|AB038 ACCCCTCTGCTCTACAGTCTGGTCTTTGGCGAGGGTGTTCCTAAAGATGCCACATCAGTG 1260

          1270     1280     1290     1300     1310     1320
gi|28864699|gb|AY211 GTGCTTTTCAATGCAATTCAGAGCTTTGACCTCACAAGAATTGATCACAAGAATCGCTTTG 639
gi|9857313|dbj|AB038 GTTCTTTTCAATGCAATTCAGAGCTTTGACCTCACAAGAATTGATCACAAGAATCGCTTTA 1320

          1330     1340     1350     1360     1370     1380
gi|28864699|gb|AY211 CAATTTATGGGCAACTTCTCATATTTATTTATCGCAAGCACTATACTTGGAGCATTTACT 699
gi|9857313|dbj|AB038 CAATTTATGGGCAACTTCTCATATTTATTTATCGCAAGCACATACTTGGAGCATTTACT 1380

          1390     1400     1410     1420     1430     1440
gi|28864699|gb|AY211 GGCTTCTCAGTGTCTTACCTTATCAAAAAGCTGTACTTTGGAAGGCATTCCACTGATCGT 759
gi|9857313|dbj|AB038 GGCTTCTCAGTGTCTTACCTTATCAAAAAGCTGTACTTTGGAAGGCATTCCACTGATCGT 1440

          1450     1460     1470     1480     1490     1500
gi|28864699|gb|AY211 GAGGTTGCTTTAATGATGCTTATGGCATATCTATCTTACATGCTTCTGTAAGTTTCTAT 819
gi|9857313|dbj|AB038 GAGGTTGCTTTAATGATGCTTATGGCTTATCTATCTTACATGCTTCTGTAAGTTTCTAT 1500

          1510     1520     1530     1540     1550     1560
gi|28864699|gb|AY211 TTGAGTGGAAATCTTACTGTATTCTTCTGTGGGATGTGCATGTCCATTATACCTGGCAC 879
gi|9857313|dbj|AB038 TTGAGTGGAAATCTTACTGTATTCTTCTGTGGGATGTGCATGTCCATTATACCTGGCAC 1560

          1570     1580     1590     1600     1610     1620
gi|28864699|gb|AY211 AATGTGACCGAGAGCTCAAGAGTAACCACCAAGCATGCTTTTGCACACTCTCTTTTGT 939
gi|9857313|dbj|AB038 AATGTGACCGAGAGCTCAAGAGTAACCACCAAGCATGCTTTTGCACACTCTCTTTTGT 1620

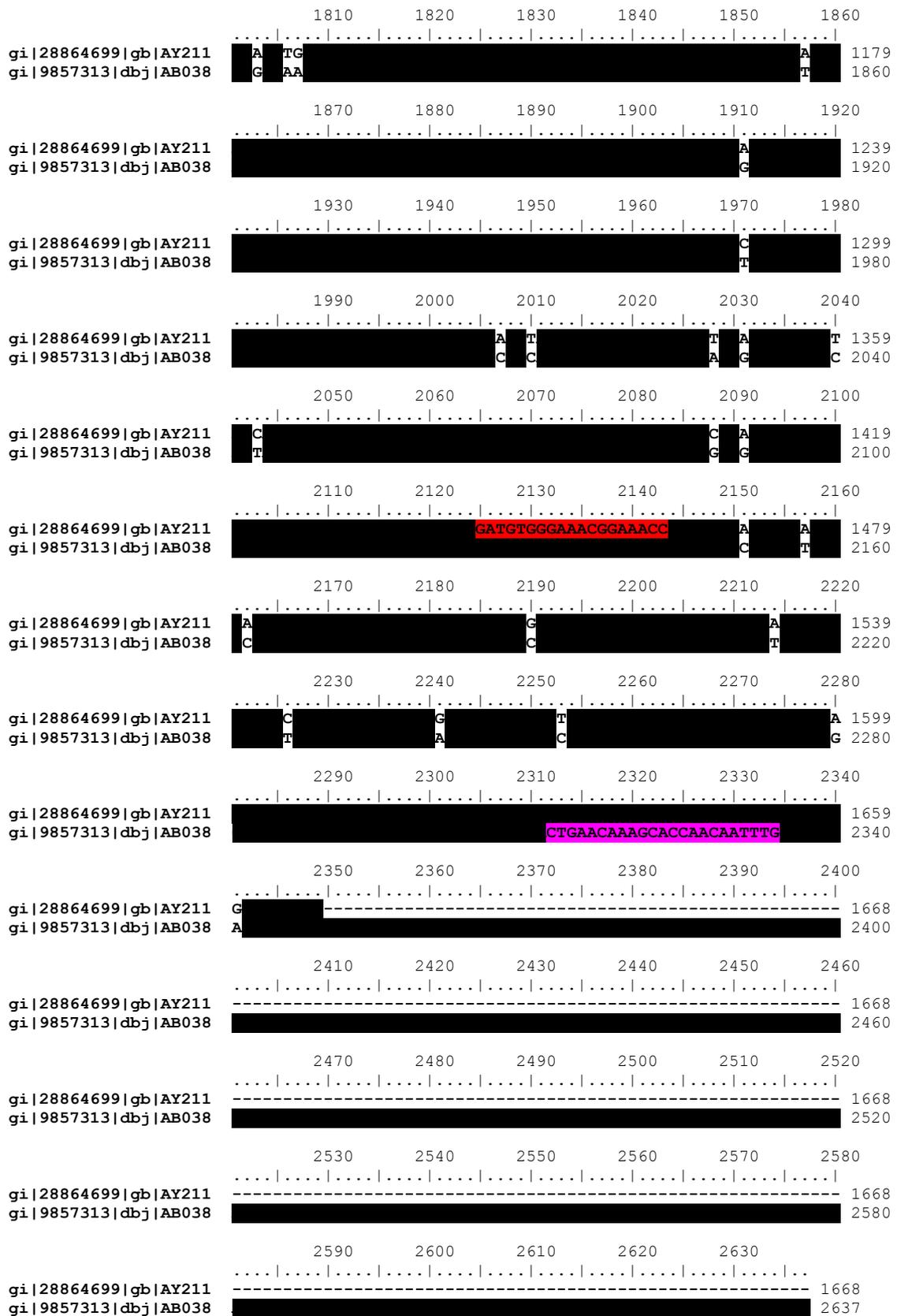
          1630     1640     1650     1660     1670     1680
gi|28864699|gb|AY211 GCTGAGGTTTTCCTCTTTTCTATATGTTGGTATGGATGCCCTTGGACATTGAGAAGTGAGA 999
gi|9857313|dbj|AB038 GCTGAGGTTTTCCTATTTTCTATATGTCGGTATGGATGCCCTTGGACATTGAGAAGTGAGA 1680

          1690     1700     1710     1720     1730     1740
gi|28864699|gb|AY211 TTTGTGAGTGATAGTCTTGGCATTCTGTTGCTGTGAGTTCCATATTGTTAGGCTTAGTC 1059
gi|9857313|dbj|AB038 TTTGTGAGTGATAGTCTTGGCATTCTGTTGCTGTGAGTTCCATATTGTTAGGCTTAGTC 1740

          1750     1760     1770     1780     1790     1800
gi|28864699|gb|AY211 ATGGTTGGAAGAGCAGCTTTTGTTCCTCCCTTATCTGGTTGATGAACCTTGCCAAGAAA 1119
gi|9857313|dbj|AB038 ATGGTTGGAAGAGCAGCTTTTGTTCCTCCCTTATCTGGTTGATGAACCTTGCCAAGAAA 1800

```

**Figure II. 3 (suite) :** Alignement de séquences (ou alignement séquentiel) du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporteur de l'*Atriplex dimorphostegia* et l'*Atriplex gmelini*.



**Figure II. 3 (suite) :** Alignement de séquences (ou alignement séquentiel) du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antipporter de l'*Atriplex dimorphostegia* et l'*Atriplex gmelini*.

### 4. 3. Clonage

Le clonage réalisé dans notre cas peut être résumé par la figure II. 4. Il a été réalisé seulement sur le gène CMO (Choline monooxygénase) chez une seule espèce *Atriplex halimus* et sur un seul échantillon prévenant des feuilles des jeunes plantules de la population steppique (P1) soumise à la concentration en NaCl 171 mM. La confirmation de la spécificité des amorces du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter chez l'*Atriplex halimus* et *Crithmum maritimu* a été réalisée par une PCR directe avec les amorces spécifiques sans passage par le clonage puis suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose et autoradiographie. Les échantillons choisis (tissus foliaires) pour le test de PCR chez l'*A. halimus* proviennent de la population steppique P1 soumise à 171 et 256 Mm NaCl et de la population du littoral P2 soumise à 34 Mm NaCl. Chez *C. maritimum* l'échantillon choisi (tissus foliaires) est celui qui a été soumis à la concentration saline de 256 mM NaCl.

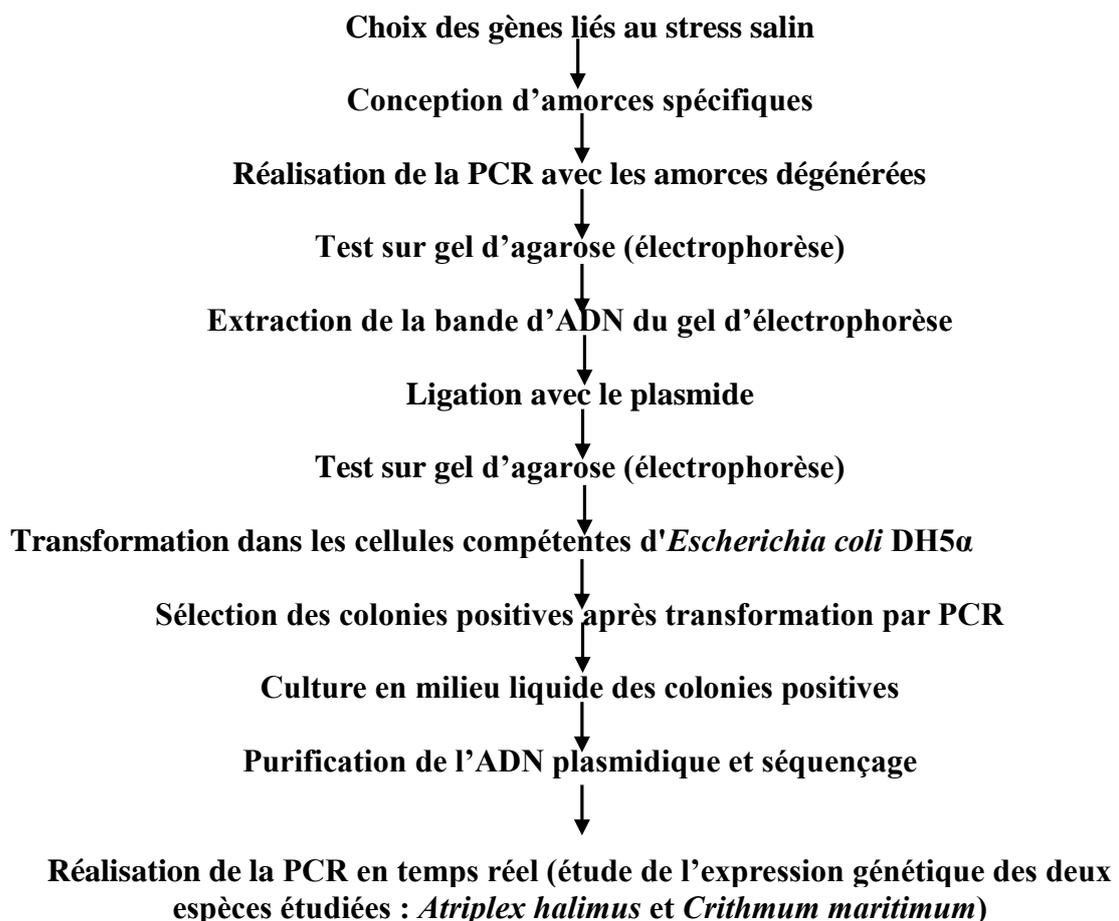


Figure II. 4 : Les étapes récapitulatives du clonage.

### **4. 3. 1. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)**

#### **4. 3. 1. 1. Extraction de l'ARN**

L'extraction de l'ARN a été réalisée en premier lieu sur un seul échantillon. Cet ARN issu de cet échantillon a été ensuite utilisé pour la synthèse de l'ADNc et par conséquent utilisé pour le clonage. L'échantillon choisi provient de la population steppique (P1) (tissu foliaire) soumise à une concentration saline de 171 mM. Le protocole utilisé pour l'extraction de l'ARN était le suivant :

- Le tissu foliaire fraîchement récolté a été broyé dans l'azote liquide (N<sub>2</sub>).
- 100 µl de la solution de lyse ont été ajoutés tout en continuant à broyer.
- 125 µl d'éthanol ont été ajoutés et mélangés avec vortex.
- 150 µl ont été prélevés de l'extrait et centrifugés dans des tubes en microfiltres pendant 10 secondes (à une vitesse maximale).
- 180 µl de la solution de nettoyage ont été ajoutés puis centrifugation pendant 10 secondes. Cette étape est répétée deux fois. Les débris ont été collectés et éliminés. Une autre centrifugation pendant 10 minutes est nécessaire pour se débarrasser de toute trace de résidus.
- Le microfilte ont été ensuite placé dans un autre tube stérile.
- 15 µl de la solution d'élution (préalablement chauffée à 75°C) ont été ajoutés au centre du microfiltre. Ce mélange a été incubé à la température ambiante pendant 1 à 2 minutes.
- Centrifugation pendant 30 secondes (au maximum).
- Cette étape (d'élution) a été répétée deux fois.
- Récupération de l'ARN après centrifugation.
- Quantification de l'ARN dans l'extrait : La concentration de l'ARN (ng/µl) a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm (A<sub>260</sub>) au spectrophotomètre (Nanodrop).
- Electrophorèse sur gel d'agarose : le gel d'électrophorèse a été préparé comme suit :
  - 0,5 g d'agarose dans 50 ml de tampon TEA (Tris-acetate-EDTA) (Annexe 1).
  - Le mélange a été porté à une légère ébullition puis refroidi un petit peu.
  - Une fois refroidi nous avons ajouté au mélange le bromure d'éthidium (la quantité d'éthidium varie généralement de 2-3 µl pour 100 ml de

gel). Le gel a été ensuite coulé dans les moules d'électrophorèse. 20 min sont nécessaires pour la solidification du gel. Le marqueur de PM (Poids Moléculaire) [1kb] a été déposé dans la première position du gel suivi par l'ARN des échantillons étudiés (10 µl d'ARN avec 2 µl de bleu de bromophénol).

- Traitement à la DNase : pour éliminer toute contamination de l'ARN, ce dernier a subi un traitement de la DNase (DNase est une enzyme catalysant les acides désoxyribonucléiques en nucléotides ou polynucléotides). Les étapes du traitement à la DNase étaient les suivantes :
  - 13 µl de l'extrait de l'ARN ont été prélevés.
  - Puis 2 µl du tampon RQ1 DNase ont été ajoutés.
  - 2 µl de RQ1 DNase ont été ajoutés.
  - Le volume final a été ajusté avec 2 µl d'eau distillée stérile.
  - Incubation à 37°C pendant 30 minutes.
  - Après incubation 2 µl de RQ1 DNase stop ont été ajoutés afin de stopper la réaction.
  - Incubation à 65°C pendant 10 minutes.
  - 19 µl de l'ARN purifié sont utilisés pour la synthèse de l'ADNc.
  - Electrophorèse sur gel d'agarose (voir page 100) suivie par visualisation des bandes aux UV.

#### **4. 3. 1. 2. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc)**

Le premier brin de l'ADNc a été synthétisé à partir de l'ARN isolé en utilisant M-MLV RNase H de la transcriptase inverse (Promega). Cette enzyme a l'activité RNase H enlevée, ce qui empêche la dégradation des matrices d'ARN et assure un rendement plus élevé et un plus grand pourcentage de toute la longueur de synthèse du premier brin. Le protocole utilisé pour la synthèse de l'ADNc était le suivant :

1. 19 µl d'extrait d'ARN (préalablement traité à la DNase pour éliminer l'ADN génomique) ont été prélevés dans un 0.5ml tube Eppendorf.
2. 1µl de Oligo (dt) 15 (500 µg / ml) (Deoxy poly T primer dont il annelle au poly A de la chaîne de l'ARN) a été ajouté.
3. Mise en marche de la machine PCR pour fournir les températures suivantes :
  - Incubation à 70°C pendant 10min.

- Après incubation l'Eppendorf a été mis dans de la glace (ou dans la machine PCR à 0°C) pendant 10 min.
  - Addition de:
    - 6 µl of 5 x 1<sup>st</sup> tampon de brin (1st strand buffer).
    - 2 µl DTT 0.1M (dithiothréitol - agent réducteur comme stabilisant).
    - 1 µl 10 mM dNTPs (un **dNTP** est l'appellation courante du mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy-adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy-cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy-guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy-thymine tri-phosphate)).
  - Incubation à 42°C pendant 2 min.
  - Addition de :
    - 1 µl Reverse transcriptase.
  - Incubation à 42°C pendant 50 min.
  - Désactivation à 70°C pendant 17 min.
- 4. Production de l'ADN simple brin.
- 5. Mesure de la concentration de l'ADNc (ng/µl) par spectrophotomètre (Nanodrop).
- 6. Conservation de l'ADNc à -80°C. Utilisez 1 µl pour un volume de 25 µl pour une éventuelle PCR.

#### 4. 3. 1. 3. Confirmation de la synthèse de l'ADNc

La confirmation de la synthèse de l'ADNc a été assurée par PCR en utilisant des amorces 18S ARNr (**PUV2**) : TTCCATGCTAATGTATTTCAGAG / (**PUV4**) : ATGGTGGTGACGGGTGAC)

- Préparation du mélange de la PCR (25 µl volume final) : Dans chaque tube Eppendorf nous avons mis :
  - 1 µl d'ADNc.
  - 0.5 µl dNTP (10 mM)
  - 2.5 µl 10x Tampon de PCR.
  - 1 µl de chaque amorce 18S rARN : PUV2/PUV4 à 10 µM.
  - 0.125 µl de Taq polymerase.
  - Ajustement à 25 µl avec l'eau distillée stérile.
  - PCR suivant le programme suivant.

- 1- 1 min à 95°C (afin d'activer l'enzyme Taq polymerase).
  - 2- 1 min à 95°C (étape de dénaturation).
  - 3- 1 min à la température d'annelage (55°C)
  - 4- 1 min à 72°C (afin d'assurer l'extension du nouveau brin).
  - 5- 5 min à 72°C (pour permettre aux produits inachevés de terminer la réaction).
- } PCR de 40 cycles

Les tubes ont été maintenus à 15°C jusqu'à l'arrêt total de toutes les réactions.

- Electrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des bandes sous UV.
- **NB** : les produits de PCR ont été ensuite stockés à 4°C pour une courte durée de stockage ou à -20°C pour un stockage à longue durée.

#### 4. 3. 2. PCR avec les amorces dégénérées

Une PCR a été effectuée sur l'ADNc avec les amorces dégénérées spécifiques à l'*Atriplex halimus*. Suivie par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des bandes aux UV.

#### 4. 3. 3. Extraction de la bande d'ADN du gel d'électrophorèse

Les étapes de l'extraction étaient les suivantes :

- 6- Le fragment d'ADN a été découpé du gel d'agarose sur un Transilluminateur UV à l'aide d'un scalpel stérile.
- 7- L'extraction et la purification de cet ADN après découpage a été réalisée par le kit : QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Le protocole d'extraction et de purification est le suivant :
  - La tranche du gel a été pesée dans un tube stérile. Puis 3 volumes du tampon QG à 1 volume du gel (100 mg pour 100 µl) ont été ajoutés.
  - Incubation à 50°C pendant 10 min (ou bien jusqu'à dissolution totale de la tranche du gel). Mélange au vortex chaque 2-3 min durant l'incubation.
  - Après la dissolution totale de la tranche du gel, la couleur du mélange a été vérifiée si elle est jaune. Dans le cas où la couleur est orange ou violet, l'ajout de 10 µl ou 3 M acétate de sodium est nécessaire avec un pH = 5. La couleur du mélange changera vers le jaune. L'absorption de l'ADN au QIAquick membrane est efficace seulement lorsque le pH 7,5. Le tampon QG est caractérisé par un

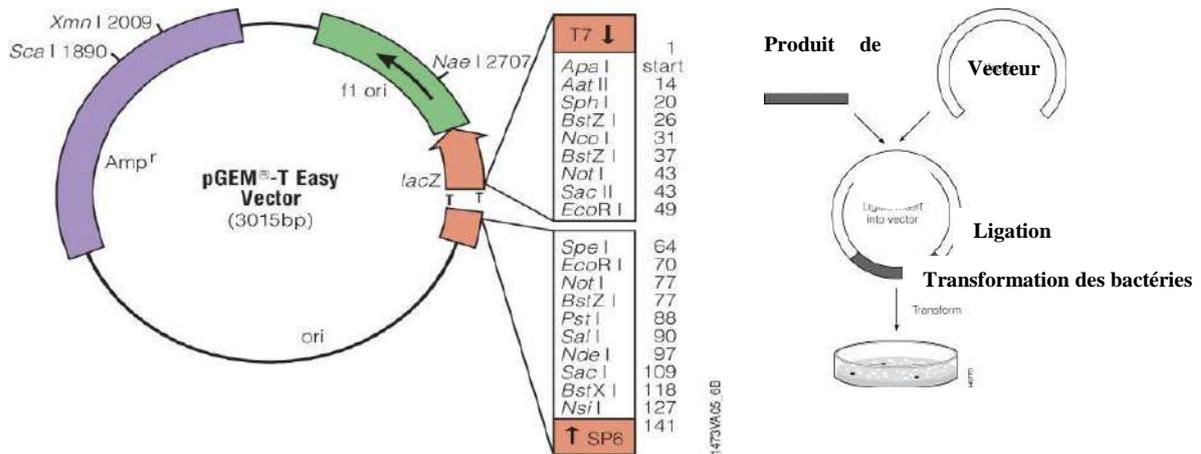
pH indicateur avec la couleur jaune à un  $\text{pH} \leq 7,5$  et la couleur orange ou violet indique que le pH est plus élevé.

- 1 volume d'isopropanol correspond au poids du gel a été ajouté à ce mélange. Par exemple : pour 100 mg de la tranche du gel 100  $\mu\text{l}$  ont été ajoutés d'isopropanol mais sans centrifugation. Cette étape augmente le rendement des fragments d'ADN  $< 500 \text{ bp}$  et  $> 4 \text{ kb}$ .
- Le mélange a été ensuite transféré dans une colonne QIAquick. la colonne a été placée dans un tube de collection 2ml. Centrifugation pendant 1 min.
- Débarrassage de tout ce qui a été collecté dans le tube. Ensuite la colonne a été mise de nouveau dans le tube. 0,75 ml du tampon PE ont été ajoutés dans la colonne QIAquick. Centrifugation pendant 1 min à 13000 rpm.
- La colonne QIAquick a été placée dans un nouveau tube 1,5 ml. Afin d'éluer l'ADN, 50  $\mu\text{l}$  du tampon EB ont été ajoutés (10 mM tris-Cl, pH 8,5) au centre de la membrane de la colonne. Centrifugation pendant 1 min. Le volume moyen d'éluât était de 48  $\mu\text{l}$ .
- Vérification de la présence de l'ADN dans l'éluât par électrophorèse sur gel d'agarose. Le gel d'agarose contenait 5  $\mu\text{l}$  de l'extrait, 4  $\mu\text{l}$  de l'eau distillée stérile et 1  $\mu\text{l}$  du tampon de charge (load buffer).

#### 4. 3. 4. Ligation avec le plasmide

Le plasmide utilisé pour la ligation était le pGEM T- Easy (figure II.5). Le protocole de ligation était le suivant :

- 1  $\mu\text{l}$  (50-100 ng) du plasmide pGEM T- Easy
  - 1  $\mu\text{l}$  du tampon de ligation x10
  - 1  $\mu\text{l}$  de T4 DNA ligase.
  - 7  $\mu\text{l}$  de l'éluât obtenu de l'étape précédente.
- } Incubation à 4°C  
pendant toute la nuit



**Figure II. 5** : Le plasmide pGEM T- Easy

#### 4. 3. 5. Transformation dans les cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH5a

Avant la transformation il faut préparer les milieux de culture : liquide et solide (Annexe 2). La transformation a été effectuée selon le protocole suivant :

- 8- Une aliquote de cellules d'*Escherichia coli* (qui ont été préparées avec le chlorure de calcium) a été dégelée sur la glace.
- 9- 2 µl de l'ADN de ligation ou l'ADN plasmidique ont été ajoutés et bien mélangé. Le tube a été ensuite mis dans la glace pendant 20 minutes.
- 10- Pour provoquer le choc thermique, le tube a été mis dans le bain-marie pendant 45 secondes à 42°C.
- 11- Le tube a été ensuite transféré dans la glace pendant 2 min.
- 12- 900 µl de milieu liquide ont été ajoutés.
- 13- Incubation à 37°C secouant doucement pendant 1 h environ dans l'agitateur à 100 rpm.
- 14- 200 µl pour une transformation de ligation, et 50 µl pour une transformation avec le plasmide intact ont été mis dans boîtes de Pétri contenant le milieu de culture et les antibiotiques.
- 15- Incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant toute la nuit puis elles sont transférées à 4°C.

#### **4.3.6. Sélection des colonies positives après transformation par PCR**

Le protocole utilisé pour la sélection des colonies positives était le suivant :

- 16- Préparation des tubes Eppendorf 1,5 ml avec 200 µl de milieu de culture + antibiotique pour chaque colonie (généralement 6 colonies ont été choisies pour les tester).
- 17- Inoculation dans chaque tube une seule colonie. Vérification des colonies si elles sont bien séparées les unes des autres.
- 18- Les tubes en agitation ont été ensuite mis à 37°C pendant 4-5 heures à environ 100 rpm.
- 19- Vérification de la croissance bactérienne en ouvrant un tube. Si ça sent mauvais, ceci indique qu'il y a eu une croissance bactérienne.
- 20- Préparation du mélange de la PCR (contenant 1 µl de la culture bactérienne) pour chaque colonie en suivant le protocole PCR (voir sous titre 4.3.1.3 ; page 105), sauf dans ce cas, les amorces sont : M13 F : TGAGCGATAACAATTCACACAG et M13 R : GTTTCCCAGTCACGACGTTG.
- 21- Electrophorèse des produits de PCR sur gel d'agarose afin d'identifier les colonies positives et visualisation du gel aux UV.

#### **4.3.7. Culture en milieu liquide des colonies positives**

La culture des colonies positives en milieu de culture liquide (Annexe 2) a été réalisée selon les étapes suivantes :

- 1- Répartition du milieu liquide contenant les antibiotiques dans des tubes stériles à raison de 3 ml par tube.
- 2- Inoculation de la culture bactérienne dans les tubes. Ces derniers ont été mis en agitation pendant toute une nuit à 200 rpm à 37°C pour permettre aux bactéries de se croître.
- 3- Après une nuit d'agitation et à l'aide d'une pipette, les cultures bactériennes ont été mises dans des tubes Eppendorf pour centrifugation.
- 4- Centrifugation à 8000 rpm pendant 3 min.
- 5- Élimination de tout le surnageant à l'aide d'une pipette.
- 6- Remise en suspension des pellets dans 250 µl du tampon P1 (appartenant au kit Qia prep Spin Miniprep, Promega).

#### **4. 3. 8. Purification de l'ADN plasmidique et séquençage**

La purification de l'ADN plasmidique a été réalisée par le kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Le protocole utilisé était le suivant :

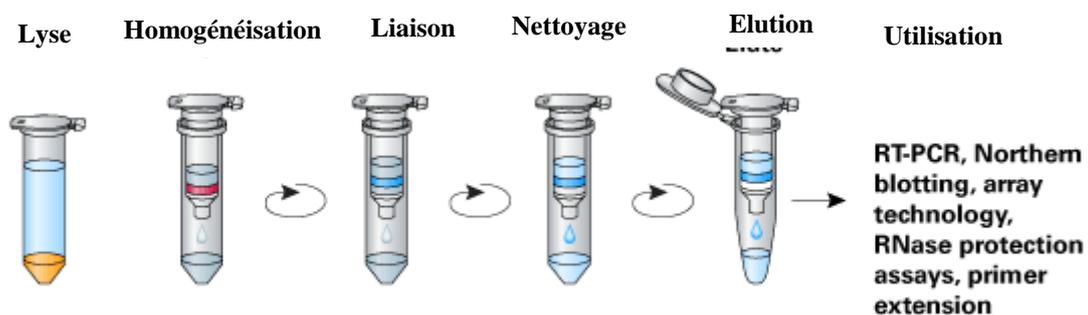
- 1- Les bactéries ont été suspendues dans des tubes à microcentrifugeuse contenant 250 µl de la solution tampon P1.
- 2- 250 µl de la solution tampon P2 ont été ajoutés à chaque tube tout en mélangeant très bien le contenu.
- 3- 250 µl de la solution tampon RT ont été ajoutés immédiatement tout en mélangeant très bien le contenu.
- 4- Les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 13 000 rpm.
- 5- Le surnageant a été transféré dans les colonnes de rotation QIAprep tout en pipétant très bien le contenu. Centrifugation pendant 30-60 secondes. Elimination des débris.
- 6- 0,75 ml de la solution tampon PE ont été ensuite ajoutés. Centrifugation pendant 30 à 60 secondes afin d'assurer le lavage des colonnes.
- 7- Elimination des débris. La colonne QIAprep a été ensuite transférée dans un tube de microcentrifugeuse propre de 1,5 ml. Puis 50 µl de la solution tampon EB (Tris-Cl 10 mM, pH 8,5) ou de l'eau ont été ensuite ajoutés au centre de chaque colonne afin d'éluer l'ADN. Après 1 minute de repos, les tubes ont été centrifugés pendant 1 minute. L'ADN pure a été ensuite récupéré. Une fois l'ADN a été purifié, ce dernier a été envoyé au séquençage afin de déterminer l'enchaînement des désoxyribonucléotides et en conséquence de déterminer si le clone comprend toute la longueur du message. Electrophorèse sur gel d'agarose suivie d'une visualisation aux UV.

#### **4. 4. Étude de l'expression génétique des gènes identifiés**

##### **4. 4. 1. Extraction de l'ARN**

Une fois le clonage et l'identification des gènes d'intérêt liés au stress salin ont été réalisés, une autre extraction de l'ARN a été réalisée sur tous les traitements chez les deux populations d'*Atriplex halimus* et chez l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* et ce au niveau des feuilles et des racines afin d'étudier l'expression génétique de ces gènes d'intérêt. Après six semaines sous stress salin, l'extraction de l'ARN des feuilles et des racines des jeunes plantules des deux populations d'*Atriplex halimus* et *Crithmum maritimum* a été réalisée par RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Ce kit a été utilisé

également pour la purification de l'ARN total. Il est recommandé pour la purification de petites quantités de matériel végétal de départ (100 mg). Il fournit une méthode rapide et simple pour la préparation jusqu'à 100 µg de l'ARN total par échantillon. Le produit résultant de cette purification a été utilisé pour l'étude de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel. Le principe de la purification consiste au broyage des tissus végétaux dans l'azote liquide, ces derniers ont été ensuite lysés dans des conditions hautement dénaturantes par l'utilisation du tampon de lyse. RNeasy Plant Mini Kit fournit des tampons de lyse : Tampon RTL et Tampon RLC, qui contiennent guanidine thiocyanate et guanidine hydrochloride, respectivement. La perturbation cellulaire plus élevée et les propriétés dénaturantes du tampon RLT font souvent de ce dernier le tampon de choix dont il renforce mieux la liaison d'ARN sur la membrane de silice. Après la lyse, les échantillons sont centrifugés. Cette opération permet d'éliminer simultanément les matières insolubles et réduit la viscosité des lysats en perturbant la matière gélatineuse souvent formés dans les lysats végétaux. L'éthanol a été ajouté au lysat clarifié, ce qui crée des conditions qui favorisent la liaison sélective de l'ARN sur la membrane Rneasy. L'échantillon a été ensuite transféré dans la colonne RNeasy Mini. L'ARN total se lie à la membrane, les contaminants sont ainsi efficacement éliminés. L'ARN de haute qualité a été élué dans l' RNase-free water (figure II. 6).



**Figure II. 6** : Principe de l'extraction de l'ARN par RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen).

Le protocole utilisé pour l'extraction des ARN était le suivant :

4. 100 mg de tissus végétaux (feuilles et racines) ont été broyés dans l'azote liquide.
5. 450 µl de tampon ont été ajoutés RTL. Selon la compagnie QIAGEN, La composition exacte du tampon RLT est confidentielle. Ce tampon est un composant exclusif du kit RNeasy.
6. L'extrait a été mélangé par vortex vigoureusement.
7. Transfert du lysat dans une colonne QIAshredder placée dans un tube collecteur de 2 ml. Puis centrifugation pendant 2 min à grande vitesse. Cette centrifugation à travers la colonne QIAshredder permet d'éliminer les débris cellulaires et homogénéiser le lysat simultanément.
8. 0,5 volume d'éthanol (96-100%) a été ajouté au lysat clarifié. Puis un mélange immédiat a été effectué par pipetage (sans centrifugation).
9. Le mélange lysat et éthanol (environ 650 µl) ont été ensuite transférés dans une colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 ml. Centrifugation pendant 15 secondes à 10,000 rpm. L'écoulement a été jeté.
10. Juste après cette étape nous avons procédé au **traitement à la désoxyribonucléase** (ou ADNase) : c'est la digestion de tout matériel d'ADN présent dans le mélange selon les étapes suivante :
  - 22- 350 µl de tampon RW1 ont été ajoutés à la colonne RNeasy. Centrifugation pendant 15 s à  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) pour laver la membrane de la colonne. Puis l'écoulement a été jeté.
  - 23- Un mélange d'ADNase et le tampon a été préparé : 10 µl de l'ADNase et 70 µl de tampon RDD. Centrifugation brève du mélange.
  - 24- Le mélange d'ADNase et RDD (80 µl) a été mis au centre de la membrane de la colonne RNeasy pour une incubation de 15 min à la température ambiante (20-30°C).
  - 25- 350 µl de tampon RW1 ont été ajoutés à la colonne RNeasy. Centrifugation pendant 15 s à  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm). Puis l'écoulement a été jeté.
11. 700 µl de tampon RW1 ont été ajoutés dans la colonne RNeasy. Suivi d'une centrifugation pendant 15 secondes à  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) pour bien nettoyer la membrane de la colonne. L'écoulement a été ensuite jeté.

12. 500 µl de tampon RPE ont été ajoutés à la colonne RNeasy. Centrifugation pendant 15 secondes à  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) pour laver la membrane de la colonne. L'écoulement a été jeté.
13. La colonne RNeasy a été ensuite placée dans un nouveau tube de 1,5 ml. Ensuite 30-50 µl de RNase-free water ont été ajoutés directement au centre de la membrane de la colonne. Puis suivi d'une centrifugation pendant 1 min à  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) pour éluer l'ARN.
14. Mesure de la quantité d'ARN présente dans l'extrait : La concentration de l'ARN (ng/µl) a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260 nm (A260) au spectrophotomètre (Nanodrop).
15. Electrophorèse sur gel d'agarose suivie par visualisation aux UV.

#### 4. 4. 2. Synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) et normalisation

Une fois les ARN ont été extraits, nous avons procédé à la synthèse de l'ADNc de chaque ARN. La synthèse de l'ADNc a été réalisée selon le protocole préalablement cité (voir sous titre 4. 3. 1. 3 page 104). Une fois les ADNc ont été obtenus, nous avons entamé l'étude de l'expression des gènes CMO (Choline monooxygénase) et Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter par **PCR quantitative en temps réel**. La quantification relative de l'expression d'un gène cible est mesurée par rapport à un ou plusieurs gènes de référence (Acton, 2013). Les gènes les plus souvent utilisés comme références sont **des gènes dits « de ménage »** «housekeeping» dont l'expression doit être constante. Le gène de référence utilisé dans notre cas était le Mt18S ARNr représenté par les amorces suivantes : Mt 18S-F (TGACGGAGAATTAGGGTTCG) et Mt 18S-R (CCTCCAATGGATCCTCGTTA). Les amorces du gène de référence (ou amorces du contrôle interne) ont été incluses lors de la **PCR quantitative en temps réel** afin de permettre **la normalisation des échantillons**. La normalisation consiste à maintenir tous les ADNc utilisés pour la PCR en temps réel à la même concentration et ce par le biais des gènes de références. Une fois tous les échantillons ont été normalisés, nous avons procédé à l'étude de l'expression génique des deux gènes étudiés CMO et Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter par PCR en temps réel. Les amorces du gène de ménage et les amorces du gène cible sont alors combinées lors des réactions de la qRT-PCR.

#### 4. 4. 3. PCR quantitative en temps réel

Après la synthèse de l'ADNc de chaque échantillon (feuilles et racines) et après la normalisation, la PCR quantitative en temps réel a été ainsi réalisée avec les amorces

spécifiques déjà conceptionnées pour chaque gènes étudiés (CMO et Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter).

Pour cela un melange de PCR a été préparé :

26- 5 µl de l'ADNc ont prélevés.

27- 10 µl de l'ABSolute QPCR SYBR Green ont été ajoutés.

28- 1 µl amorce directe spécifique du gène d'intérêt a été ajouté.

29- 1 µl amorce inverse du gène d'intérêt a été ajouté.

30- 3 µl d'eau distillée stérile ont été ajoutés.

31- Légère centrifugation.

Après la préparation du mélange, la machine de PCR a été mise en marche. Le Programme de PCR en temps réel utilisé était le suivant :

32- Incubation à 95°C pendant 15 minutes (activation de l'enzyme).

33- Incubation à 95°C pendant 15 secondes (dénaturation).

34- Incubation à 60°C pendant 30 secondes (chauffage).

35- Incubation à 72°C pendant 30 secondes (étape de fusion).

36- Notant que le nombre total de cycle de cette PCR était de 40 cycles.

#### 4. 4. 4. Calcul de l'expression relative

Les données issues de cette quantification ont été exprimées en un rapport du produit du gène cible au produit du gène de ménage (Murphy, 2011). C'est grâce aux **valeurs de Ct** (cycle threshold) que les niveaux de transcription des gènes peuvent être comparés entre les échantillons testés (Weissensteiner et *al.*, 2003). La formule utilisée pour calculer l'expression relative des gènes était la suivante (Livak et Schmittgen, 2001) :

$$\text{Expression relative} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ Cible} - Ct \text{ Référence}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ témoin}$$

#### 5. Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide des logiciels StatBox6 et R (R version 2.15.3, R Foundation for Statistical Computing). Un test ANOVA à un, deux et 3 facteurs étudiés a été effectué selon les paramètres étudiés. Lorsque des interactions significatives (P <0,05) ou des effets significatifs ont été enregistrés, les comparaisons ont été alors faites en utilisant le test de Newman-Keuls et le test de Tukey.

## CHAPITRE III

### RESULTATS ET DISCUSSION

Les concentrations élevées en sel dans la rhizosphère provoquent un stress, du fait du déficit en eau et de la toxicité des ions. L'exclusion du sel et l'ajustement osmotique sont deux mécanismes essentiels dans la tolérance des plantes à des environnements très salés (Shakespeare, 2003).

Les différentes analyses réalisées au niveau des feuilles et des racines des plantules des deux espèces halophytes étudiées (*Atriplex halimus* et *Crithmum maritimum*) ont révélés des modifications d'ordre physiologiques, biochimiques et moléculaires.

#### **1. Résultats et Discussion de l'espèce *Atriplex halimus***

##### **1. 1. Résultats**

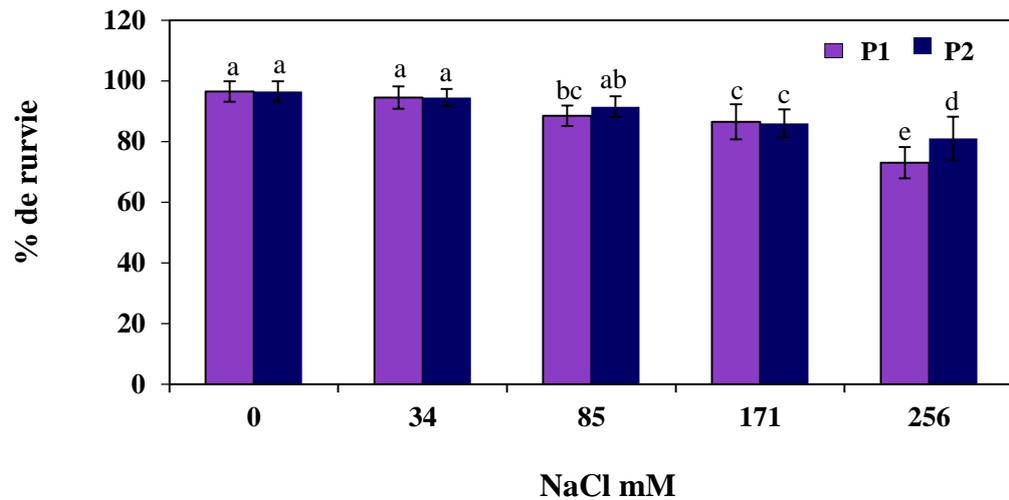
##### **1. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques physiologiques**

L'application des différentes concentrations en NaCl sur les plantules des deux populations d'*Atriplex halimus* a entraîné des changements physiologiques chez ces dernières.

##### **1. 1. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de survie**

Après 6 semaines sous des conditions salines, les résultats obtenus montrent qu'il y a une diminution du taux de survie (%) à des concentrations élevées en NaCl chez les deux populations d'*Atriplex halimus* par rapport au témoin. A 171 mM de NaCl, le taux de survie est de  $86,5 \pm 5,798$  % chez la population P1 et  $86 \pm 4,595$  % chez la population P2. A 256 mM de NaCl, la population P2 révèle un % de survie plus élevé ( $81 \pm 7,149$  %) que la population P1 ( $73 \pm 5,164$  %) (figure III. 1).

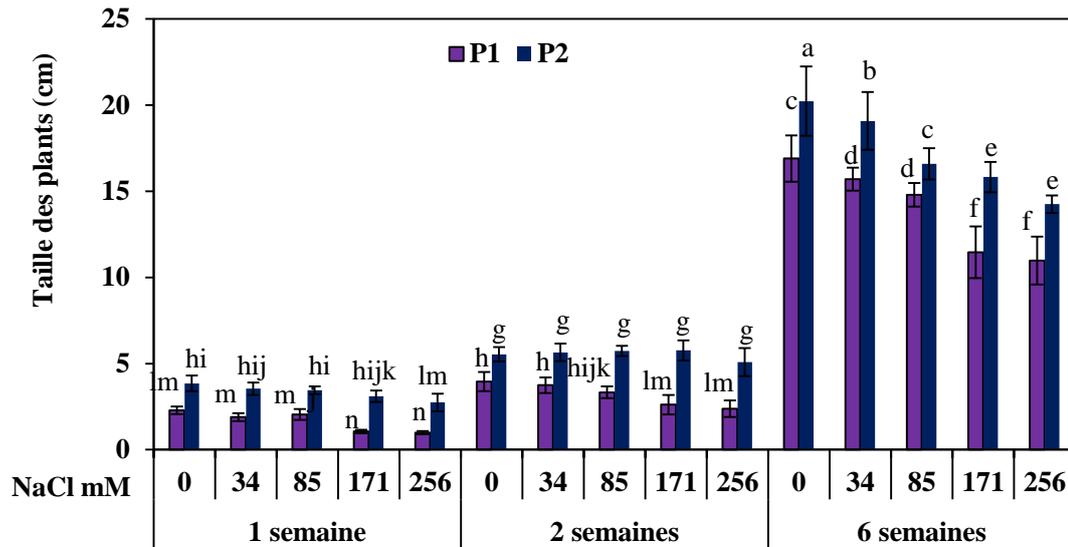
L'analyse de la variance montre qu'il y a une action significative du facteur sel sur le % de survie des deux populations (Annexe 3).



**Figure III. 1 :** Taux de survie chez les deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus* après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 10$ ).

### 1. 1. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la hauteur des plants

Les résultats obtenus montrent qu'il y a un effet très hautement significatif du NaCl sur la taille des plants (Annexe 4). A travers le temps et les différentes concentrations en NaCl, la population du littoral (P2) est caractérisée par une taille plus élevée que la population de la steppe (P1) (figure III. 2). Après 6 semaines sous l'effet du stress salin, nous constatons que la taille des plants stressés présente une certaine diminution chez les deux populations comparées au témoin. En effet la taille des jeunes plantules non stressées est de  $16,9 \pm 1,34$  cm chez la population P1 et de  $20,225 \pm 2,012$  cm chez la population P2. Chez les plants soumis à la concentration en NaCl de 256 mM, la taille est de  $10,975 \pm 1,391$  cm chez la population P1 et  $14,249 \pm 0,515$  cm chez la population P2.

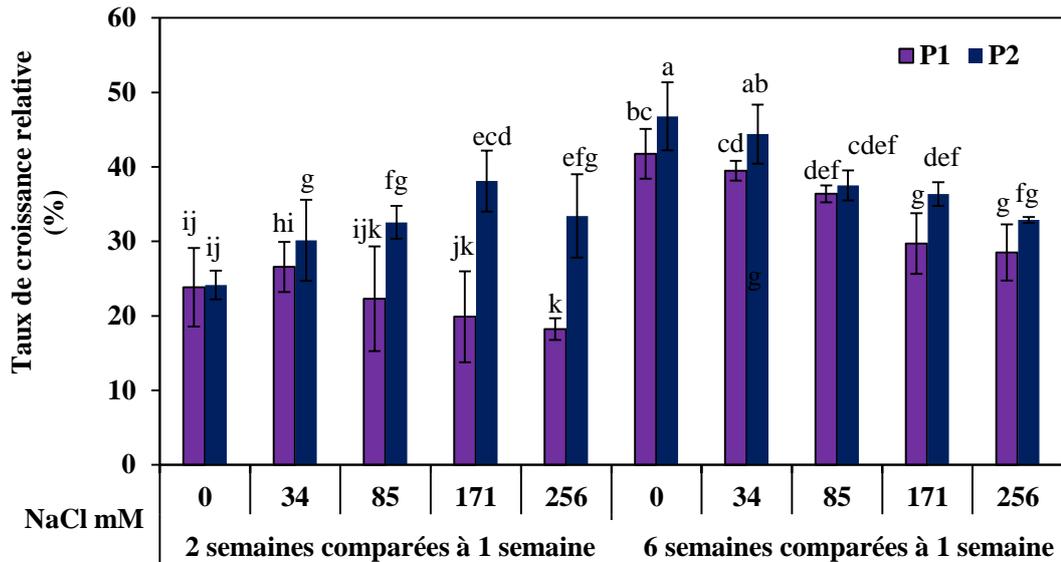


**Figure III. 2 :** Hauteur des plants des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 10$ ).

### 1. 1. 1. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de croissance relative

D'après la figure III. 3, nous constatons que le taux de croissance relative (RGR) des jeunes plantules varie à travers les différentes concentrations en NaCl et à travers le temps. A la concentration en NaCl 171 mM, le pourcentage de RGR (2 semaines comparées à une semaine) des plantules stressées de la population du littorale (P2) est plus élevé ( $38,107 \pm 4,087$  %) par rapport à la population de la steppe (P1) ( $19,89 \pm 6,114$  %) et par rapport aux témoins. Après 6 semaines sous les conditions salines, le taux de croissance relative (6 semaines comparées à 1 semaine) des deux populations diminue avec l'augmentation des concentrations en NaCl.

L'analyse de la variance facteur stress salin révèle une action très hautement significative sur le taux de croissance relative (Annexe 5).



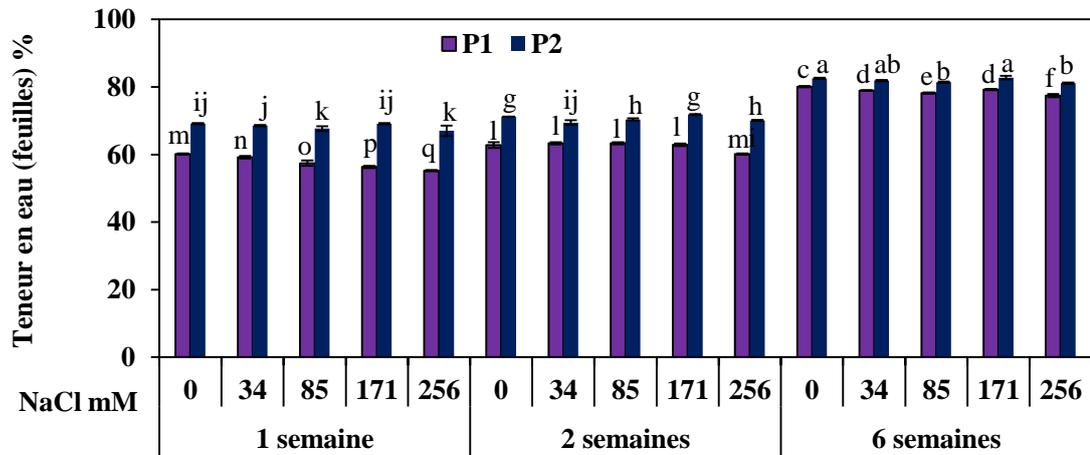
**Figure III. 3 :** Taux de croissance relative de jeunes plantules des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus* après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 10$ ).

#### 1. 1. 1. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en eau

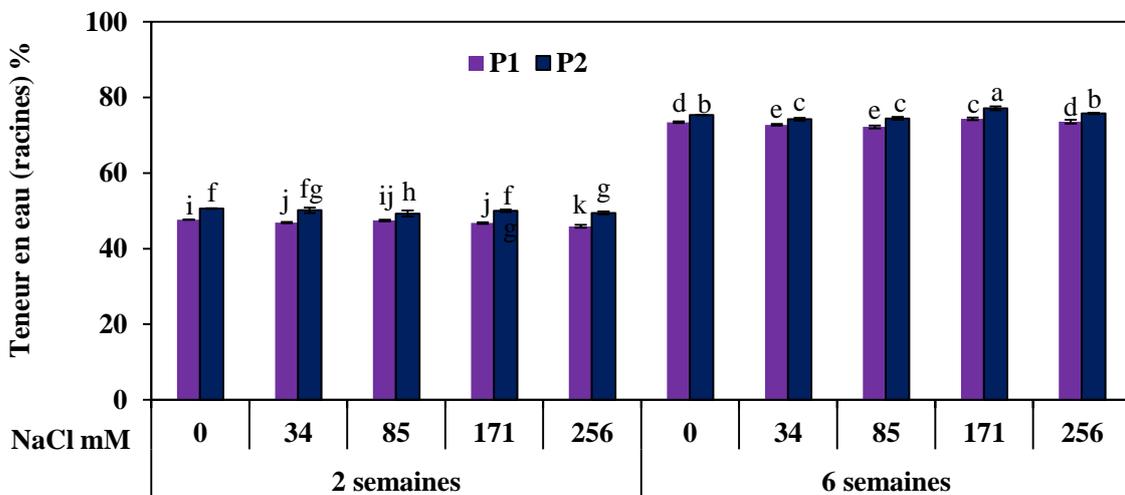
A partir des résultats obtenus, et par rapport au témoin, nous constatons une légère diminution de la teneur en eau au niveau des feuilles chez les plantules des deux populations lorsque ces dernières subissent une forte concentration en NaCl (256 mM) et ce après une semaine, deux semaines et six semaines sous traitement salin. Par contre à la concentration 171 mM NaCl et à travers le temps, les plantules de la population du littoral (P2) accumulent plus d'eau que les plantules non stressées et les plantules de la population steppique (P1) mais d'une manière non significative (figure III. 4). De même pour les racines, une légère diminution de la teneur en eau est enregistrée chez les plantules stressées provenant des deux populations par rapport aux témoins. Notant ainsi qu'à la concentration en NaCl 171 mM et après six semaines du stress salin, chez les plantules de la population de littoral (P2), cette teneur est plus élevée ( $83,22 \pm 0,191$  %) par rapport aux plantules non stressées ( $82,55 \pm 0,19$  %) et les plantules stressées de la population steppique (P1) (figure III. 5).

L'analyse de la variance met en évidence une action hautement significative du traitement salin sur la teneur en eau au niveau des feuilles des deux populations (Annexe

6). Au niveau des racines, l'application du NaCl révèle une action hautement significative sur la teneur en eau chez les plantules des deux populations (Annexe 7).



**Figure III. 4 :** Teneur en eau (%) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

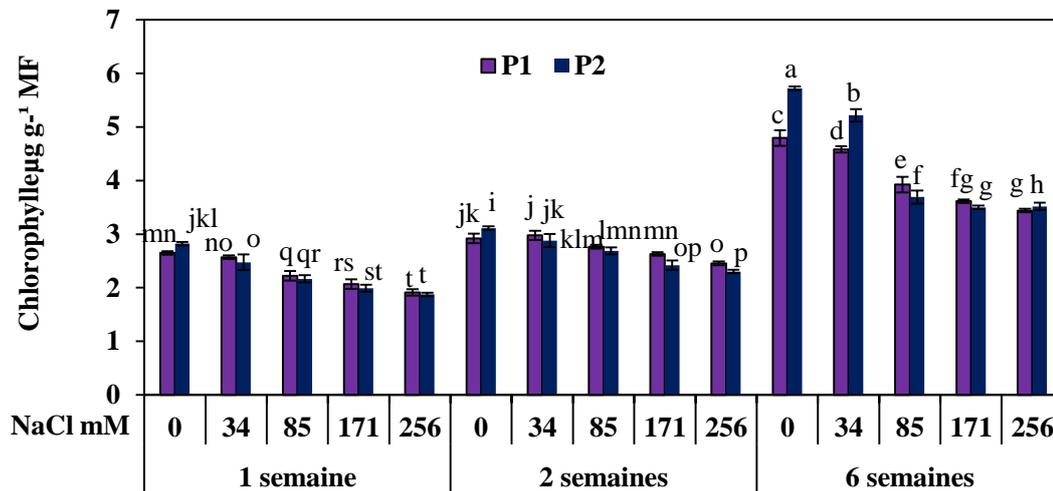


**Figure III. 5 :** Teneur en eau (%) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

### 1. 1. 1. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de chlorophylle

Après une semaine, deux semaines et six semaines sous des conditions salines, le taux de chlorophylle semble diminuer chez les plantules stressées des deux populations comparées aux témoins (figure III. 6). Après six semaines, le taux de chlorophylle chez les plantules non stressées de la population steppique (P1) est de  $4,795 \pm 0,146$ . Chez les plantules stressées à 256 mM NaCl, ce taux est de  $3,441 \pm 0,033 \mu\text{g g}^{-1}$  FW. Chez le témoin de la population du littoral (P2), le taux de chlorophylle est de  $5,723 \pm 0,033 \mu\text{g g}^{-1}$  FW. Par contre chez les plantules stressées à 256 mM NaCl, ce taux est de  $3,519 \pm 0,067 \mu\text{g g}^{-1}$  FW.

Une action très hautement significative du facteur sel sur le taux de chlorophylle au cours de la première, deuxième et sixième semaine du stress salin est enregistrée chez les deux populations suite à l'analyse de la variance (Annexe 8).



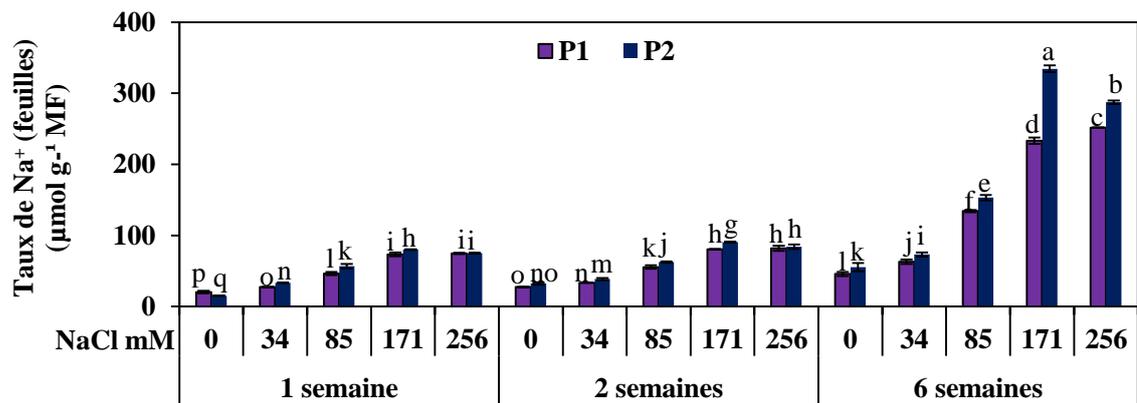
**Figure III. 6 :** Taux de chlorophylle des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

### 1. 1. 1. 6. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de Na<sup>+</sup>

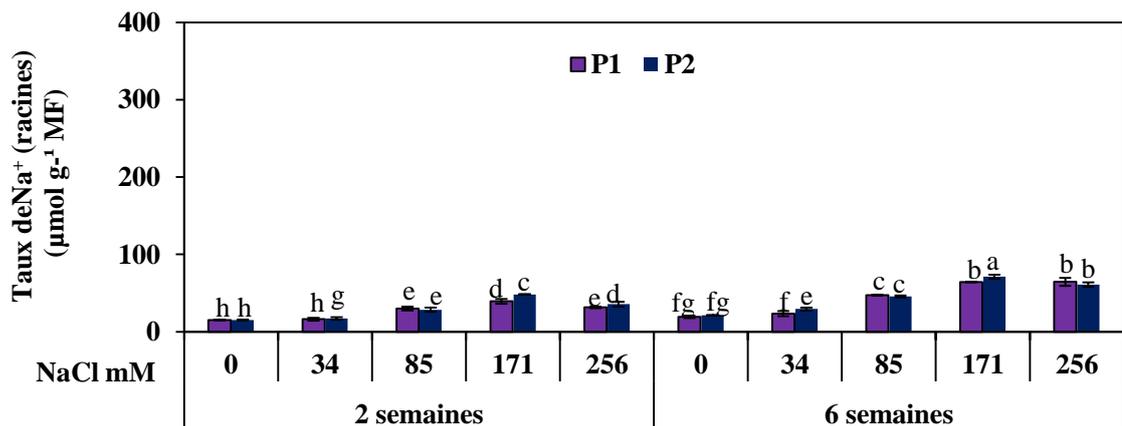
A l'issue des essais, les résultats obtenus montrent que l'accumulation du sodium au niveau des feuilles et des racines augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl dans la solution nutritive et avec l'âge des plantules (figure III. 7). Cette accumulation est plus importante chez la population du littoral que la population de la steppe avec un maximum obtenu au niveau des feuilles à 171 mM NaCl ( $79,904 \pm 0,529$

$\mu\text{mol g}^{-1}$  MF durant la première semaine du stress salin,  $90,558 \pm 0,6 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF au bout de la deuxième semaine et  $334,319 \pm 4,768 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF après six semaines du traitement salin). De même pour les racines, ce maximum est obtenu à 171 mM NaCl chez la population du littoral ( $48,314 \pm 0,093 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF après deux semaines sous l'effet du sel et  $71,172 \pm 2,736 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF après six semaines) (figure III. 8).

Ces données sont confirmées par l'analyse de la variance, qui révèle un effet très hautement significatif du traitement salin sur l'accumulation du  $\text{Na}^+$  au niveau des feuilles (Annexe 9) et une action significative sur les des racines (Annexe 10).



**Figure III. 7 :** Taux de  $\text{Na}^+$  des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).



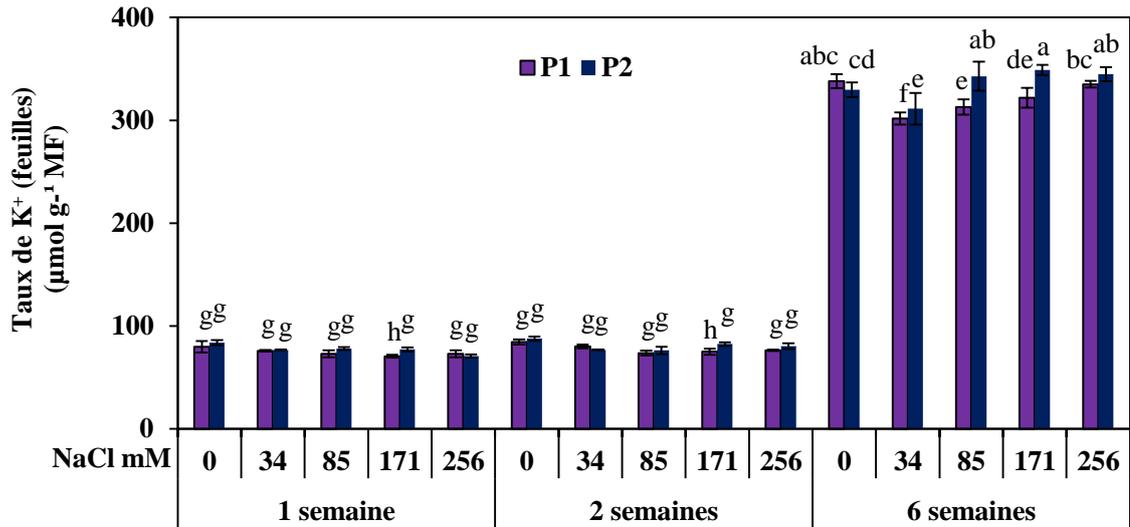
**Figure III. 8 :** Taux de  $\text{Na}^+$  des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

### 1. 1. 1. 7. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de K<sup>+</sup>

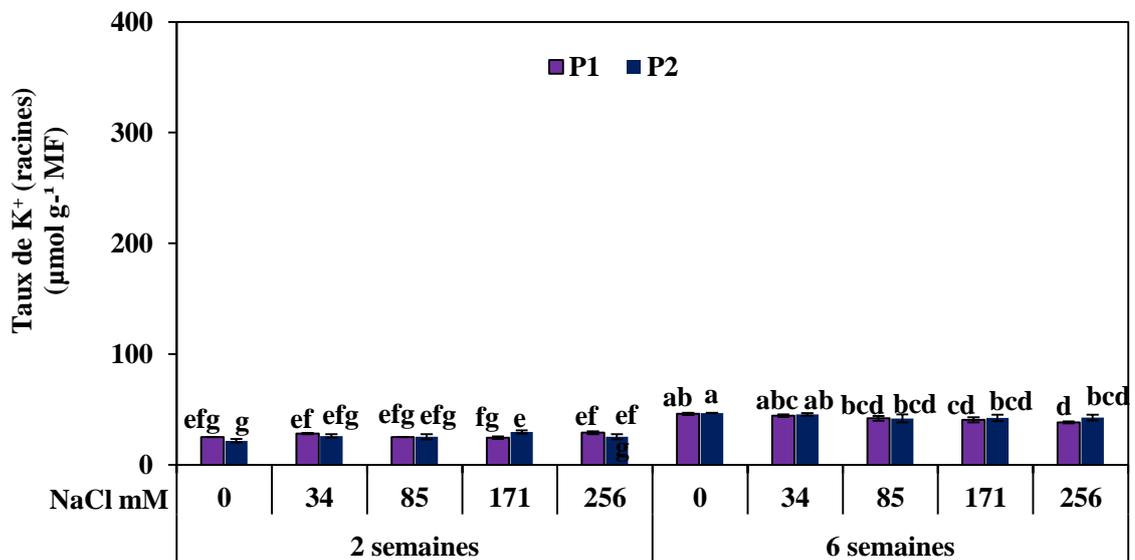
Après une semaine sous l'effet du stress salin, les deux populations ont continué de croître tout en accumulant le K<sup>+</sup> au niveau des feuilles et des racines. Durant les premières semaines du stress salin, l'accumulation de K<sup>+</sup> au niveau des feuilles des plantules stressées est moins importante par rapport aux témoins (figure III. 9). Mais au bout de la sixième semaine, les plantules de la population du littoral (P2) stressées à 171 mM et 256 mM NaCl accumulent des quantités plus ou moins importantes au niveau des feuilles par rapport aux témoins et par rapport à la population steppique (P1). Chez le témoin de la population steppique (P1) le taux de K<sup>+</sup> enregistré est de  $338,092 \pm 6,772 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ . Les plantules stressées de cette population à 171 mM et 256 mM NaCl accumulent un taux de K<sup>+</sup> de  $321,862 \pm 9,587 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  et  $344,823 \pm 6,814 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement. La valeur enregistrée chez les plantules non stressées de la population 2 (P2) est de  $329,815 \pm 7,173 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ . Chez les plantules soumises aux fortes concentrations en NaCl (171 mM et 256 mM) de cette population, le taux de K<sup>+</sup> est de  $348,848 \pm 4,907 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  et  $344,823 \pm 6,814 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement (figure III. 9).

Au niveau des racines, l'accumulation de K<sup>+</sup> chez les plantules des deux populations est plus ou moins stable après deux et six semaines sous l'effet du sel (figure III. 10). À la forte concentration en NaCl (256 mM) et après deux semaines du stress salin, les racines des plantules de la population du littoral accumulent plus de K<sup>+</sup> ( $25,458 \pm 2,308 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ), comparées au témoin ( $21,688 \pm 1,576 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ). Après six semaines sous le traitement salin, le taux de K<sup>+</sup> diminue avec les fortes concentrations en NaCl. En effet, chez le témoin des deux populations P1 (steppe) et P2 (littoral), ce taux est de  $46,068 \pm 1,036 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  et de  $46,822 \pm 0,157 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement. Aux concentrations élevées en NaCl (171 mM et 256 mM), la teneur en K<sup>+</sup> au niveau des racines des plantules de la population (P1) est de  $40,644 \pm 2,235 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  et de  $38,417 \pm 0,929 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement. Chez la population (P2), cette teneur était de  $42,298 \pm 2,893 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  et de  $42,611 \pm 2,525 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement (figure III. 10).

L'analyse de la variance met en évidence une action hautement significative du traitement salin sur le taux de K<sup>+</sup> au niveau des feuilles (Annexe 11) et un effet hautement significatif au niveau des racines (Annexe 12).



**Figure III. 9 :** Taux de K<sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* (P < 0,05) (n =3).

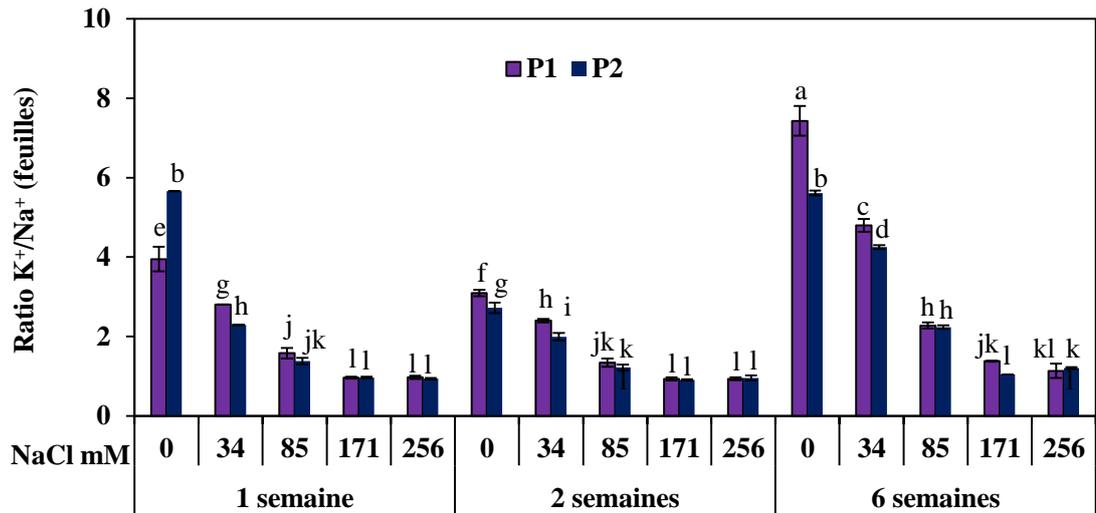


**Figure III. 10 :** Taux de K<sup>+</sup> des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* (P < 0,05) (n =3).

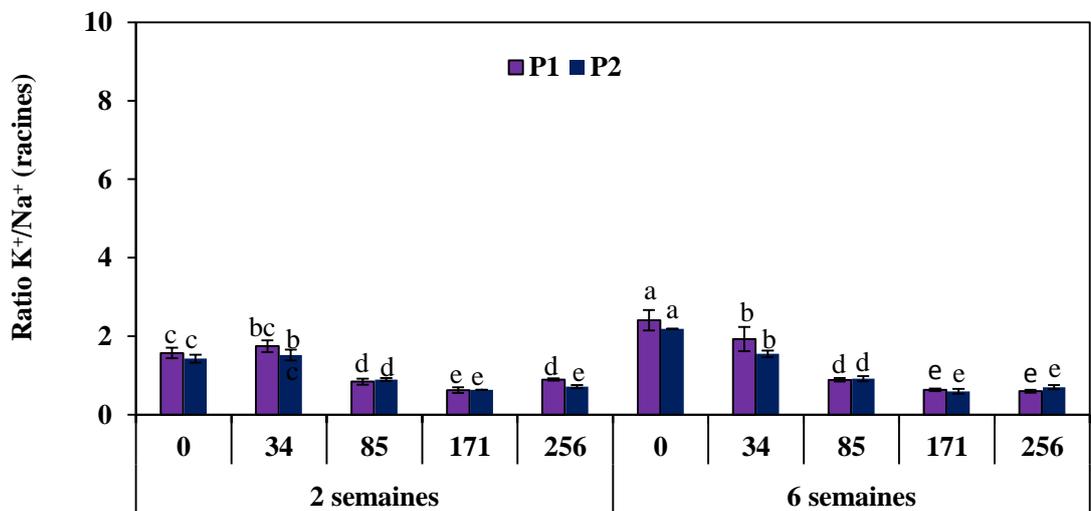
### 1. 1. 1. 8. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le ratio $K^+/Na^+$

A travers le temps et les différentes concentrations en NaCl, le ratio  $K^+/Na^+$  diminue chez les plantules stressées des deux populations, comparés aux témoins au niveau des feuilles et des racines. Mais il faut signaler qu'au niveau des feuilles ce rapport reste  $> 1$  à travers toutes les concentrations en NaCl et à travers le temps (figure III. 11). Au niveau des feuilles et après une semaine sous traitement salin, ce rapport est de  $3,951 \pm 0,31$  chez le témoin de la population steppique (P1) et de  $0,976 \pm 0,041$  à 256 mM NaCl. Le témoin de la population du littoral, le ratio  $K^+/Na^+$  enregistré est de  $5,658 \pm 0,00$ . En revanche chez les plantules stressées à 256 mM NaCl ce ratio est de  $0,94 \pm 0,02$ . Après deux semaines de stress salin, les résultats obtenus révèlent les valeurs suivantes :  $3,095 \pm 0,084$  chez le témoin de la population steppique (P1) et  $0,935 \pm 0,035$  chez les plantules stressées à 256 mM NaCl. Chez le témoin de la population du littoral (P2), le rapport est de  $2,724 \pm 0,134$  et de  $0,958 \pm 0,063$  chez les plantules stressées à 256 mM NaCl. Au bout de six semaines sous des conditions salines, le ratio  $K^+/Na^+$  enregistré chez le témoin de la population steppique est de  $7,432 \pm 0,376$  comparé aux plantes stressées à 256 mM NaCl où il est plus faible ( $1,137 \pm 0,182$ ). Chez la population du littoral, ce ratio est également plus faible au niveau des feuilles des plantules stressées à 256 mM NaCl ( $1,207 \pm 0,023$ ) comparé au témoin ( $5,615 \pm 0,058$ ) (figure III. 11).

Au niveau des racines après deux semaines et six semaines de stress salin (figure III. 12), le ratio  $K^+/Na^+$  diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl chez les deux populations. Les valeurs enregistrées après deux semaines sous l'effet du sel (à 256 mM NaCl) sont comme suit : plus faible ratio chez les plantules stressées de la population steppique (P1) ( $0,894 \pm 0,028$ ) par rapport au témoin ( $1,57 \pm 0,135$ ). De même pour les plantules stressées de la population (P2), ce rapport est plus faible ( $0,712 \pm 0,039$ ) comparé au témoin ( $1,426 \pm 0,104$ ). Après six semaines du stress salin, et chez la population (P1), ce ratio est plus faible à 256 mM NaCl ( $0,597 \pm 0,038$ ) comparé au témoin ( $2,405 \pm 0,259$ ). Même constat chez la population (P2), ce rapport est plus faible ( $0,699 \pm 0,053$ ) au niveau des racines des plantules stressées par rapport au témoin ( $2,19 \pm 0,00$ ). L'analyse de la variance du facteur sel révèle une action très hautement significative sur le ratio  $K^+/Na^+$  au niveau des feuilles (Annexe 13). Par contre au niveau des racines le traitement salin n'a pas d'effet significatif sur ce rapport (Annexe 14).



**Figure III. 11 :** Ratio  $K^+/Na^+$  des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).



**Figure III. 12 :** Ratio  $K^+/Na^+$  des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

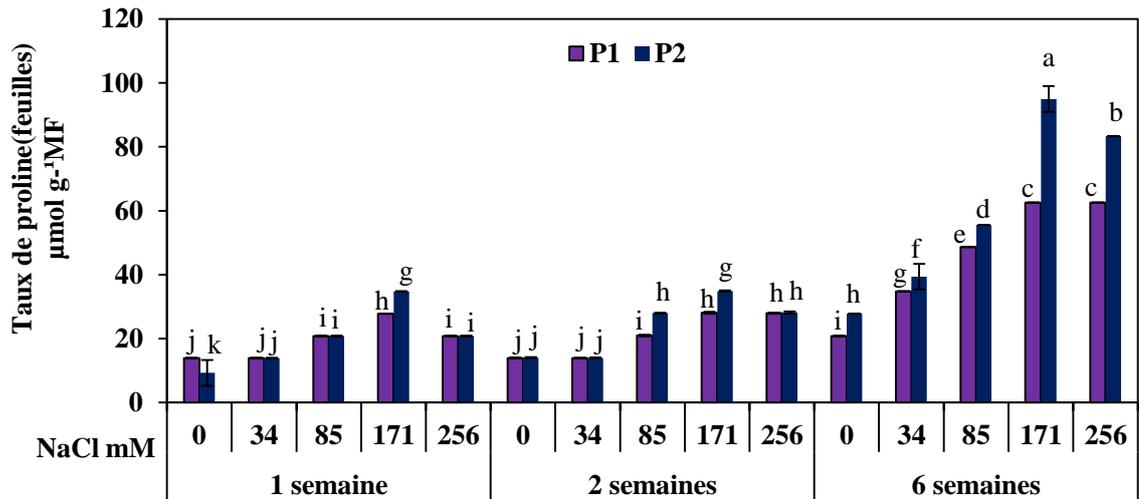
## **1. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques biochimiques**

Les deux populations d'*Atriplex halimus* soumises à des concentrations croissantes en NaCl ont manifesté des modifications d'ordre biochimique (par l'accumulation de la proline, la glycine bêtaïne, l'acide ascorbique et une stimulation de l'activité enzymatique de la catalase).

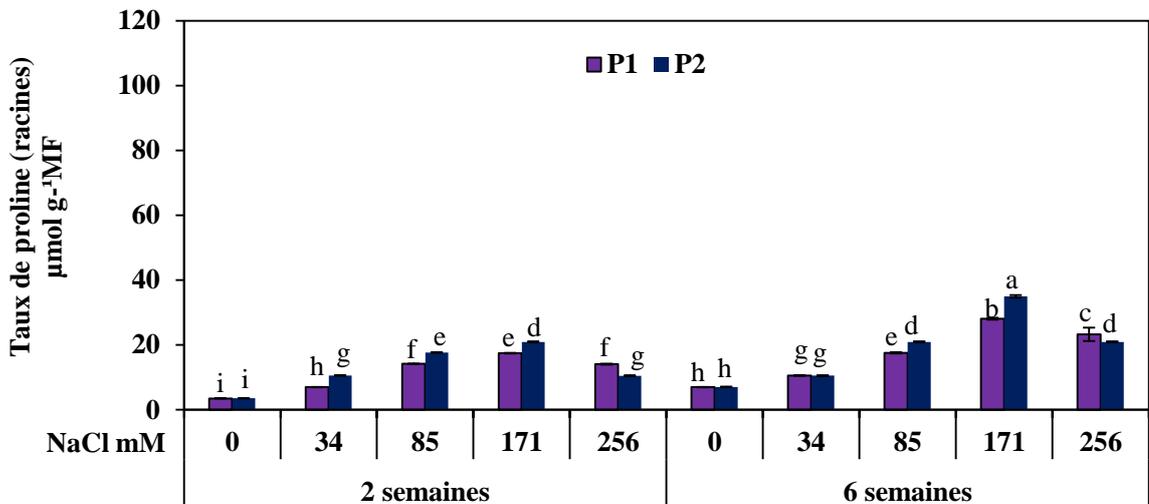
### **1. 1. 2. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de la proline**

L'accumulation de la proline augmente avec les concentrations en NaCl pour atteindre son maximum à 171 mM puis diminue à la forte concentration en NaCl (256 mM) au niveau des feuilles et des racines chez les deux populations à travers le temps. Au niveau des feuilles, la population du littoral (P2) accumule plus de proline que la population steppique (P1) à travers le temps et les différents traitements salins (figure III. 13). A 171 mM et après une semaine sous les conditions salines, le taux de la proline accumulé est de  $27,795 \pm 0.00 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF chez la population P1 et de  $34,743 \pm 0.00 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF chez la population P2. Après deux semaines du traitement salin, le taux enregistré est de  $28,077 \pm 0,284 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF chez la population steppique (P1) et de  $34,86 \pm 0,203 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF chez la population du littoral (P2). Le taux de la proline accumulé après six semaines à 171 mM NaCl chez la population P1 est de  $62,538 \pm 0.00 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF. Chez la population P2, ce taux est de  $94,965 \pm 4,012 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF. Au niveau des racines (figure III. 14) et après deux semaines sous l'effet du sel, le taux de la proline accumulé à 171 Mm NaCl chez la population P1 est de  $17,43 \pm 0,101 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF. Par contre ce taux est plus élevé chez la population P2 ( $20,916 \pm 0,122 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF). Le même constat est enregistré après six semaines du traitement salin, dont la population de littoral (P2) accumule plus de cet amino-acide ( $34,98 \pm 0,409 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF) que la population steppique (P1) ( $28,077 \pm 0,284 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF).

D'après le tableau de l'analyse de la variance au niveau des feuilles et des racines (Annexe 15 et 16 respectivement), on constate qu'il y a un effet très hautement significatif du traitement salin sur le taux de la proline chez les deux populations.



**Figure III. 13 :** Taux de proline des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

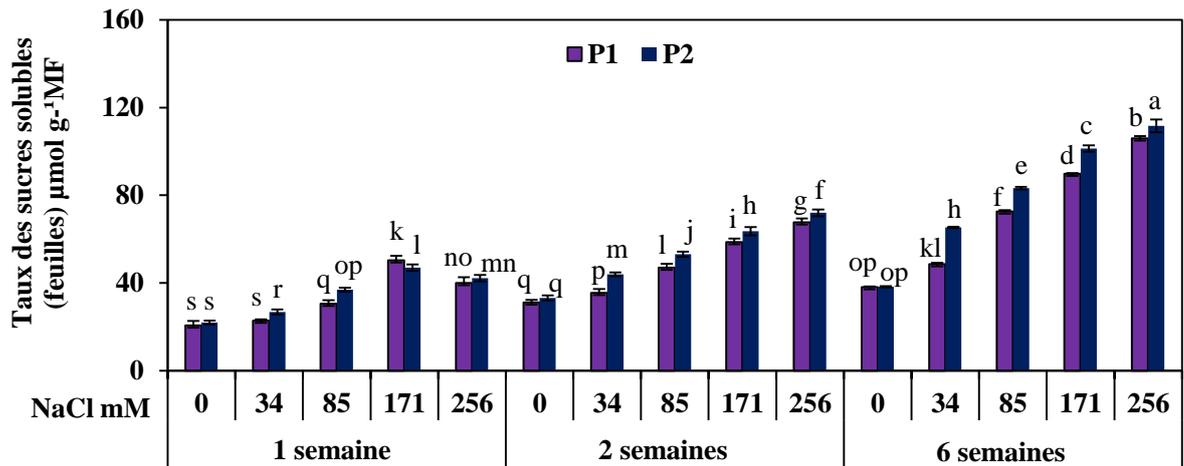


**Figure III. 14 :** Taux de proline des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

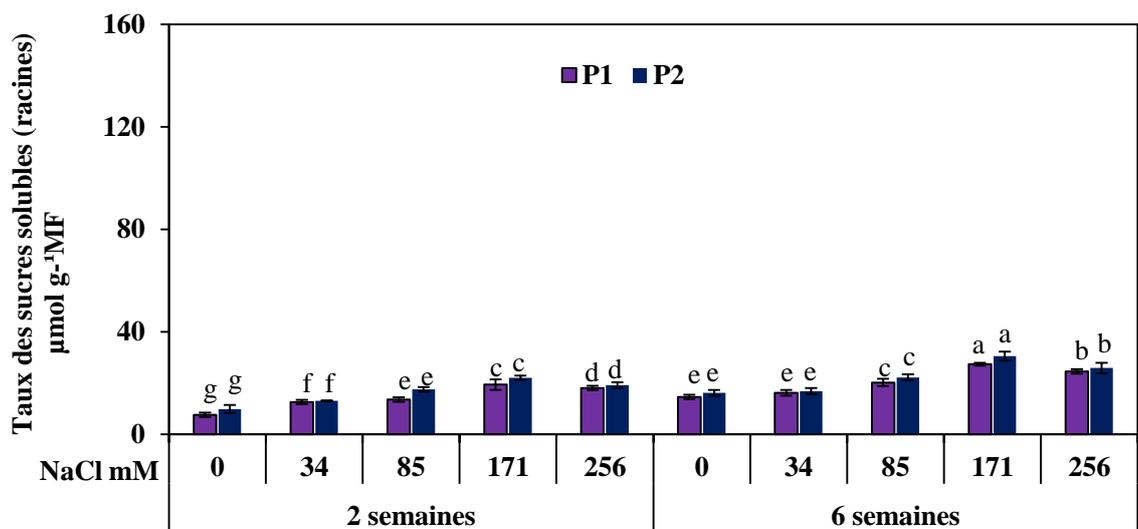
### 1. 1. 2. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux des sucres solubles

A l'issue des analyses sur le taux des sucres solubles au niveau des feuilles et des racines des plantules des deux populations étudiées, les résultats obtenus montrent que ce taux augmente avec l'élévation des concentrations en NaCl dans la solution nutritive. Au niveau des feuilles (figure III. 15), après une semaine sous traitement salin, les deux populations accumulent plus de sucres solubles à 171 mM NaCl. Au bout de la deuxième et la sixième semaine, ce taux est proportionnel aux concentrations de NaCl chez les deux populations. Les plantules de la population du littoral (P2) accumulent plus de sucres solubles que les plantules de la population steppique (P1), comparé au témoin ( $31,167 \pm 1,155 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ), le taux des sucres solubles accumulé à 256 mM NaCl chez la population steppique après deux semaines sous l'effet du sel est le suivant  $67,667 \pm 1,756 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ . Après six semaines, ce taux est plus élevé chez les plantules soumises à la concentration saline 256 mM ( $106 \pm 1,00 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) par rapport au témoin ( $38,167 \pm 0,289 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ). La même révélation est constatée chez la population de littoral où le taux des sucres solubles est plus élevé à 256 mM NaCl par rapport au témoin ( $33,167 \pm 1,155 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) au bout de la deuxième et la sixième semaine. Les quantités accumulées à cette concentration après deux semaines de stress sont :  $72 \pm 1,5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ . Après six semaines, le taux enregistré à 256 mM NaCl est de  $111,667 \pm 2,887 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  et chez le témoin il est de  $38,333 \pm 0,289 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ). Au niveau des racines, le maximum d'accumulation de ces sucres solubles est atteint à 171 mM NaCl et ce après deux et six semaines sous l'effet du stress ( $30,5 \pm 1,732$  ;  $27,333 \pm 0,577 \mu\text{mol g}^{-1} \text{M}$  respectivement).

Suite à l'analyse de la variance, le taux des sucres solubles semble affecté par la présence du sel d'une manière très hautement significative au niveau des feuilles (Annexe 17). Au niveau des racines (Annexe 18) le stress salin n'a pas d'effet significatif sur le taux des sucres solubles.



**Figure III. 15 :** Taux des sucres solubles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).



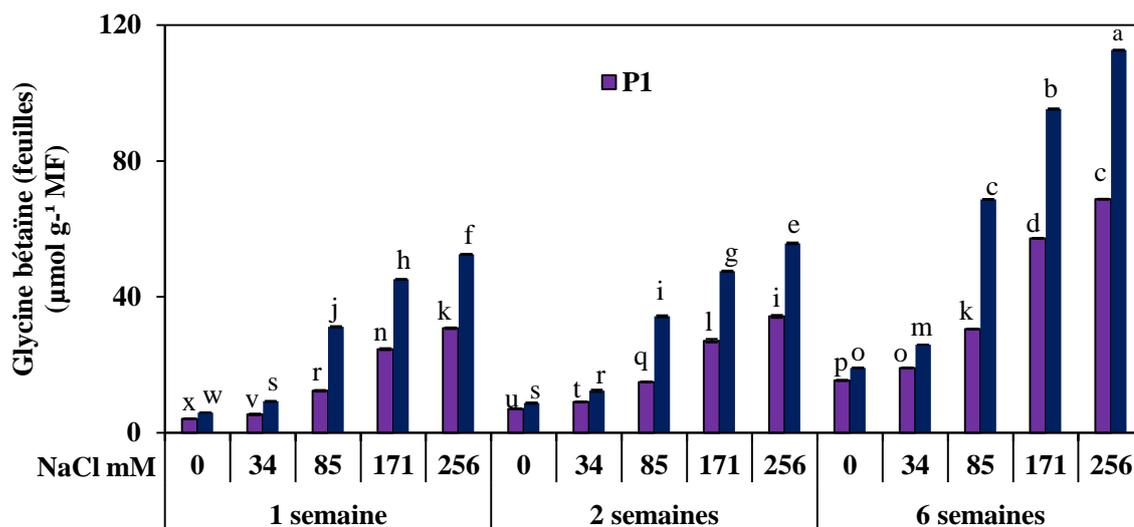
**Figure III. 16 :** Taux des sucres solubles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines, après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

### 1. 1. 2. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en glycine bêtaïne

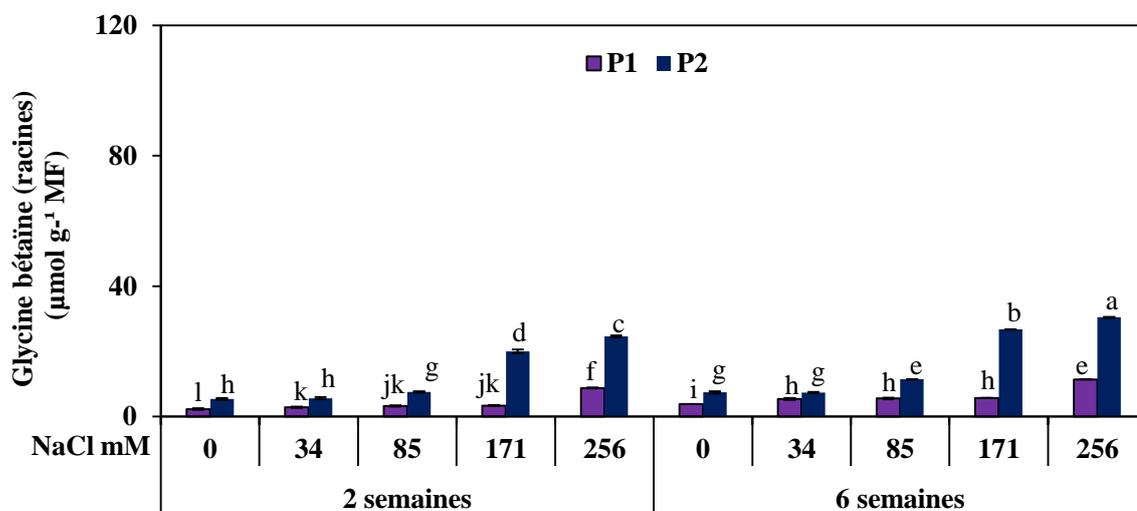
D'après les résultats obtenus, une relation proportionnelle à travers le temps est enregistrée entre le taux de la glycine bêtaïne au niveau des feuilles et des racines et l'augmentation des concentrations en NaCl. La population du littoral (P2) accumule plus de glycine bêtaïne que la population steppique (P1) à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl, et ce au niveau des feuilles et des racines. Au niveau des feuilles (figure III. 17), les taux enregistrés à 256 mM après une semaine du traitement salin chez la population P1 et P2 sont respectivement les suivants :  $30,794 \pm 0,24 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $52,53 \pm 0,12 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF. Après deux semaines sous les concentrations salines 171 mM et 256 mM, la population P2 accumule plus de sucres solubles ( $47,503 \pm 0,197 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $55,763 \pm 0,196 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement) que la population P1 ( $27,083 \pm 0,513 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $34,247 \pm 0,391 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement). Le taux de la glycine bêtaïne enregistré aux mêmes concentrations en NaCl précitées après six semaines du stress salin est de  $57,249 \pm 0,01 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $68,763 \pm 0,163 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement chez la population steppique (P1). Par contre ce taux est plus élevé chez la population du littoral (P2) ( $95,303 \pm 0,176 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $112,668 \pm 0,149 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement).

Au niveau des racines, l'accumulation de la glycine bêtaïne à travers le temps et à 171 mM et 256 mM NaCl est nettement plus élevées chez la population du littoral (P2) que la population steppique (P1) (figure III. 18). Après deux semaines de stress salin, les taux enregistrés aux concentrations précitées sont les suivants :  $3,363 \pm 0,147 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $8,777 \pm 0,191 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement chez la population P1 et  $20,017 \pm 0,535 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $24,567 \pm 0,284 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement chez la population P2. Aux mêmes concentrations précitées, la population du littoral (P2) présente, un taux plus élevé en glycine bêtaïne ( $26,72 \pm 0,017 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $30,457 \pm 0,128 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement) que la population steppique (P1) ( $5,707 \pm 0,012 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF et  $11,413 \pm 0,023 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement).

Ces résultats sont confirmés par l'analyse de la variance dont elle révèle une action très hautement significative du facteur sel sur le taux de la glycine bêtaïne au niveau des feuilles et des racines (Annexe 19 et 20 respectivement).



**Figure III. 17 :** Taux de la glycine bétaine des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

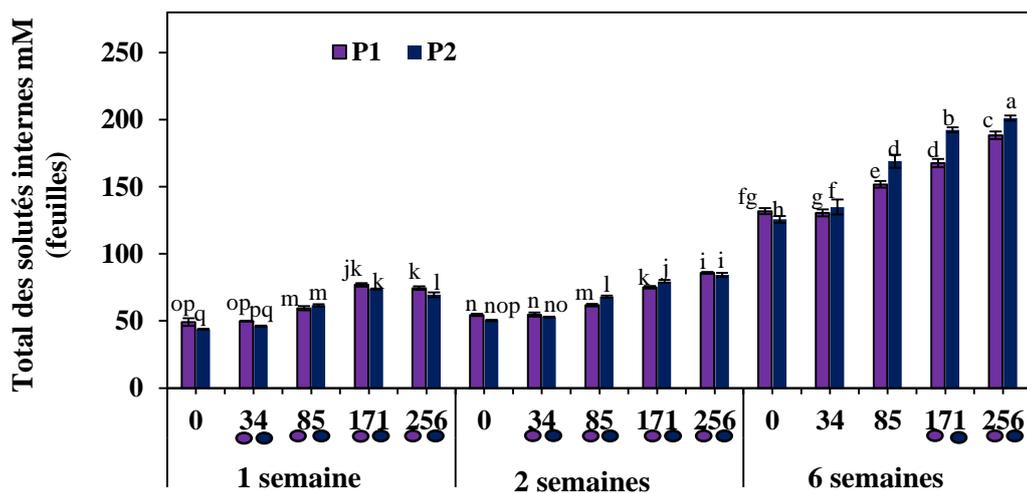


**Figure III. 18 :** Taux de la glycine bétaine des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

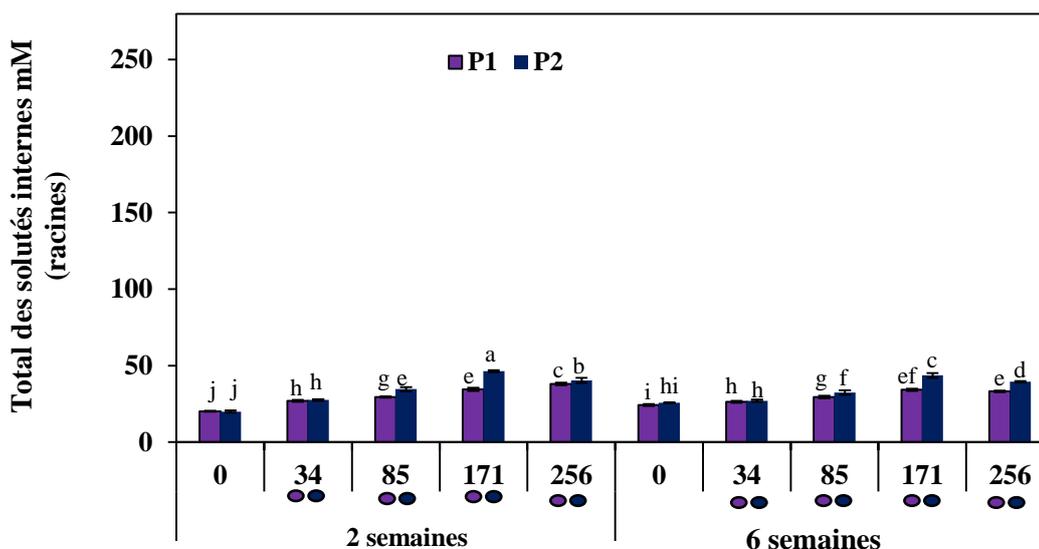
#### 1. 1. 2. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le total des solutés internes

La comparaison de la concentration interne en solutés totaux aux concentrations externes en NaCl dans la solution nutritive montre qu'il y a une relation proportionnelle entre ces dernières à travers le temps. Au niveau des feuilles le total des solutés internes atteint son maximum à 256 mM NaCl chez la population du littoral (P2) ( $201,127 \pm 1,876$  mM) après 6 semaines sous traitement salin (figure III. 19). Au niveau des racines, ce maximum est atteint après six semaines sous traitement salin à 171 mM NaCl dont la population P2 ( $43,611 \pm 1,519$  mM) accumule plus de solutés que la population P1 ( $34,227 \pm 0,773$  mM) (figure III. 20).

L'analyse de la variance montre qu'il y a une action très hautement significative du traitement salin sur le total des solutés internes chez les deux populations étudiées. (Annexe 21 et 22).



**Figure III. 19 :** Total des solutés internes (32,1 mM) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). Les cercles en violet ou en bleu indiquent que la concentration interne en soluté est inférieure à la concentration externe pour P1 et P2 respectivement.



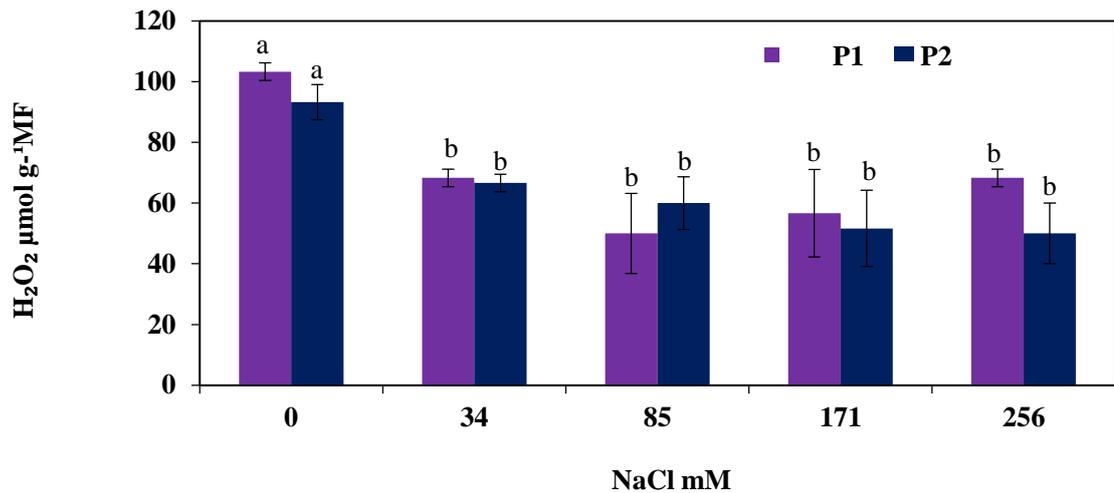
**Figure III. 20 :** Total des solutés internes (32,1 mM) des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des racines après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). Les cercles en blanc ou en noir indiquent que la concentration interne en soluté est inférieure à la concentration externe pour P1 et P2 respectivement.

#### 1. 1. 2. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les antioxydants

L'application du stress salin sur les plantules des deux populations d'*Atriplex halimus* a entraîné des changements dans l'activité enzymatique et dans l'accumulation de l'acide ascorbique.

##### 1. 1. 2. 5. 1 . Effet des différentes concentrations en NaCl sur la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

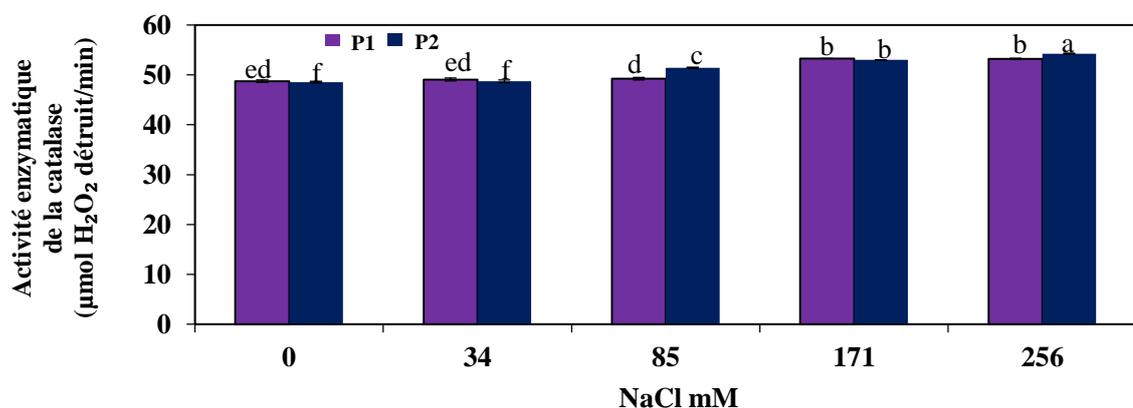
Après six semaines sous stress salin, la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles diminue d'une manière non significative avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans la solution nutritive chez les deux populations (figure III. 21). A 171 et 256 mM NaCl, cette concentration est de ( $51,667 \pm 12,583 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  ;  $50 \pm 10 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement) chez la population du littoral (P2) et de ( $56,667 \pm 14,434$  ;  $68,333 \pm 2,887 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement) chez la population steppique (P1). L'analyse de la variance révèle une action non significative du traitement sel sur la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles (Annexe 23).



**Figure III. 21 :** Concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, après six semaines sou stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* (P <0,05) (n =3).

#### 1. 1. 2. 5. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'activité de la catalase

L'activité de la catalase est liée à la quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détruite par cette enzyme. Après six semaines sous l'effet du stress salin et aux fortes concentrations en NaCl (171 mM et 256 mM), l'activité de cette enzyme au niveau des feuilles est plus importante chez les deux populations, comparée à celles des témoins (figure III. 22). L'analyse de la variance montre qu'il y a une action très hautement significative du NaCl sur l'activité enzymatique de la catalase au niveau des feuilles (Annexe 24).

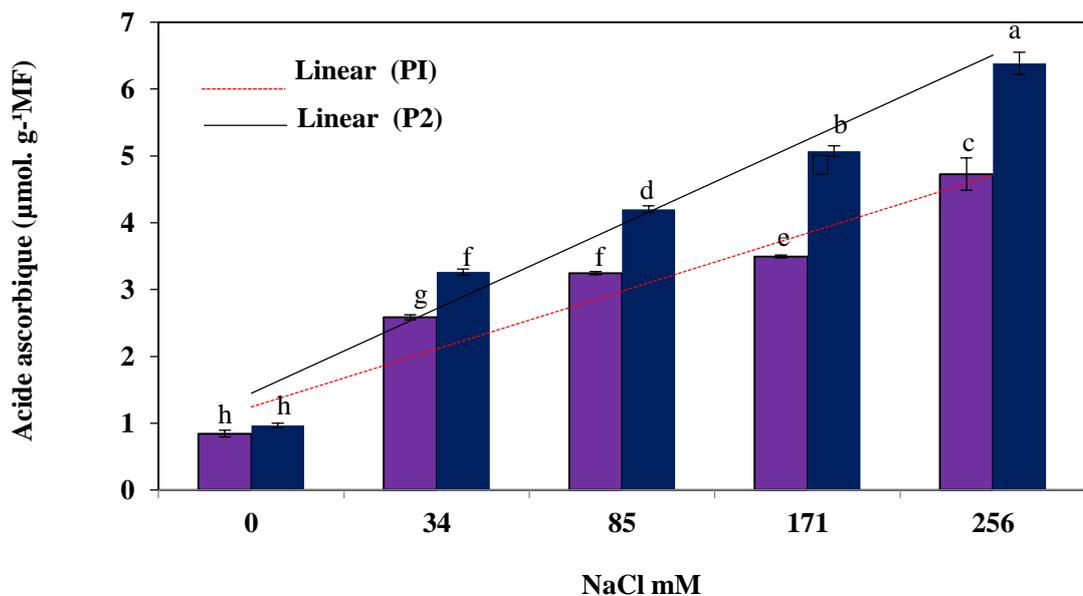


**Figure III. 22 :** Activité de la catalase au niveau des feuilles des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, après six semaines sou stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* (P <0,05) (n =3).

### 1. 1. 2. 5. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de l'acide ascorbique

Une relation proportionnelle est enregistrée entre l'accumulation de l'acide ascorbique au niveau des feuilles et l'augmentation des concentrations en NaCl après six semaines sous traitement salin (figure III. 23). La population du littoral (P2) accumule plus d'acide ascorbique que la population steppique (P1) à travers les concentrations en NaCl. Aux concentrations 171 mM et 256 mM, la population P2 montre un taux d'acide ascorbique de  $5,072 \pm 0,079$  ;  $6,386 \pm 0,164 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement. Par contre la population P1 accumule un taux d'acide ascorbique moins élevé ( $3,495 \pm 0,022$  ;  $4,727 \pm 0,241 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement).

L'analyse de la variance pour cette variable indique qu'il y a un effet très hautement significatif du facteur sel sur le taux d'acide ascorbique au niveau des feuilles (Annexe 25).



**Figure III. 23 :** Taux d'acide ascorbique des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles, après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

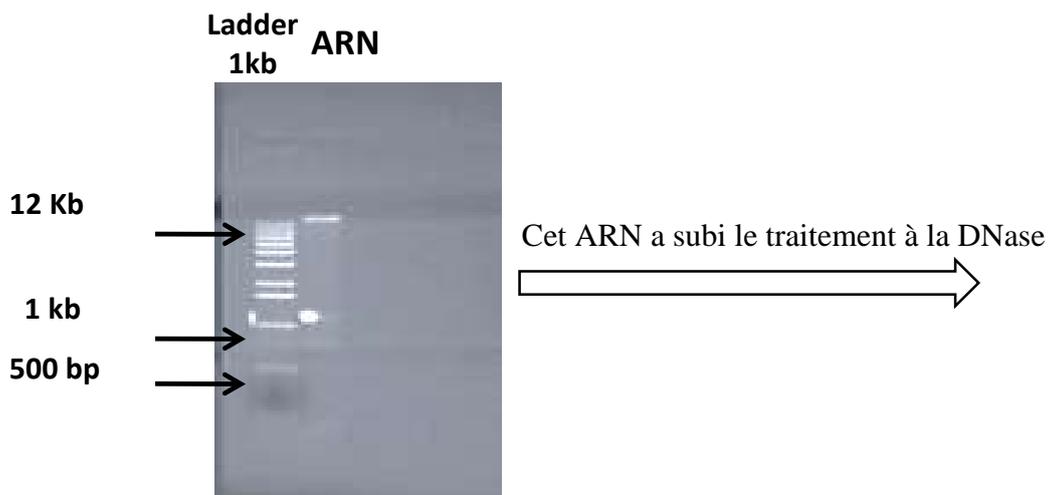
### 1. 1. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression génétique

Les résultats obtenus sur l'expression des gènes, encore appelée expression génique ou expression génétique montrent que le stress salin a induit l'expression du gène CMO (Choline monooxygénase gene) et du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter chez les deux populations de l'espèce *Atriplex halimus*, et ce au niveau des feuilles et des racines après six semaines sous les conditions salines.

Avant de présenter les résultats de l'expression génétique, il est important de présenter les résultats du test de clonage, l'ARN et l'ADNc obtenus pour la réalisation de cette étude de l'expression génétique.

#### 1. 1. 3. 1. Résultats obtenus après extraction de l'ARN de l'échantillon destiné au clonage

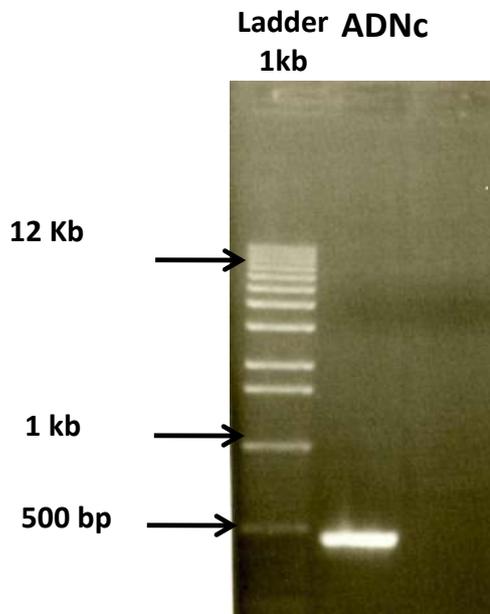
L'extraction de l'ARN de l'échantillon destiné au clonage est représentée par la figure III. 24 après électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation des bandes aux UV.



**Figure III. 24 :** ARN issu de l'extraction des tissus foliaires des plantules soumises à 171 mM NaCl de la population steppique P1 d'*Atriplex halimus* après six semaines sous l'effet du sel.

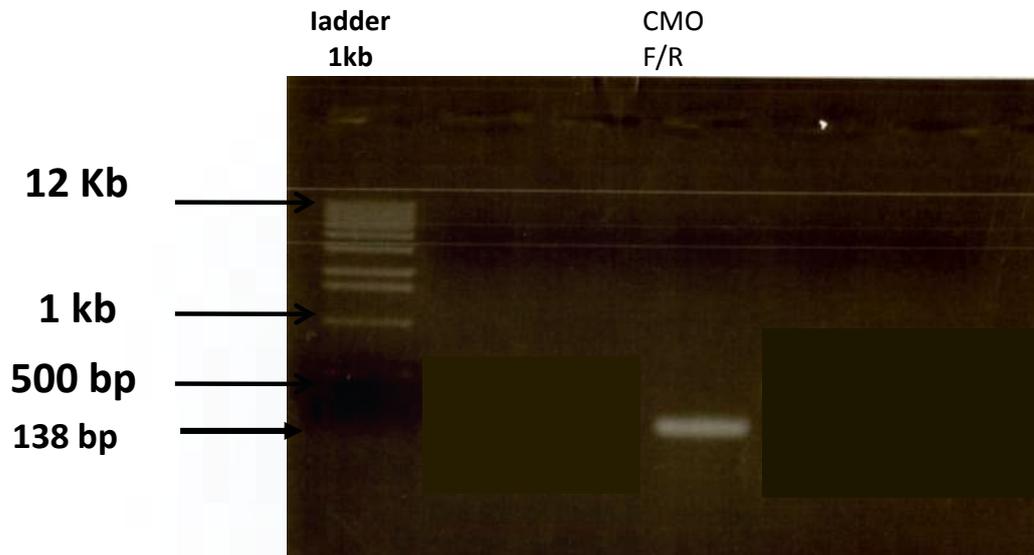
Après la synthèse de l'ADNc et la réalisation de la PCR avec les amorces de PUV (PUV2/PUV4), ce dernier est confirmé par la visualisation aux UV du gel d'électrophorèse (figure III. 25). La présence de la bande de l'ADNc est un indice de la réussite de la synthèse de cet ADN. Une fois l'ADNc est confirmé, ce dernier est utilisé pour la réalisation de la PCR avec les amorces spécifiques du gène candidat d'intérêt Choline monooxygénase (CMO). Les amorces spécifiques utilisées sont déjà représentées

dans Matériels et méthodes (voir sous titre 4.2. page 93). Le produit de la PCR obtenu est confirmé par la visualisation du gel d'électrophorèse (figure III. 26 A). Après l'extraction de la bande d'ADN révélée sur le gel précédent, la visualisation de cette dernière aux UV sur un autre gel d'électrophorèse a révélé la bande représentée par la figure III. 26 B.

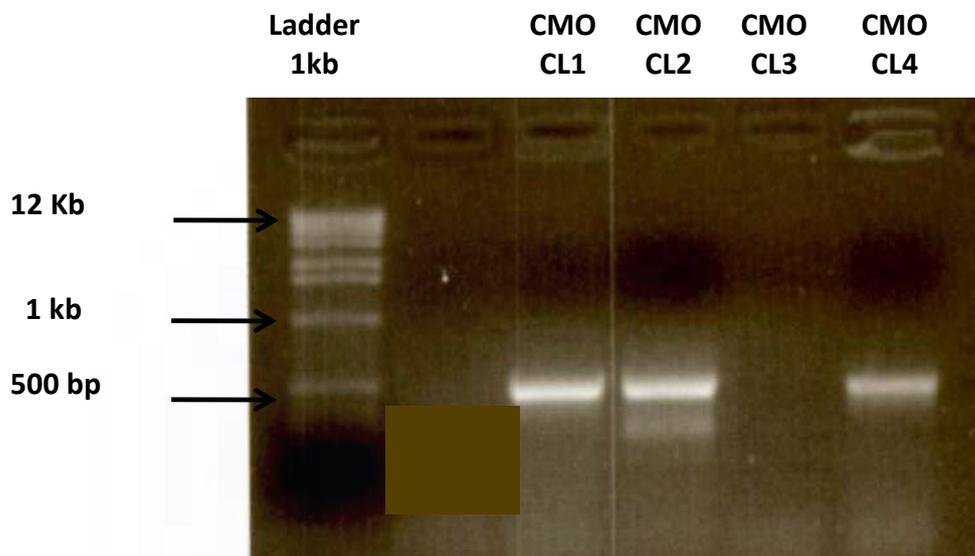


**Figure III. 25 :** ADNc issu de l'échantillon choisi pour le clonage (tissus foliaires issus des plantules tressées à 171 mM NaCl de la population steppique P1 de *Atriplex halimus*).

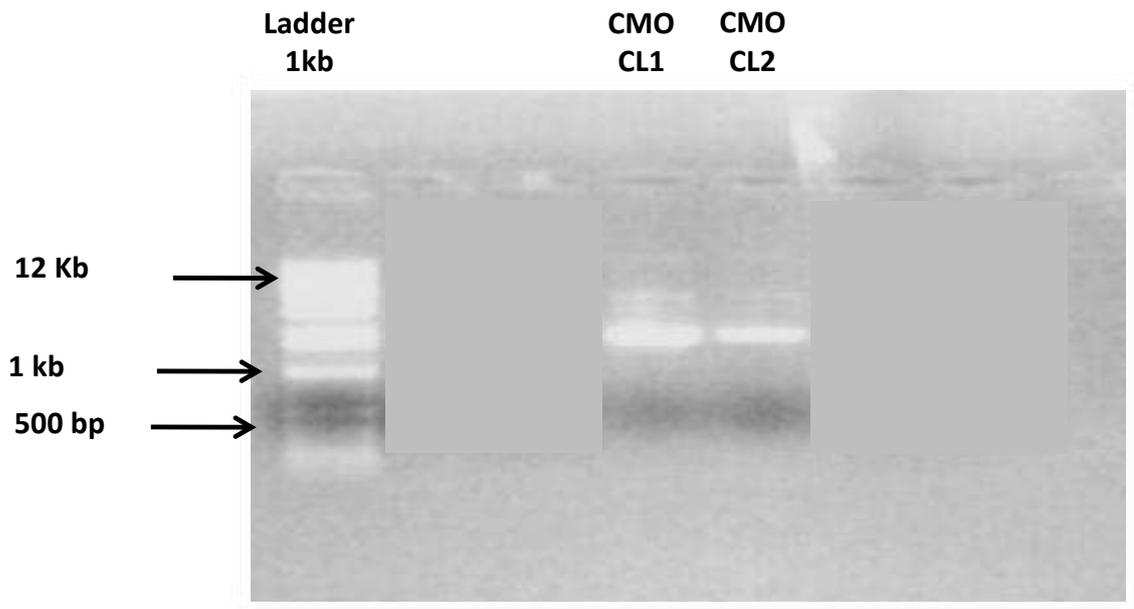
Après Ligation avec le plasmide (pGEM-Easy-T) et Transformation dans les cellules compétentes d'*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  et sélection des colonies positives après transformation par PCR, et la confirmation de la présence de ces colonies positives par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisation aux UV, les résultats obtenus montrent la présence de ces colonies (figure III. 27). La purification de l'ADN plasmidique et l'électrophorèse sur gel d'agarose suivie par visualisation aux UV sont représentées par la figure III. 28).



**Figure III. 26 : (A) :** Compatibilité des amorces spécifiques du gène CMO avec l'ADNc issu de notre échantillon choisi pour le clonage (*Atriplex halimus*).



**Figure III. 27 :** Colonies positives ayant acquis le plasmide après ligature (*Atriplex halimus*).



**Figure III. 28 :** Les ADN plasmidiques purifiés issus des colonies transformées (*Atriplex halimus*).

### 1. 1. 3. 2. Résultats de séquençage après clonage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La séquence de notre ADN est la suivante :

Fasta sequences :

```
>126274_CMO_CMOprimerF      --      115..172      of      sequence
CGCGAGGGGGCTTCCGGGAAAGGGCCCGGGCCGAGGCCCGGCCGGGGTCCTACAGGC
```

La confirmation de cette séquence est obtenue grâce au séquençage dont nos résultats de séquençage (gène CMO) obtenus après clonage sont représentés par la figure III. 29. Les résultats sont présentés par la machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, ce qui permet de déterminer l'ordre (la séquence) des bases dans l'acide nucléique (ADN). La séquence des couleurs indique la séquence de l'ADN : vert pour A, rouge pour T, bleu pour C et jaune pour G.

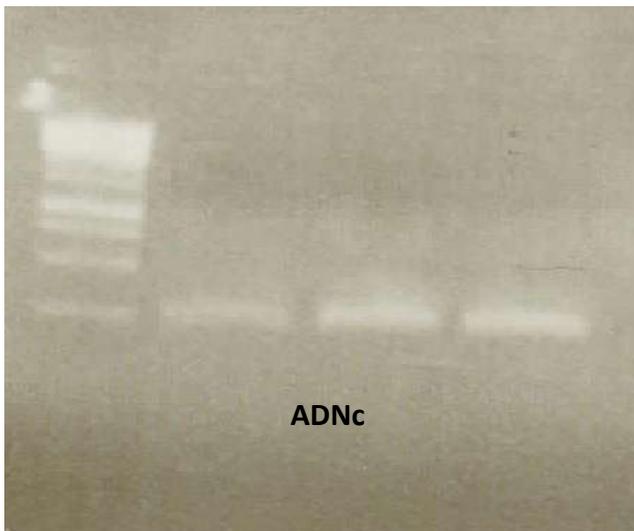
### 1. 1. 3. 3. Résultats obtenus après PCR avec les amorces spécifiques du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

#### Antiporter

La PCR directe avec les amorces spécifiques du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter révèle une compatibilité de ces amorces avec l'ADNc de nos échantillons testés (proviennent de la population steppique P1 soumise à 171 et 256 Mm NaCl) de l'espèce *Atriplex halimus*. (figure III. 30). Cette compatibilité nous a permis de passer à l'étude de l'expression génique de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter.

Ladder

1kb



**Figure III. 30 :** Compatibilité des amorces spécifiques avec les ADNc de nos échantillons choisis (*Atriplex halimus*)



#### **1. 1. 3. 4. Résultats de séquençage (gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter)**

Le but de séquençage de l'ADN est de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La séquence de notre ADN est la suivante :  
Fasta sequences :

```
>117010_T1E2_NAHF--22..194 of sequence
ATTTGACCTAGTAGCCTCCGCATGCTTCTGAATGCACCTACTCACACCGTC
CATCACTATTGGCGCAAATTCGATGACTCTTTCATGCGGCCCGTTTTTGGTG
GCCGGGGTTTTGTACCTTTTGTCCCGGGTTCACCTACTGAACAAAGCACCAA
CAATTTGAAAACCATAC
```

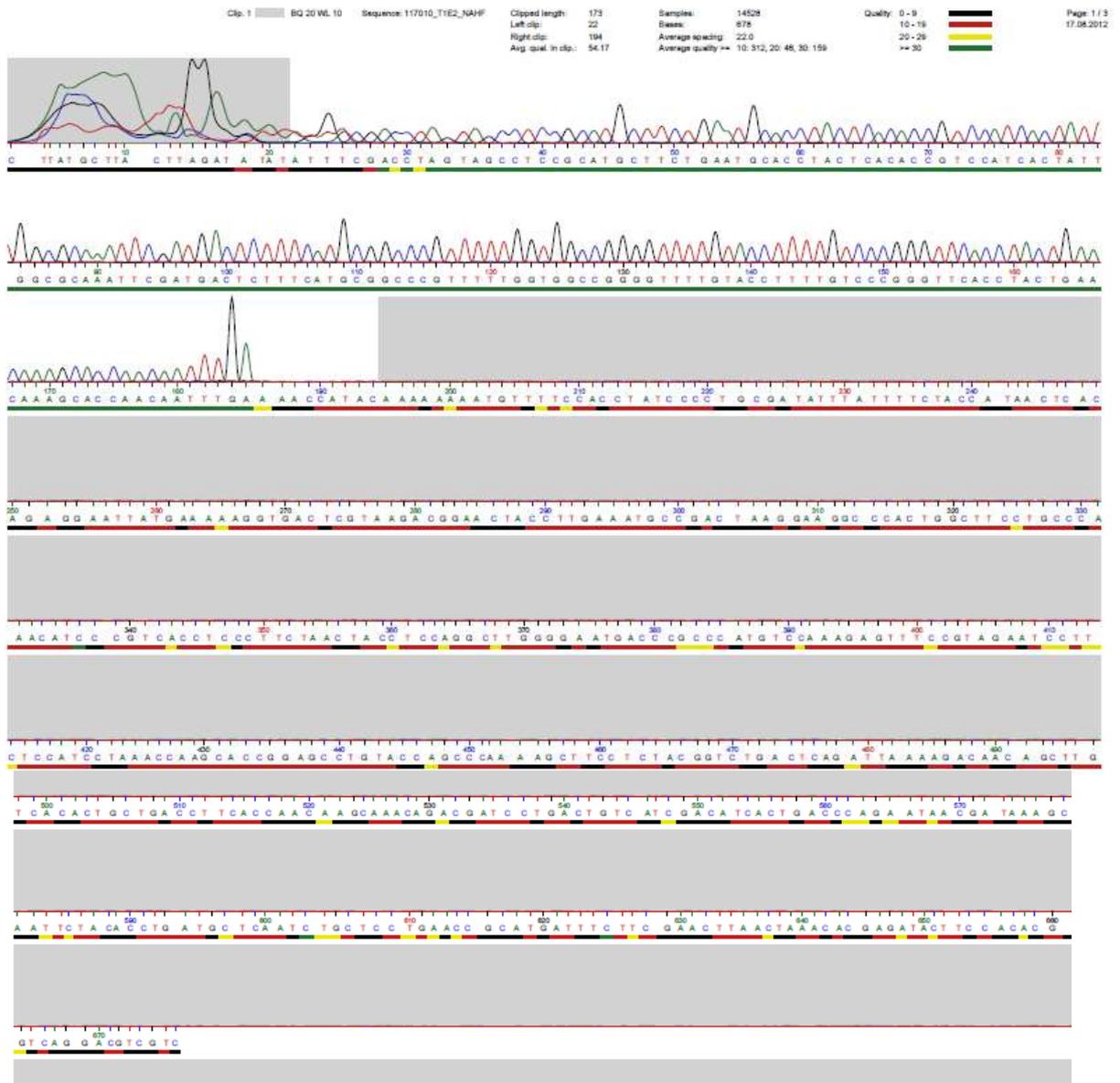
La confirmation de cette séquence est obtenue grâce au séquençage dont nos résultats de séquençage (gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporte) sont représentés par la figure III. 31. Les résultats sont présentés par la machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, ce qui permet de déterminer l'ordre (la séquence) des bases dans l'acide nucléique (ADN). La séquence des couleurs indique la séquence de l'ADN : vert pour A, rouge pour T, bleu pour C et jaune pour G.

#### **1. 1. 3. 5. Etude de l'expression génétique des gènes CMO et Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter**

Après la désignation et la confirmation des amorces spécifiques des gènes d'intérêts CMO et Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter par clonage ou directement par une simple PCR et après l'obtention des ADNc des feuilles et des racines et leur normalisation, l'étude de l'expression génique des gènes CMO et Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter est réalisée. Les résultats obtenus sont représentés séparément pour le gène CMO et le gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter.

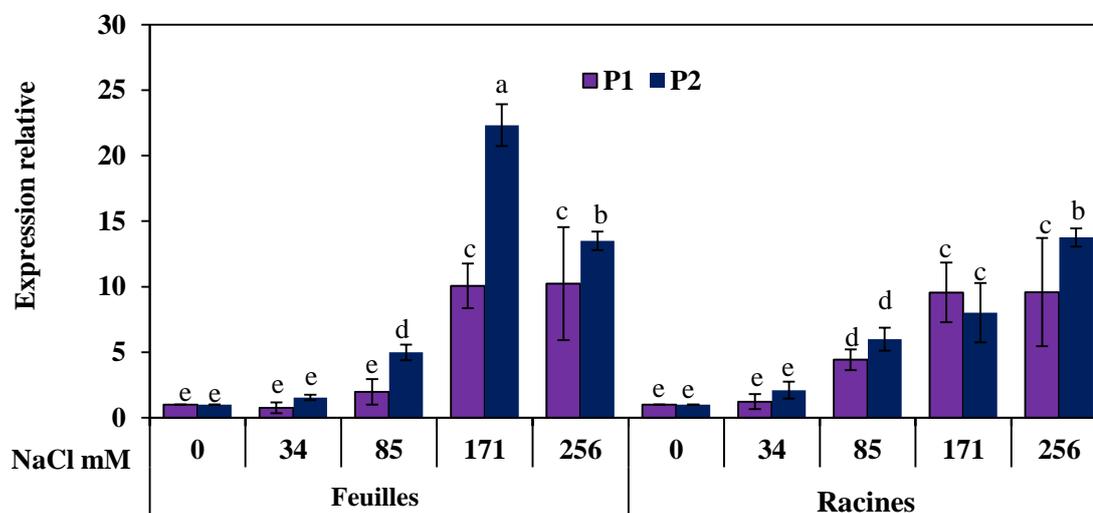
##### **1. 1. 3. 5. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter**

L'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter vis-à-vis du stress salin au niveau des feuilles et des racines chez les deux populations semble être affectée par ce dernier après six semaines sous des conditions salines (figure III. 32). Une relation proportionnelle entre les différentes concentrations en NaCl et cette expression génique est enregistrée au niveau des feuilles des plantules stressées de la population steppique (P1). A 171 mM NaCl et 256 mM NaCl, l'expression relative varie de 10,061 ± 1,588 à 10,236 ± 0,699 respectivement. Chez la population du littoral (P2), l'expression relative de ce gène présente un maximum d'expression (22,335 ± 1,707) à 171 mM NaCl. Au niveau des racines, l'expression génétique de l'antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, est plus élevée chez la population (P2) que la population (P1) à 256 mM en NaCl (13,756 ± 4,139 ; 9,582 ± 0,7 respectivement).



**Figure III. 31 :** Séquençage (gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporteur) après clonage chez *Atriplex halimus*.

L'analyse de la variance indique qu'il y a une action très hautement significative du facteur sel sur l'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporteur chez les deux populations au niveau des feuilles et des racines après six semaines de stress salin (Annexe 26).

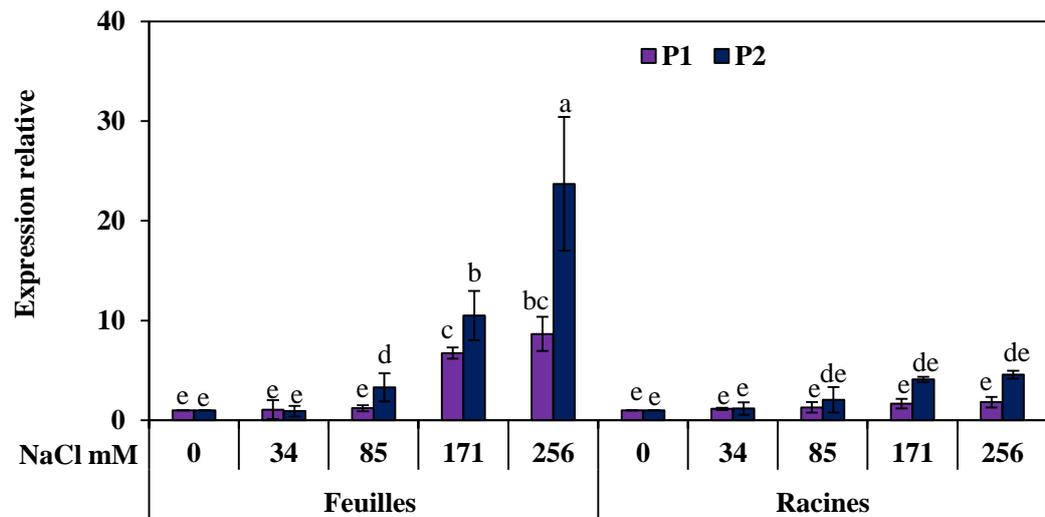


**Figure III. 32 :** Expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporteur des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles et au niveau des racines, après six semaines sous stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 6$ ).

#### 1. 1. 3. 5. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression relative du gène CMO (Choline monoxygénase)

Après six semaines sous stress salin, une relation proportionnelle est enregistrée entre l'expression génique du gène CMO (Choline monoxygenase gene) au niveau des feuilles et des racines. Cette expression génétique semble fortement stimulée par la forte concentration en NaCl (256 mM) au niveau des feuilles (figure III. 33). A cette concentration en NaCl, la population du littoral (P2) montre une expression génétique plus élevée ( $23,695 \pm 6,711$ ) que la population steppique (P1) ( $8,657 \pm 1,722$ ). Le même résultat est constaté au niveau des racines dont la population P2 montre une expression génique du CMO plus élevée ( $4,562 \pm 0,4$ ) que la population P1 ( $1,809 \pm 0,524$ ) à 256 mM (figure III. 33).

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du facteur sel sur l'expression du gène CMO au niveau des feuilles et des racines (Annexe 27).



**Figure III. 33 :** Expression relative du gène CMO des deux populations (P1 : population de la steppe ; P2 : population du littoral) d'*Atriplex halimus*, au niveau des feuilles et au niveau des racines, après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 6$ ).

## 1. 2. Discussion

L'objectif principal de notre étude était d'étudier l'effet de l'application du stress salin en une seule étape (single step-up) sur de jeunes plantules d'*Atriplex halimus* et ce juste après l'apparition de la première paire de feuilles. L'application de ce type de traitement au stade très juvénile des plants est plus proche de l'environnement naturel de cette espèce halophyte. Dans les conditions naturelles, la germination des graines est stimulée par les pluies rafraichissantes et le ruissellement des sels en profondeur. Mais vue la pénurie des pluies dans les zones arides et semi-arides, la régénération de cette plante est devenue très lente et faible d'où la nécessité de créer des pépinières auprès des agriculteurs et des éleveurs du cheptel afin de limiter le phénomène de désertification et assurer la restauration des sols marginalisés par la salinité. Maintenant avec les résultats obtenus, nous pouvons proposer aux agriculteurs de créer des pépinières d'*Atriplex halimus* tout en irriguant avec de l'eau douce (subventionnée par les autorités) de la germination à l'apparition de la première paire de feuilles et qui est une période très courte (maximum 10 jours). Cette période s'étalant de la germination des graines à l'apparition de la première paire de feuilles est très importante afin de garantir le maximum de graines

germées et par conséquent le maximum de plants régénérés par la suite. De ce fait l'irrigation avec de l'eau douce durant cette période deviendra une nécessité. Puis juste après cette courte période, les agriculteurs auront la possibilité d'irriguer avec de l'eau saline tout en connaissant maintenant les limites de tolérance au sel de ces jeunes plantules suite à nos résultats obtenus. Donc avec cette méthode, les agriculteurs et les éleveurs du cheptel auront la garantie d'avoir un pourcentage de survie élevé comme le montre cette présente étude.

Malgré l'application de NaCl en une seule étape (single step-up) et en longue durée de six semaines, les jeunes plantules des deux populations d'*Atriplex halimus* ont pu résister à la forte concentration en NaCl (256 mM) avec un pourcentage de survie qui varie de 73 % (chez la population de la steppe) à 81 % chez la population du littoral. L'étude de ce paramètre (le % de survie) est d'une grande importance car elle nous donne une idée sur les limites de la tolérance des plantules au stade très juvénile aux fortes concentrations en NaCl. L'application du traitement salin en une seule étape (single step-up) au stade très jeune des plants a été très peu étudiée. La plus part des travaux de recherche menés sur le stress salin sont caractérisés par l'application progressive du NaCl et sur des plants plus âgés. Le stress salin appliqué par Ben Hamed et *al.* (2008) après un mois d'acclimatation, induit chez les plants stressés (50, 200 et 300 mM NaCl) d'*Atriplex halimus* une croissance optimale à 50-200 mM NaCl et une certaine tolérance à 300 mM NaCl. Ben Hassine et Lutts (2010), indiquent que l'application du stress salin (160 mM NaCl) après six semaines d'acclimatation sur les plants d'*Atriplex halimus* affecte les paramètres morphologiques. De même pour Benzarti et *al.* (2014), les plants d'*Atriplex portulacoides* ont été irrigués pendant 40 jours avec une solution nutritive complète contenant les différentes concentrations en NaCl (0, 200, 400, 800 et 1000 mM). Ces derniers ont appliqué les traitements du sel en augmentant quotidiennement les concentrations salines de 50 mM NaCl jusqu'à 200 mM de NaCl. Pour les traitements ultérieurs, l'augmentation quotidienne était de 200 mM de NaCl pour atteindre la concentration finale en NaCl 1000 mM. L'application de ces fortes concentrations en NaCl même progressivement a réduit considérablement la croissance des plants. Par contre cette croissance a été considérablement stimulée à 200 mM de NaCl. Selon Walker et *al.* (2014), les concentrations modérées du NaCl (<200 mM) augmentent la croissance de l'*Atriplex halimus* tandis que les niveaux plus élevés (350-700 mM NaCl) sont des inhibiteurs de croissance. Partant de ces différentes méthodes d'application du stress

salin, il est recommandé d'utiliser des méthodes plus proches de l'environnement naturel de l'espèce étudiée et d'assurer la rentabilité aux agriculteurs et les éleveurs du cheptel. Car l'application d'une longue durée d'acclimatation et l'irrigation avec de l'eau non saline pour une longue durée n'est pas rentable aux agriculteurs et aux autorités par contre plus l'irrigation avec de l'eau non saline sera appliquée pour une courte durée plus nous allons assurer la rentabilité du point de vue économique. Sachant que toute étude expérimentale doit apporter des résultats plus proches de la nature et assurer la rentabilité.

Durant les premières semaines du traitement salin, la croissance des jeunes plantules de la population du littorale (P2) semble très peu affectée par les concentrations supérieures à 85 mM. Par contre chez la population de la steppe (P1), la croissance des plants diminue à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl. Après six semaines sous l'effet du sel, la taille des plants diminue chez les deux populations comparée aux témoins. Cependant la population du littorale, les jeunes plantules présentent une taille plus importante que la population steppique. D'après ces résultats, nous pouvons déduire que la population du littorale présente une meilleure tolérance au sel que la population steppique. Ceci peut être dû à l'environnement naturel de cette population côtière et son exposition quotidienne aux embruns marins chargés de sels. En revanche, le taux de la croissance relative (2 semaines comparées à une semaine) à la concentration en NaCl 171 mM est plus élevé chez la population du littoral que les témoins et la population steppique. À 256 mM NaCl ce taux est plus ou moins faible chez les deux populations. Ce taux de croissance relative (six semaines comparées à une semaine) diminue légèrement chez les deux populations stressées. Cette diminution de la croissance des plants serait due aux périodes prolongées du stress salin.

L'application du traitement salin par Bajji et *al.* (1998) après une période d'acclimatation de 2 semaines montre que l'*Atriplex halimus* est capable de se développer en présence de NaCl 300 mM et reste vivant lorsqu'elle est confrontée au NaCl 600 mM qui est une dose plus élevée que la concentration en sel d'eau de mer. Mais la croissance des pousses est stimulée en réponse au NaCl de 150 mM, confirmant ainsi les propriétés halophiles de cette espèce. L'étude réalisée par Boughalleb et Denden (2011) montre que les espèces halophytes : *Nitraria retusa* et *Atriplex halimus* répondent à de faibles salinités par l'augmentation de la production de la biomasse et le taux de croissance relative. Mais des salinités plus élevées (400 à 800 mM NaCl) sont inhibitrices pour la croissance des plantes, en particulier l'*A. halimus*. Daly et *al.* (2016) indiquent que la croissance est

ralentie à des concentrations très élevées de salinité (400 mM de NaCl) même après deux mois d'acclimatation avant le traitement salin. Belkheiri et Mulas (2013) indiquent que la plupart des études menées sur l'*Atriplex halimus* montrent que le taux de croissance augmente avec la salinité jusqu'à des concentrations d'environ 100-200 mM NaCl. Ce qui conforte les résultats obtenus dont la population du littoral montre une croissance optimale aux concentrations salines 85 - 171 mM même après six semaines de stress salin.

En plus du pourcentage de survie et le taux de croissance relative, la teneur en eau est un facteur physiologique très important qui nous donne une idée sur le degré de succulence de notre population choisie. Durant l'étude, cette teneur en eau semble légèrement affectée à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl chez les deux populations au niveau des feuilles et des racines. Cependant la population du littoral (P2) accumule plus d'eau que la population steppique (P1). Les résultats obtenus par Daly et al. (2016) montrent que le degré de succulence des feuilles de l'*A. halimus* augmente jusqu'à 150 mM et diminue avec une forte salinité. Boughalleb et Denden (2009), indiquent que la teneur en eau au niveau des feuilles chez l'*A. halimus* diminue de manière significative ( $P < 0,05$ ) lorsque les taux de salinité augmente à 200 mM. Chez *Medicago arborea*, cette réduction est plus nette par rapport à l'*A. halimus*. Chez les deux populations (Monastir : région côtière et Sbikha : zone aride) d'*Atriplex halimus* étudiées par Ben Hassine et al. (2009), la teneur en eau au niveau des feuilles et des racines après 10 jours de traitement, a été réduite en réponse à la dose la plus élevée de NaCl (160 mM). Boughalleb et Denden (2011) signalent que l'augmentation de la concentration en NaCl induit la promotion de la teneur en eau chez les deux espèces : *Nitraria retusa* et l'*Atriplex halimus* avec des taux plus élevés obtenus à 200-800 mM NaCl chez *N. retusa* et à 100-200 mM NaCl chez l'*Atriplex halimus*.

Les résultats obtenus concernant le taux de la chlorophylle totale montrent une légère diminution de ce dernier chez les deux populations étudiées à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl. Cette diminution peut être due à la fermeture des stomates lorsque la concentration en sel est plus élevée. Sous des conditions salines et dans certains cas, les plantes peuvent développer des adaptations qui permettent d'éviter ou de retarder les faibles potentiels hydriques (ex: systèmes racinaires profonds et étendus, transport efficace du xylème et adaptation des feuilles comme la fermeture stomatique et le développement de la cuticule) (Kozlowski et Pallardy, 1996). Il est prouvé que la fermeture de stomates retardée est souvent associée à des espèces indigènes

d'habitats secs et de régions arides (Kozłowski et Pallardy, 1996). Selon la voie de la photosynthèse, l'*Atriplex halimus* est considérée comme une plante de type C4 (Lieth et Mochtchenko, 2013). Les plantes en C4 possèdent donc un avantage sur les plantes en C3 lorsque les stomates sont partiellement fermés afin de conserver l'eau pendant les périodes de stress hydrique, elles ont la capacité de concentrer le CO<sub>2</sub> et donc de réduire la perte en CO<sub>2</sub> par la photorespiration (Hopkins, 2003). Donc on peut déduire que grâce à cet avantage, nos plantules ont pu continuer de croître dans des conditions salines (171 et 256 mM NaCl) avec un bon emmagasinement de l'eau dans les tissus tout en protégeant l'appareil photosynthétique (dont aucun symptôme de jaunissement n'a été observé sur nos jeunes plantules). Redondo-Go' Mez et al. (2007) signalent qu'après 3 mois d'acclimatation des plantules d'*Atriplex portulacoides*, les concentrations en NaCl (20, 200, 400 et 700 mM) ne présentent aucun effet sur les concentrations en chlorophylle dans les feuilles après 3 jours, 6 jours et 60 jours sous traitement salin. Le même constat est signalé par Boughalleb et Denden (2009) dont les teneurs en chlorophylle a et b ne sont pas affectées à 200 mM et 400 mM de NaCl chez l'*A. halimus* et *Nitraria retusa*, puis ce taux diminue à des niveaux plus élevés de salinité (800 mM).

Le stress ionique est le deuxième problème important que les plantes doivent faire face sous une contrainte saline. À cet égard, la tolérance est déterminée en partie par la capacité de la plante à réguler le transport du Na<sup>+</sup> de la racine aux pousses au fil du temps, ainsi que la compartimentation dans organites cellulaires afin d'éviter les concentrations toxiques de Na<sup>+</sup> dans le cytoplasme (Shabala, 2013). Debez et al. (2003) signalent que l'accumulation de Na<sup>+</sup> à l'intérieur des feuilles d'*A. halimus* améliore l'état de l'eau des feuilles ce qui a des conséquences positives sur les processus métaboliques et osmotiques. Walker et al. (2014) indiquent que l'*A. halimus* comme d'autres halophytes accumule des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> et d'autres ions dans ses tissus et les stocke dans la vacuole. À l'issue de nos essais, et durant les premières semaines du stress salin, l'accumulation de Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles et des racines est proportionnelle aux concentrations de NaCl jusqu'à 171 mM NaCl puis cette accumulation diminue. Par contre après six semaines sous des conditions salines, le taux de Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles est proportionnel à travers toutes les concentrations en NaCl. La population du littoral (P2) accumule plus de Na<sup>+</sup> que la population de la steppe (P1). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Ben Hassine et al. (2009). Les résultats obtenus par ces derniers montrent que les deux populations d'*Atriplex halimus* (Monastir : région côtière et Sbikha : zone aride) présentent une

accumulation croissante des ions  $\text{Na}^+$  au niveau des pousses à travers les différentes concentrations en NaCl (40-160 mM). La population de Monastir (du littoral) accumule plus de  $\text{Na}^+$  que la population Sbikha (aride). A l'issue des essais réalisés par Nemat Alla et *al.* (2012) chez l'*Atriplex halimus*, l'accumulation de  $\text{Na}^+$  est proportionnelle aux différentes concentrations en NaCl (50, 300 et 550 mM) au niveau des feuilles. Les résultats obtenus par Suaire et *al.* (2016) montrent que l'accumulation de  $\text{Na}^+$  augmente avec l'élévation des concentrations en NaCl chez les deux espèces halophytes *Atriplex halimus* et *Atriplex hortensis* au niveau des parties aériennes. D'après toutes ces données nous pouvons déduire que l'accumulation du  $\text{Na}^+$  est une forme d'adaptation à la salinité.

Le potassium joue plusieurs rôles au niveau cellulaire, il maintient le port de la plante par son effet majeur sur la turgescence des cellules et la constitution de parois cellulaires résistantes. Il agit sur la photosynthèse en activant plus de 80 systèmes enzymatiques. Il favorise la circulation de la sève ascendante dans le xylème et descendante dans le phloème. Il permet le transfert des assimilats (sucres, acides aminés) vers les racines et les organes de réserve (grains, fruits, tubercules). Et enfin il contrôle l'ouverture et la fermeture des stomates et régule le cycle de l'eau dans la plante (Mäser et *al.*, 2002). Compte tenu du fait que les traitements élevés en NaCl altèrent la nutrition des plantes en potassium, il est suggéré que la carence en  $\text{K}^+$  au niveau cellulaire pourrait être un facteur contributif du stress oxydatif induit par le sel et des lésions cellulaires apparentées. Par conséquent, l'amélioration de la nutrition des plantes en potassium sous le stress salin pourrait être essentielle pour minimiser les dommages oxydatifs des cellules par la réduction de la formation des ROS lors de la photosynthèse (Cakmak, 2005). L'homéostasie ionique et la rétention de l'ion  $\text{K}^+$  dans des conditions du stress salin sont également associées à l'accumulation de solutés compatibles (Bojórquez-Quintal et *al.*, 2016). Les résultats obtenus durant cette présente étude révèlent une bonne assimilation du  $\text{K}^+$  au niveau des feuilles et des racines chez les deux populations à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl. La population issue du littoral (P2) présente une meilleure sélectivité au  $\text{K}^+$  par rapport à la population de la steppe (P1). Cette bonne sélectivité de la population (P2) a confit à cette dernière une meilleure croissance et une accumulation d'eau plus importante que la population (P1). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Ben Hamed et *al.* (2008). Ces derniers signalent que les plants d'*Atriplex halimus* maintiennent une sélectivité élevée dans un milieu salé malgré une grande quantité de  $\text{Na}^+$  dans le milieu (50-300 mM NaCl). Les résultats obtenus par

Martínez et al. (2005) montrent que le NaCl diminue le taux de K<sup>+</sup> au niveau des jeunes et des vieilles feuilles chez l'*Atriplex halimus*. Au niveau des racines le taux de K<sup>+</sup> diminue considérablement chez *Nitraria retusa* et *Atriplex halimus* à 200, 400 et 800 Mm NaCl (Boughalleb et Denden, 2011).

La compartimentation intracellulaire des solutés toxiques, empêchant leur accumulation dans le cytoplasme, est une condition préalable au maintien de l'intégrité cellulaire, à l'élévation du taux de K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> cytoplasmique et à la contribution du potentiel osmotique vacuolaire (Leigh et Storey, 1993). Un ratio K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> cytoplasmique élevé est important pour le maintien du métabolisme cellulaire (Zhu, 2003). Nos résultats montrent qu'au niveau des feuilles, le ratio diminue par rapport aux témoins chez les deux populations au niveau des feuilles et des racines. Mais ce ratio K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles reste > 1 à toutes les concentrations de sels tout au long de l'expérimentation ce qui correspond à l'obligation d'équilibrer ces deux ions pour protéger la synthèse des protéines et d'autres fonction métabolique de la plants (Flowers et al., 2015). Des résultats similaires aux nôtres, tels que ceux de Belkheiri et Mulas (2013) montrent que les plantes d'*Atriplex halimus* sont sélectives pour le K<sup>+</sup> et le ratio K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> est réduit par la salinité mais il reste supérieur à 1.

En plus de l'accumulation d'osmolytes ioniques dans la vacuole, il existe une accumulation cytoplasmique d'osmolytes organiques "compatibles" (notamment proline et glycinebétaine) qui n'interfèrent pas avec les processus métaboliques. Ils maintiennent l'équilibre osmotique dans le tonoplaste et protègent les membranes, les organelles et les protéines. La proline régleme également le carbone et le métabolisme de l'azote, agit comme antioxydant et favorise le rétablissement une fois que le stress a diminué (Szabados et Savouré, 2009). Ce composé a un rôle important dans l'osmorégulation, et c'est une réponse métabolique importante à la salinité d'*Atriplex* et d'autres espèces de Chenopodiaceae (Chinnusamy et al., 2005). Nos résultats concernant l'accumulation de la proline montrent que les feuilles accumulent plus de proline que les racines. Le taux le plus élevé au niveau des feuilles et des racines est obtenu à 171 mM NaCl chez les deux populations étudiées à travers le temps. Cependant, la population du littoral (P2) accumule plus de proline que la population de la steppe (P1). Ces résultats sont similaires aux résultats obtenus par Bajji et al. (1998) chez l'*Atriplex halimus* dont les feuilles accumulent plus de proline que les racines et le taux de proline augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl (150, 300,450 et 600 mM). Nos résultats sont

également similaires à ceux obtenus par Djerroudi et *al.* (2011) dont les feuilles accumulent plus de proline au niveau des feuilles que les tiges et les racines. Par contre nos résultats sont opposés à ceux obtenus par Ben Hassine et *al.* (2009) chez l'*Atriplex halimus* dont la population Sbikha (zone aride) accumule plus de proline au niveau des pousses que la population Monastir (région côtière) à 40 et 160 mM NaCl. D'après Daly et *al.* (2016), le taux de proline au niveau des feuilles chez l'*Atriplex halimus* augmente d'une manière significative avec les concentrations croissantes en NaCl (0, 50, 100, 150, 200 and 400 mM). L'étude menée par Belkheiri et Mulas (2013) révèle une relation proportionnelle entre le taux de proline et les différentes concentrations en NaCl (200, 400, 600, 800 et 1000 mM). Chez l'*Atriplex portulacoides*, l'accumulation de la proline au niveau des feuilles est stimulée par les concentrations en NaCl très élevées (200, 400, 800 et 1000 Mm) (Benzarti et *al.*, 2014). D'après tous ces résultats précités nous pouvons déduire que l'accumulation de la proline est une forme d'adaptation à la salinité chez les plantes halophytes.

L'accumulation de la glycine bêtaïne est critique pour la tolérance des plantes à la salinité (Huang, 2016). Elle protège la plante en préservant la balance hydrique entre la cellule végétale et son environnement et en stabilisant les macromolécules. Ce composé organique est principalement localisé dans les chloroplastes et joue un rôle essentiel dans l'ajustement des chloroplastes et la protection des membranes thylakoïdes, ce qui maintient l'efficacité photosynthétique et l'intégrité de la membrane plasmatique (Autores, 2013). La glycine bêtaïne réduit également la peroxydation des lipides durant le stress salin (Huang, 2016). Pessaraki (2001) signale qu'il existe une corrélation positive entre la concentration en sel et l'accumulation de la glycine bêtaïne chez l'*Atriplex semibaccata*, l'*Atriplex halimus*, *Spartina alterniflora*, *Limonium* sp et *Suaeda monoica*. Ce constat est similaire aux résultats obtenus durant notre étude expérimentale dont l'accumulation de cet osmoprotecteur au niveau des feuilles et des racines est proportionnelle aux différentes concentrations en NaCl et à travers le temps chez les deux populations étudiées. La population du littoral (P2) accumule plus de glycine bêtaïne que la population de la steppe (P1). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Ben Hassin et *al.* (2008) dont la population du littoral (Monastir) accumule plus de glycine bêtaïne que la population Sbikha de la zone aride. Chez l'*Atriplex atacamensis*, l'accumulation de la glycine bêtaïne au niveau des feuilles est plus importante chez les plantules stressées (100 mM NaCl) que chez le témoin (Vromman et *al.*, 2016). A partir

de ces données nous pouvons conclure que les plantules d'*Atriplex halimus* sont tolérantes aux fortes concentrations en NaCl grâce à l'accumulation de la glycine bêtaïne.

L'augmentation du taux des sucres solubles sous des conditions salines constitue une autre stratégie de défense d'une grande importance que les plantes utilisent pour faire face au stress salin (Arora et al., 2017). Il existe une forte corrélation entre l'accumulation des sucres solubles et la tolérance au stress osmotique. Parmi les divers osmotiques organiques, les sucres apportent jusqu'à 50% du potentiel osmotique total chez les glycophytes soumises à des conditions salines. Ils jouent un rôle de premier plan dans l'osmoprotection, l'ajustement osmotique et le stockage du carbone lors d'une contrainte saline (Autores, 2013). La présence de quantités plus élevées de sucres solubles est considérée comme un principal contributeur pour l'ajustement osmotique chez les plantes d'*Atriplex halimus* exposées aux contraintes dues au NaCl (Martinez et al., 2005). A l'issue de nos essais, le taux des sucres solubles au niveau des feuilles et des racines augmente avec les différentes concentrations en NaCl et à travers le temps chez les deux populations. La population du littoral (P2) accumule plus de sucres solubles que la population steppique (P1). Notons également que les feuilles accumulent plus de sucres que les racines. Nedjimi (2010), indique que la proline et les sucres totaux sont accumulés en quantités relativement proportionnelles aux concentrations salines (7.92 g/l et 9.37 g/l NaCl) au niveau de la partie aérienne chez l'*Atriplex halimus*. Hadjadj et al. (2011) signalent que l'accumulation des sucres solubles est importante dans les feuilles chez les deux espèces halophytes : *Atriplex halimus* et *Atriplex canescens* pour les deux traitements salins (400 et 600 meq NaCl+CaCl<sub>2</sub>). La teneur en sucres solubles enregistrée par Brinis et Belkhodja (2015) montre une augmentation de cet osmolyte avec l'accroissement des concentrations en NaCl (50 meq = 3g.l<sup>-1</sup> et 200 meq = 6 g.l<sup>-1</sup>). Les sucres solubles peuvent également jouer un rôle antioxydant contre les ROS sous stress biotique et abiotique (Keunen et al. 2013), agissant ainsi avec d'autres mécanismes de protection. L'augmentation des sucres solubles observés chez nos deux populations, et l'accumulation relativement plus élevée chez la population côtière peuvent contribuer au maintien de l'homéostasie des ROS sous stress salin.

Une comparaison de la concentration totale des solutés internes avec la concentration de soluté externe indique qu'au bout d'une semaine et deux semaines sous traitement salin, l'ajustement osmotique des feuilles ne se produit en aucune concentration en NaCl lorsque les solutés nutritifs (32.1 mM) sont inclus dans les calculs. Cependant,

après 6 semaines, les feuilles des deux populations stressées (à 34 et 85 mM NaCl) font recours à l'ajustement osmotique afin de maintenir la balance entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. En revanche, l'ajustement osmotique ne semble pas se produire dans les racines à aucune concentration. Cette différence entre les racines et les feuilles a été notée précédemment chez *Atriplex mummularia* (Silveira et al., 2009). Notons ainsi que, le calcul ici doit être interprété avec prudence et peut être une sous-estimation significative. Bien que la concentration de plusieurs des osmolytes organiques majeurs normalement considérés comme importants pour l'ajustement osmotique (proline, sucres solubles et glycine bêtaïne) ainsi que  $K^+$  (Singh et al., 2015) ont été inclus durant nos calculs. D'autres solutés cellulaires tels que d'autres acides aminés et les ions contribueront à la concentration interne de soluté peuvent donc modifier le seuil.

Sous des conditions salines, les structures cellulaires sont menacées suite à la production des formes actives de l'oxygène (FAOx). Cependant, les cellules disposent d'un système antioxydant enzymatique (la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX) et les catalases (CAT)) et non enzymatique (tel que l'acide ascorbic) pour neutraliser ces radicaux libres (Doudech et al., 2008).

Le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  est le ROS modérément réactif généré par la réduction univalente de l' $O_2$  catalysé par la superoxyde dismutase. Il joue un rôle important dans les processus physiologiques tels que la photorespiration, les photosynthèses, la sénescence, le mouvement stomatique, la croissance et le développement. À des concentrations élevées,  $H_2O_2$  provoque la mort cellulaire chez les plantes (Ahmad et al., 2012).  $H_2O_2$  est l'espèce d'oxygène radical la plus stable. Par conséquent, la décomposition de  $H_2O_2$  est essentielle dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs (Vasil, 2013). Le stress salin induit l'accumulation de ROS et améliore l'expression des enzymes détoxifiantes de ROS. Ces enzymes assurent l'atténuation des dommages oxydatifs par le balayage détoxifiant de ROS (Setlow, 2006). Le niveau intracellulaire de  $H_2O_2$  est régulé principalement par la catalase et la peroxydase (Witlekens et al., 1995). Nos résultats obtenus montrent que la concentration en  $H_2O_2$  au niveau des feuilles chez les deux populations étudiées diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans la solution nutritive après six semaines sous stress salin. Cette diminution est due à l'activité de la catalase qui est intervenue afin de diminuer les dommages causés par l'excès de  $H_2O_2$  dans la cellule. Nos résultats sont similaires aux résultats obtenus par Boughalleb et Denden (2011) dont la teneur en

peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) enregistrée au niveau des feuilles est faible aux fortes concentrations en NaCl (400- 800 mM).

La catalase (CAT) joue un rôle clé dans le stress salin. Elle est l'enzyme le plus réactif à l' $H_2O_2$  (Acton, 2013), intervenant dans l'élimination du  $H_2O_2$  (Jain et Gupta, 2013). Dans les cellules des plantes, cette enzyme est impliquée dans les fonctions photorespiratoires (Baker, 2006) et le balayage du  $H_2O_2$  lors de l'oxydation des acides gras dans les graines de germination et aussi pendant le stress salin et d'autres conditions de stress abiotique (Jain et Gupta, 2013). L'augmentation de l'activité catalytique de la catalase est un indice de l'amélioration de la tolérance des plantes au sel en agissant comme éliminateur de  $H_2O_2$  (Vasil, 2013). Ce constat est confirmé par nos résultats obtenus concernant l'effet du stress salin sur l'activité de cette enzyme. En effet, la population du littoral (P2) présente une activité plus ou moins importante par rapport aux témoins et la population steppique (P1) après six semaines sous stress salin. De même pour Boughalleb et *al.* (2010), l'activité enzymatique de la catalase au niveau des feuilles de l'*Atriplex halimus* augmente à 400 et 800 mM de NaCl. Mêmes auteurs concluent que les activités enzymatiques antioxydantes supérieures (Superoxide Dismutase, SOD, Catalase, CAT, Peroxydase, POD) chez cette espèce halophyte jouent un rôle majeur dans la restriction des dommages oxydatifs causés par le stress salin. Benzarti et *al.* (2012) signalent que l'activité enzymatique antioxydante de la catalase au niveau des feuilles de l'*Atriplex portulacoides* est élevée suite au traitement du sel, en particulier à 400 mM de NaCl. Chez l'*Atriplex Nummularia*, l'activité de la Catalase (CAT) sous le stress salin (80 mM) présente une élévation considérable au niveau des feuilles (Almohisen, 2015).

L'ascorbate (ASA) ou l'acide ascorbique (Vitamin C) est un antioxydant très important dans les tissus végétaux. Il est synthétisé dans le cytosol des plantes supérieures, issu de la conversion de D- glucose à l'acide ascorbique. Cet antioxydant non enzymatique joue plusieurs rôles dans les processus physiologique des plantes (croissance, différenciation et métabolisme) (Ahmad et *al.*, 2012). Il joue également un rôle dans la tolérance des plantes aux différents stress. L'acide ascorbique influence plusieurs activités enzymatiques, minimisant ainsi les dommages causés par l'oxydation par une fonction synergique avec d'autres antioxydants (Foyer et Noctor, 2005). L'acide ascorbique réagit avec une gamme de ROS (Espèces réactives de l'oxygène = Reactive oxygen species) tel que  $^1O_2$  (oxygène singulet),  $O_2^-$  (Superoxide radicals),  $HO\cdot$  (radical hydroxyle) et  $H_2O_2$  (peroxyde d'hydrogène), qui est à la base de son action antioxydante

(Asard et *al.*, 2013). Différentes études montrent que la teneur en acide ascorbique au niveau des feuilles des plants stressés augmente avec l'augmentation du stress salin (Mohamed et *al.*, 2010). Ce qui correspond à nos résultats obtenus dont l'accumulation de l'acide ascorbique augmente avec les concentrations croissantes en NaCl au niveau des feuilles des deux populations étudiées et ce après six semaines sous l'effet du sel. La population du littoral (P2) accumule plus de cet antioxydant que la population steppique (P1). Ce constat est confirmé par les résultats obtenus par Ben Hassin et *al.* (2009) dont les plantules de la population Monastir (littoral) accumule plus de l'acide ascorbique que la population Sbikha (zone aride) à travers les concentrations en NaCl (40 et 160 mM).

Grâce aux progrès récents dans l'analyse génétique et l'avènement de la génomique, l'isolement et l'identification des gènes responsables de la tolérance au sel sont considérés d'une grande importance. La résistance au sel est un quantitatif contrôlé par plusieurs gènes dans les plantes (Wu et *al.*, 2016). La disposition d'une base moléculaire et d'un pool génétique varié constitue une étape indispensable avant d'entamer des travaux de génomique fonctionnelle et de transformation génétique visant à améliorer la tolérance des plantes aux contraintes environnementales. À ce jour, les efforts visant à identifier et à étudier les gènes liés au stress salin chez les halophytes en général, et chez l'*Atriplex halimus* en particulier, sont limités (Diedhiou et *al.*, 2009). L'identification des deux gènes (gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter et gène CMO (choline monooxygénase gene) liés à la salinité durant notre étude expérimentale et l'étude de l'expression génétique de ces gènes par PCR quantitative en temps réel (*Real time PCR*) sont d'une grande importance afin de comprendre l'aptitude des plantules d'*Atriplex halimus* à faire exprimer le gène ou les gènes liés à la salinité.

Chez les plantes, le Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter qui est situé dans la membrane plasmique et la membrane vacuolaire peut exclure activement le Na<sup>+</sup> excessif du cytosol ou compartimenter dans le tonoplaste pour éliminer la toxicité due au Na<sup>+</sup> (Hasegawa et *al.*, 2000). Il représente donc un mécanisme d'élimination du sodium du cytoplasme afin de maintenir de faibles concentrations de ce dernier dans les cellules végétales (Bassil et *al.*, 2011). La tolérance au sel des plantes peut être améliorée par la surexpression des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters (Shi et *al.*, 2003) et les profils d'expression de ces gènes diffèrent entre les espèces sensibles aux sels et les espèces tolérantes (Kant et *al.*, 2007). L'application du stress salin sur les jeunes plantules des deux populations d'*Atriplex halimus* durant notre étude expérimentale a provoqué une surexpression du gène contrôlant le Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>

Antiporter au niveau des feuilles et des racines. La population du littoral (P2) révèle une surexpression au niveau des feuilles à la concentration en NaCl de 171 mM et une forte expression du gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter à 256 mM NaCl au niveau des racines. Cette dernière présente une expression génétique plus élevée que les témoins et la population steppique (P1). Ohta *et al.* (2002) indiquent que cette surexpression est considérablement augmentée chez les plantes tolérantes au sel telles que la betterave à sucre, l'orge et le bananier. Plusieurs gènes codant pour le  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter de vacuole ont été isolés de plusieurs espèces végétales : *Arabidopsis Thaliana* (Apse *et al.*, 1999), *Oryza sativa* (Fukuda *et al.*, 1999) et *Atriplex gmelini* (Hamada *et al.*, 2001),

Sous l'effet du stress abiotique, la glycine bêtaïne est synthétisée par oxydation de la choline, durant laquelle la choline monooxygénase (CMO) est une enzyme clé. Par conséquent, la surexpression du gène CMO chez les plantes stressées peut entraîner la production d'une quantité suffisante de la glycine bêtaïne, ce qui conduit les plantes à tolérer différents stress, y compris le stress salin (Tuteja *et al.*, 2011). A l'issue de nos essais, l'expression génique du gène CMO au niveau des feuilles et des racines semble influencée par l'accroissement des concentrations en NaCl chez les deux populations étudiées. La population du littoral (P2) montre une expression génétique plus importante par rapport à la population steppique et les témoins. Signalant également que les feuilles se caractérisent par une expression génique plus élevée que les racines. Tabuchi *et al.* (2005) indiquent que les niveaux d'expression du gène CMO chez l'*Atriplex nummularia* sont beaucoup plus élevés dans les feuilles et les tiges que dans les racines, suggérant que la glycine bêtaïne est synthétisée principalement dans les pousses. Madhava Rao *et al.* (2006) signale que l'installation du gène de la synthèses de la choline monooxygénase (CMO) de l'halophyte *Suaeda liaotungensis* dans le tabac entraîne une accumulation de bêtaïne dans les plantes transgéniques, et par conséquent la possibilité de survivre dans des milieux contenant 250 mM de NaCl (Qiu-Li *et al.*, 2003). Le même constat est signalé par Shen *et al.* (2002) chez le tabac transgénique dont la surexpression du gène CMO isolé d'*Atriplex hortensis* (gène *AhCMO*), dans le tabac entraîne une meilleure performance sous le stress salin et hydrique.

## 2. Résultats et Discussion de l'espèce *Crithmum maritimum*

### 2. 1. Résultats

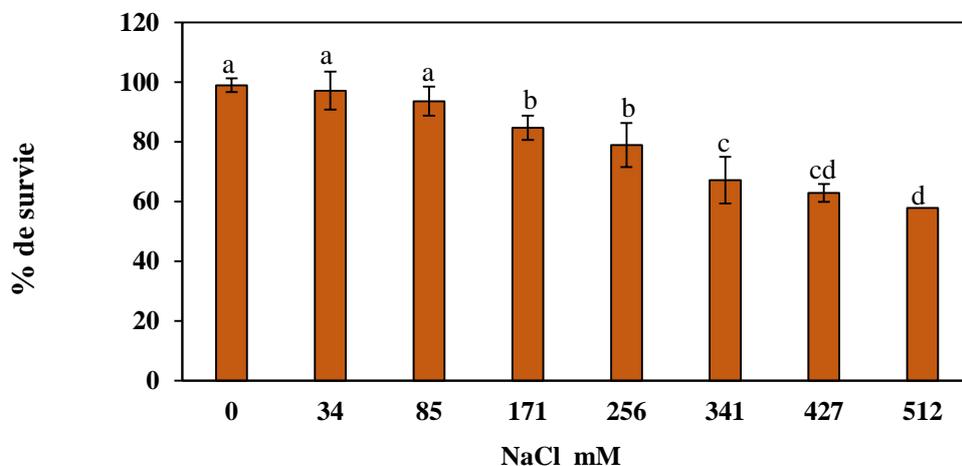
#### 2. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques physiologiques

Des changements physiologiques ont été révélés chez les jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* soumises au stress salin.

##### 2. 1. 1. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de survie

Après 6 semaines sous stress salin, le taux de survie (%) diminue avec l'augmentation des concentrations en NaCl (figure III. 34). Le taux le plus élevé est enregistré chez le témoin ( $98,961 \pm 1,674 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) et aux 34 et 85 mM NaCl ( $97,128 \pm 2,319$  et  $93,608 \pm 6,362 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement). Aux fortes concentrations (341, 427 et 512 mM NaCl) ce pourcentage est de ( $67,149 \pm 7,343$  ;  $62,869 \pm 7,78$  et  $57,799 \pm 2,972 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$  respectivement).

Le tableau de l'analyse de variance montre qu'il y a une action très hautement significative du facteur sel sur le % de survie des jeunes plantules (Annexe 28).

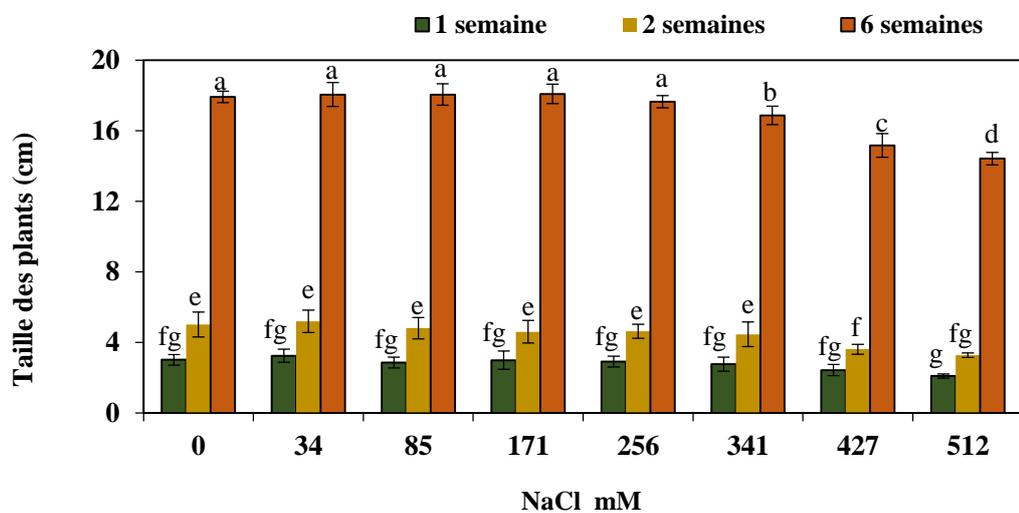


**Figure III. 34 :** Taux de survie chez les jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 6$ ).

### 2. 1. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la taille des plants

Après deux semaines et six semaines du traitement salin, la taille des plants diminue ( $3,286 \pm 0,126$  ;  $14,417 \pm 0,36$  cm respectivement) à la forte concentration en NaCl (512 mM) comparée au témoin ( $5,013 \pm 0,706$  ;  $17,917 \pm 0,319$  cm respectivement). Des valeurs constantes de la taille des plants sont enregistrées aux concentrations en NaCl (34, 85, 171, et 256 mM NaCl) à travers le temps (figure III. 35).

Le facteur sel induit une action très hautement significative sur la taille des plantules (voir le tableau de l'analyse de la variance annexe 29).



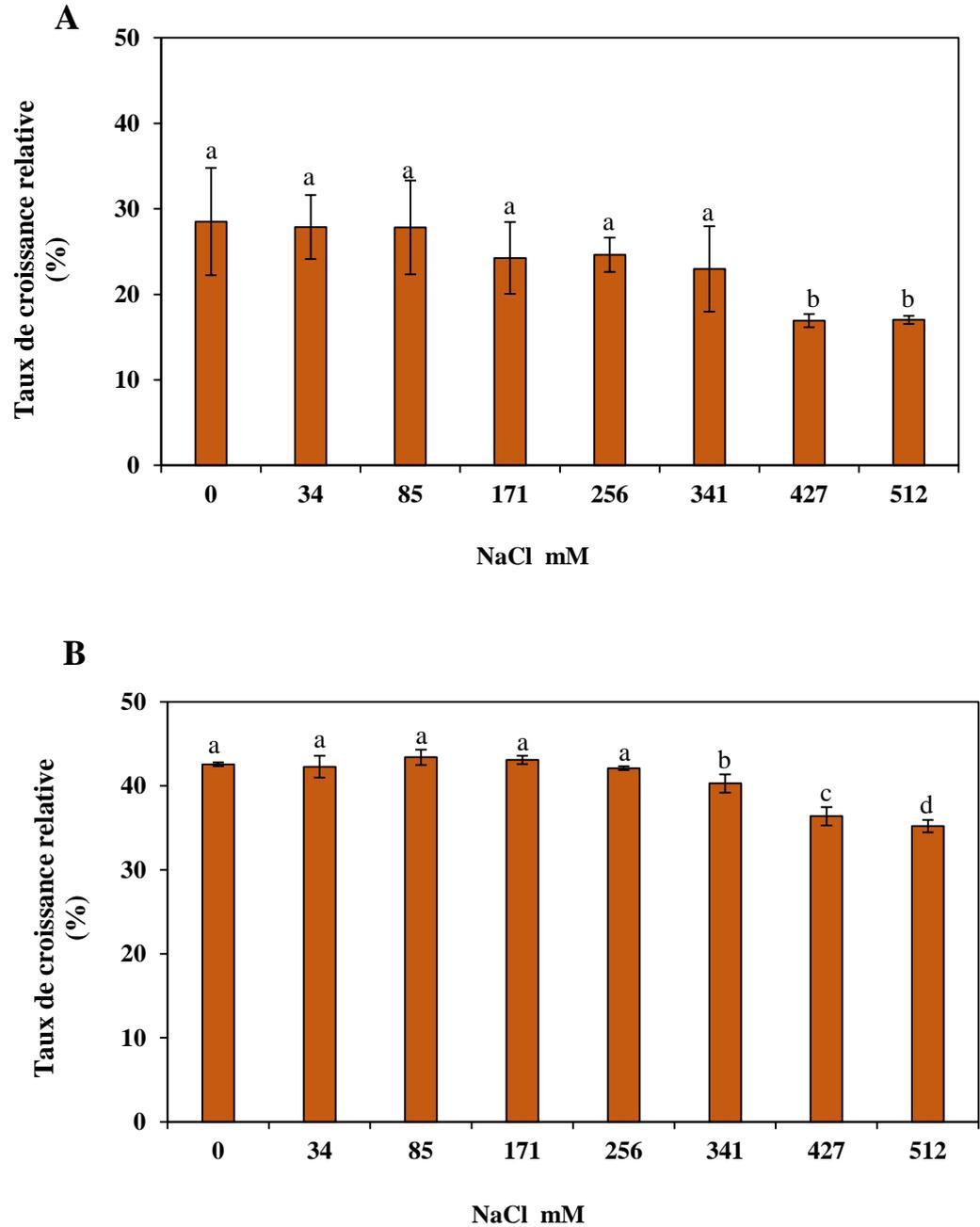
**Figure III. 35 :** Taille des jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 6$ ).

### 2. 1. 1. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de croissance relative

Le taux de croissance relative (TCR) (2 semaines comparées à une semaine) diminue aux fortes concentrations en NaCl (427 et 512 mM) dont les valeurs enregistrées sont les suivantes ( $16,921 \pm 0,777$  et  $17,023 \pm 0,481$  % respectivement). Mais ce taux reste constant chez le témoin ( $28,507 \pm 6,266$  %) et les plantules soumises aux concentrations en NaCl allant de 34 et 85 mM NaCl ( $27,876 \pm 3,742$  et  $27,828 \pm 5,48$  % respectivement) (figure III. 36 A). Le RGR (6 semaines comparées à 1 semaine) est représenté par des valeurs constantes chez les jeunes plantules stressées par le NaCl (34,

85, 171 et 256 mM NaCl) (figure III. 37 B). Ces valeurs sont les suivantes :  $(42,284 \pm 1,308$  ;  $43,401 \pm 0,905$  ;  $43,107 \pm 0,503$  ;  $42,104 \pm 0,241$  % respectivement).

L'analyse de la variance du facteur sel révèle une action très hautement significative sur le taux de croissance relative (TCR) (Annexe 30 et 31).

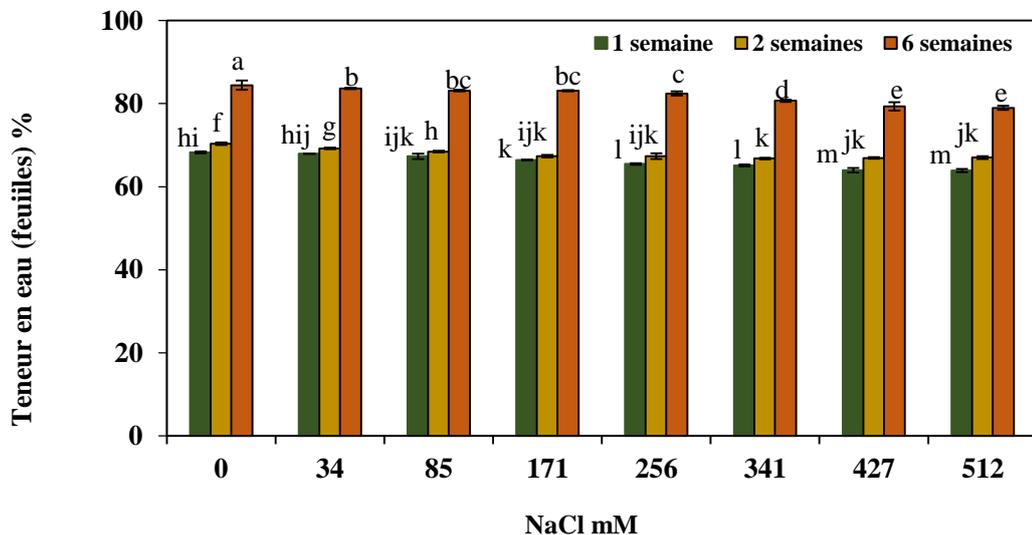


**Figure III. 36 :** Taux de croissance relative de jeunes plantules de l'espèce *Crithmum maritimum* (2 semaines comparées à une semaine) (A) et (6 semaines comparées à 1 semaine) (B). Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 6$ ).

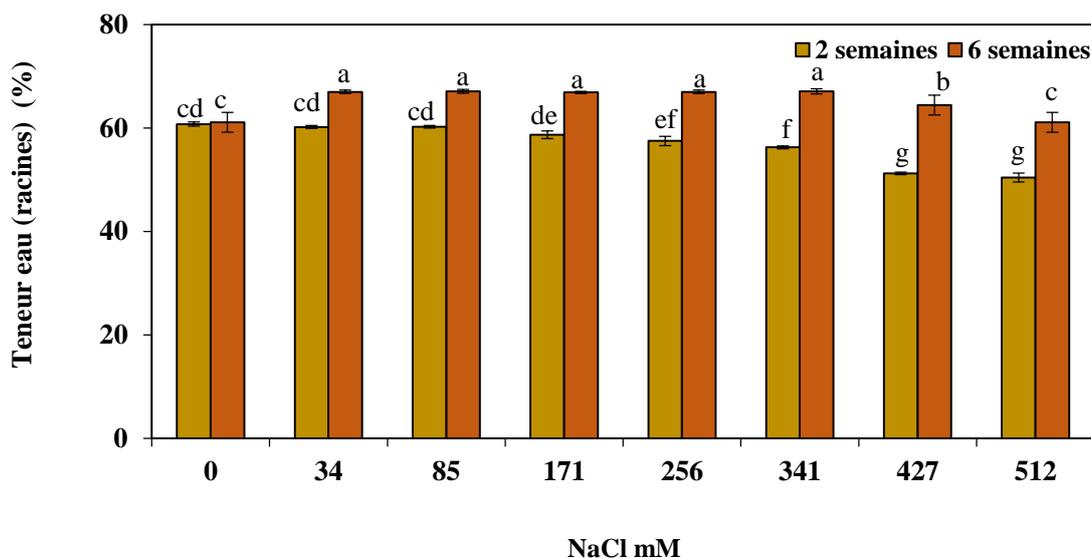
#### 2. 1. 1. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en eau

Une sorte de plateau est enregistré concernant la teneur en eau au niveau des feuilles après une semaine et deux semaines sous stress salin. Les plantules soumises aux fortes concentrations en NaCl (427 et 512 mM NaCl) montrent une légère diminution de la teneur en eau ( $63,937 \pm 0,537$  % ;  $66,889 \pm 0,358$  % respectivement après une semaine ;  $63,893 \pm 0,192$  % ;  $67 \pm 0,333$  % respectivement après deux semaines sous stress salin respectivement) par rapport aux témoins ( $68,267 \pm 0,252$  % après une semaine ;  $70,333 \pm 0,333$  % après deux semaines). Après six semaines sous l'effet du sel, les plantules stressées accumulent moins d'eau ( $78,985 \pm 0,475$ %) par rapport au témoin ( $84,416 \pm 1,114$  %) à la forte concentration en NaCl 512 mM (figure III. 37). Au niveau des racines, cette teneur relative diminue avec l'augmentation des concentrations en NaCl après deux semaines sous traitement salin. Après six semaines sous l'effet du sel, les plantules stressées accumulent plus d'eau que le témoin ( $61,111 \pm 1,924$  %) et ce pour toute les concentrations en NaCl (figure III. 38).

D'après l'analyse de la variance, le facteur sel agit d'une manière très hautement significative sur la teneur en eau au niveau des feuilles (Annexe 32) et des racines (Annexe 33).



**Figure III. 37 :** Teneur en eau (%) au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum*, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

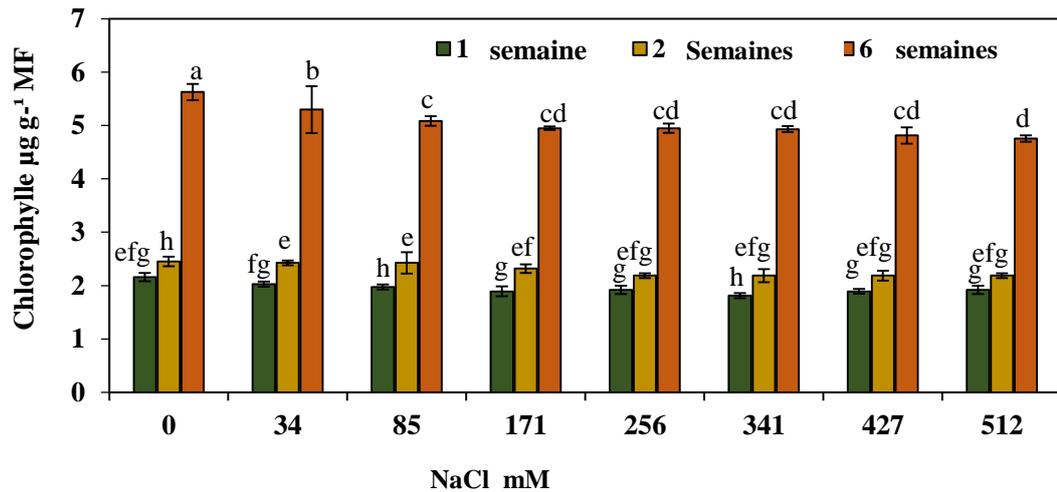


**Figure III. 38 :** Teneur en eau (%) au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après deux et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

### 2. 1. 1. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de chlorophylle

Après une semaine et deux semaines sous traitement salin, le taux de chlorophylle reste plus ou moins constant chez les plantules stressées comparé au témoin ( $2,16 \pm 0,08$  ;  $2,453 \pm 0,092 \mu\text{g g}^{-1}$  MF respectivement) (figure III. 39). Après six semaines sous les conditions salines, le taux de chlorophylle diminue ( $4,756 \pm 0,058 \mu\text{g g}^{-1}$  MF) lorsque les plantules sont soumises à la forte concentration en NaCl (512 mM) par rapport au témoin ( $5,626 \pm 0,153 \mu\text{g g}^{-1}$  MF).

L'analyse de la variance révèle une action hautement significative du traitement salin sur le taux de chlorophylle chez les jeunes plantules stressées (Annexe 34).

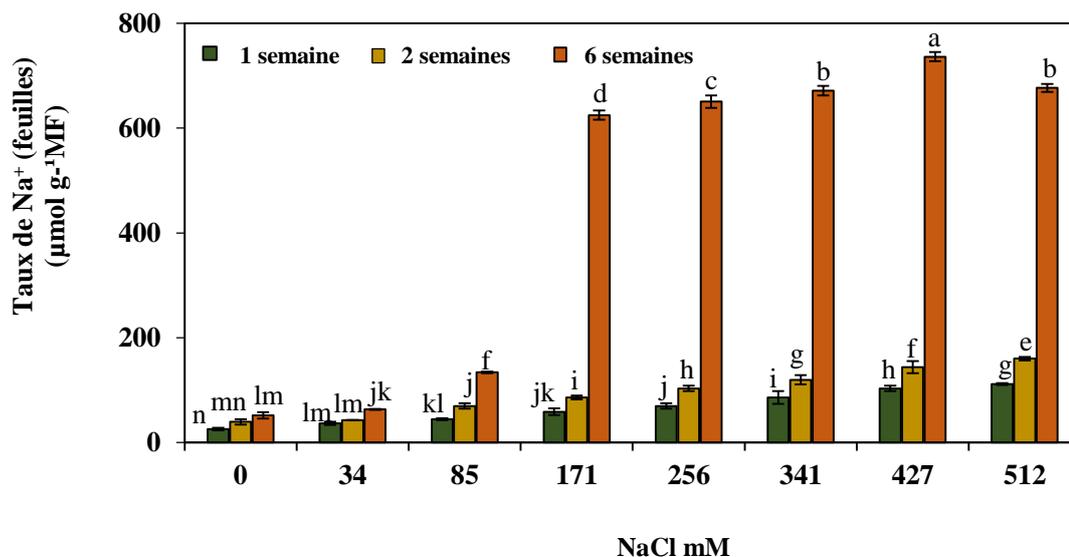


**Figure III. 39 :** Taux de chlorophylle de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

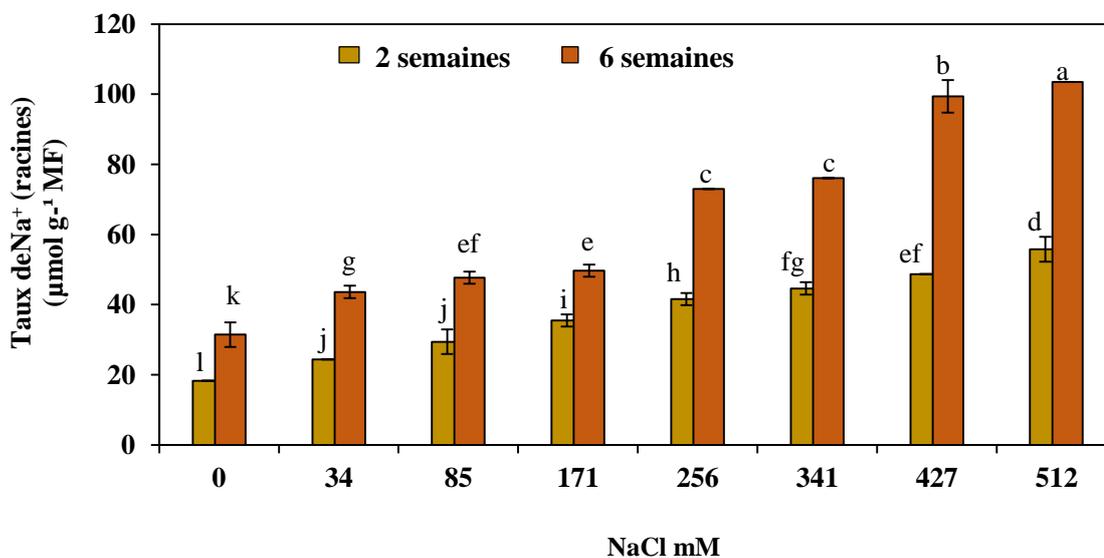
### 2. 1. 1. 6. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de Na<sup>+</sup>

Une relation proportionnelle est enregistrée entre le taux de Na<sup>+</sup> et l'augmentation des concentrations en NaCl au niveau des feuilles et des racines à travers le temps (figure III. 40 et 41 respectivement). Les feuilles accumulent plus de Na<sup>+</sup> après six semaines sous les conditions salines par rapport à la première semaine et la deuxième semaine du traitement salin. Le taux le plus élevé ( $736,296 \pm 8,981 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) est enregistré à la concentration en NaCl 427 mM après six semaines sous l'effet du sel. Les racines accumulent plus de Na<sup>+</sup> après six semaines sous les conditions salines. Les teneurs les plus élevées ( $99,419 \pm 4,649$  ;  $103,477 \pm 0,00 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) sont enregistrées aux concentrations en NaCl de 427 et 512 mM respectivement (figure III. 41).

L'analyse de la variance montre une action très hautement significative de l'effet du sel sur le taux de Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles (Annexe 35) et des racines (Annexe 36).



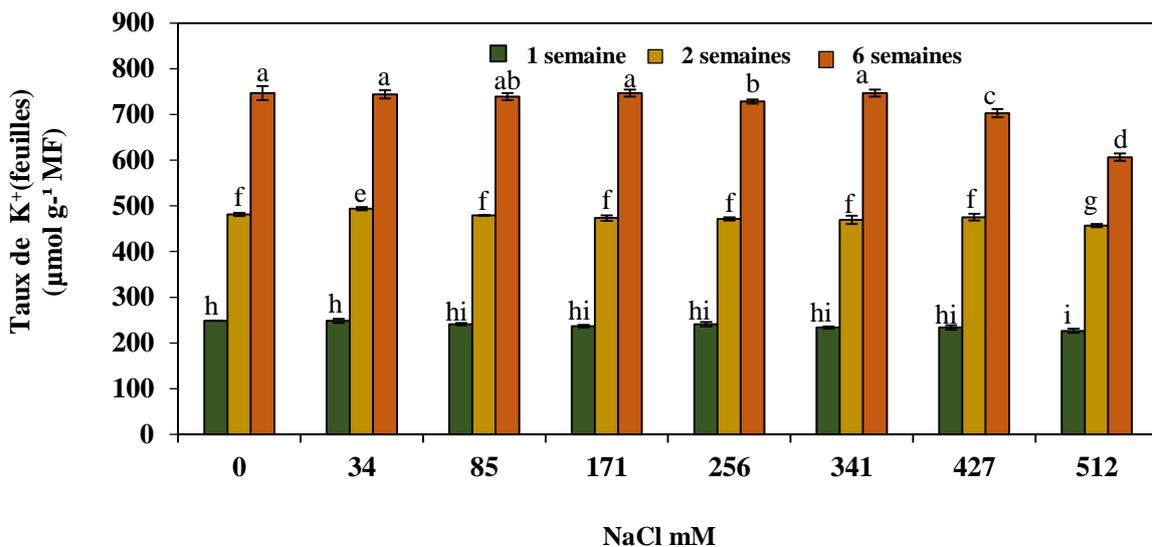
**Figure III. 40 :** Taux de Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de Newman-Keuls (P < 0,05) (n = 3).



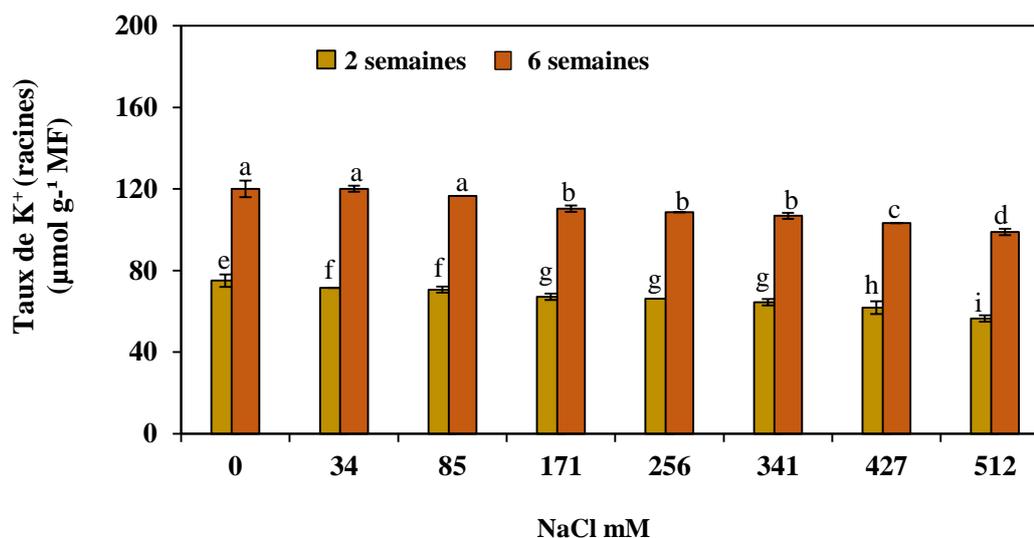
**Figure III. 41 :** Taux de Na<sup>+</sup> au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de Newman-Keuls (P < 0,05) (n = 3).

### 2. 1. 1. 7. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de K<sup>+</sup>

Le taux de K<sup>+</sup> reste constant au niveau des feuilles chez le témoin et les plantules stressées, après une semaine et deux semaines sous l'effet du sel. Après six semaines, ce taux diminue ( $606,667 \pm 7,778 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) à la forte concentration en NaCl (512 mM) par rapport au témoin ( $746,667 \pm 15,556 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) (figure III. 42). Au niveau des racines, le taux de K<sup>+</sup> diminue à travers le temps et les fortes concentrations en NaCl par rapport aux témoins. Les plantules accumulent plus de K<sup>+</sup> après six semaines sous l'effet du stress par rapport aux deux semaines. Après six semaines sous l'effet du sel et comparé au témoin ( $120,112 \pm 4,046 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ), ce taux diminue ( $103,333 \pm 0,00$  ;  $98,917 \pm 1,53 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) aux concentrations salines 427 et 512 mM respectivement (figure III. 43). L'analyse de la variance montre une action très hautement significative du sel sur le taux de K<sup>+</sup> au niveau des feuilles (Annexe 37) et une action significative au niveau des racines (Annexe 38).



**Figure III. 42 :** Taux de K<sup>+</sup> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

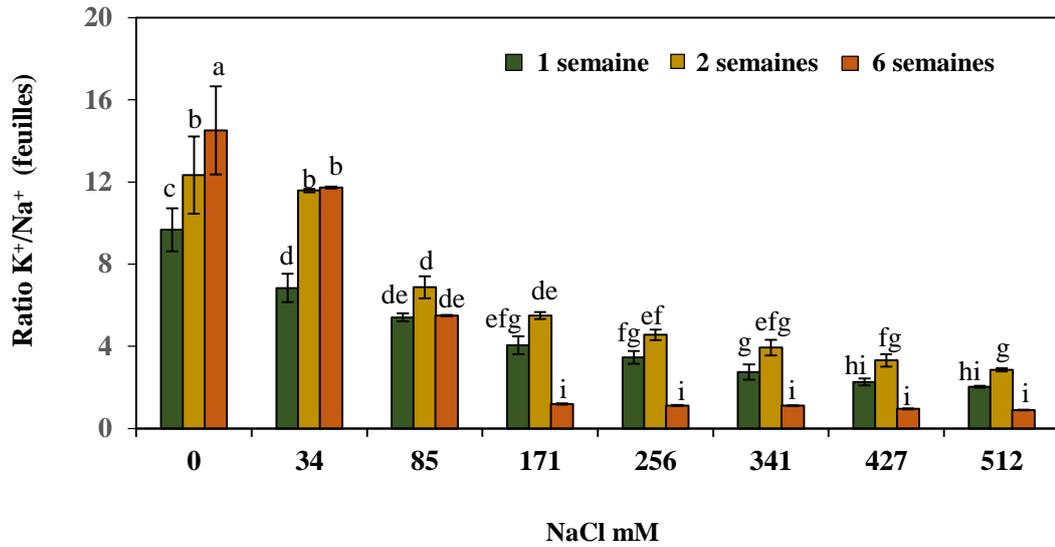


**Figure III. 43 :** Taux de  $K^+$  au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

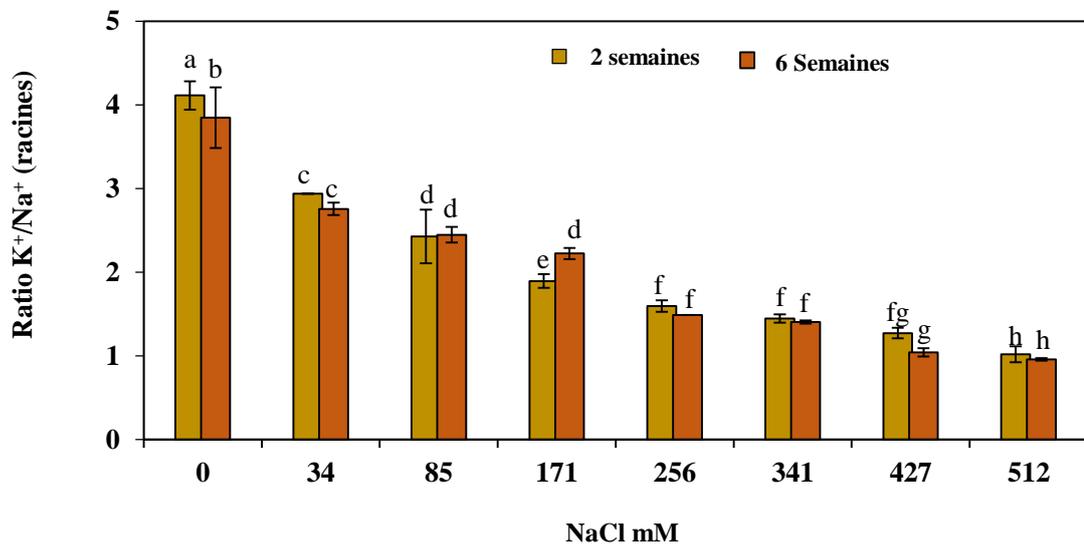
#### 2. 1. 1. 8. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le ratio $K^+/Na^+$

D'après les résultats obtenus, le ratio  $K^+/Na^+$  diminue avec l'augmentation des différentes concentrations en NaCl au niveau des feuilles (figure III. 44) et au niveau des racines (figure 99). Au niveau des feuilles et après une semaine sous stress salin ce rapport est de  $(9,676 \pm 1,047)$  chez le témoin et il est de  $(2,749 \pm 0,38, 2,266 \pm 0,169, 2,031 \pm 0,05)$  à 341, 427 et 512 mM NaCl respectivement. Le même constat est enregistré après deux semaines sous l'effet du sel, le ratio  $K^+/Na^+$  chez les plantules non stressées est de  $(12,334 \pm 1,876)$ , aux fortes concentrations en NaCl (341, 427 et 512 mM) est de :  $3,939 \pm 0,379, 3,316 \pm 0,309, 2,853 \pm 0,075$ . Après six semaines sous les conditions salines et comparé au témoin  $(14,515 \pm 2,145)$ , ce rapport diminue à partir 171 mM NaCl. Au niveau des racines et par rapport au témoin, le ratio  $K^+/Na^+$  diminue après deux semaines et six semaines sous l'effet du NaCl dont le ratio le plus faible est obtenu après six semaines du stress salin  $(0,956 \pm 0,015)$  à 512 mM NaCl (figure III. 45).

L'analyse de la variance, indique qu'il y a un effet très hautement significatif du stress salin sur le ratio au niveau des feuilles (Annexe 39) et une action significative au niveau des racines (Annexe 40).



**Figure III. 44 :** Ratio  $K^+/Na^+$  au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).



**Figure III. 45 :** Ratio  $K^+/Na^+$  au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

## 2. 1. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les caractéristiques

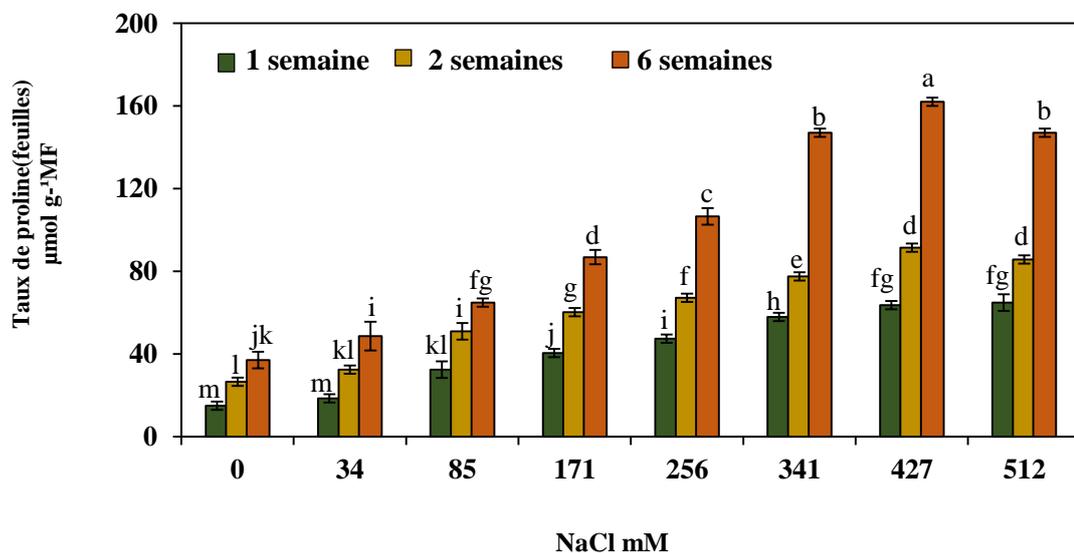
### Biochimiques

Les résultats obtenus concernant l'effet du sel sur les caractéristiques biochimiques montrent que ce facteur induit des modifications dans l'accumulation de la proline, la glycine bêtaïne, l'acide ascorbique et une stimulation de l'activité enzymatique de la catalase chez les jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum*.

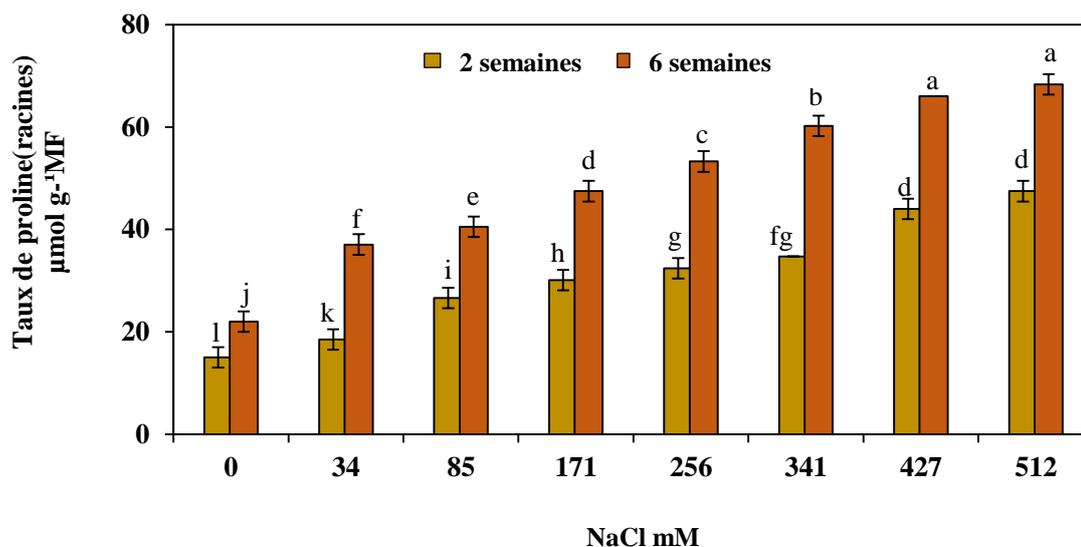
#### 2. 1. 2. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de la proline

L'accumulation de la proline au niveau des feuilles et des racines augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl dans la solution nutritive et à travers le temps. Les feuilles accumulent plus de proline que les racines (figure III. 46 et 47). Au niveau des feuilles, le taux le plus élevé ( $162,136 \pm 2,006 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) est obtenu après six semaines sous l'effet du stress salin à la concentration en NaCl 427 mM. Puis ce taux diminue à 512 mM ( $147,08 \pm 2,00 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ). Les racines accumulent plus de proline après six semaines sous l'effet du sel. Les taux les plus élevés ( $66,012 \pm 0.00$  ;  $68,329 \pm 2$ ) sont obtenus à 427 et 512 mM NaCl respectivement.

L'analyse de la variance révèle une action très hautement significative du NaCl sur l'accumulation de la proline au niveau des feuilles (Annexe 41) et des racines (Annexe 42).



**Figure III. 46 :** Taux de proline au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

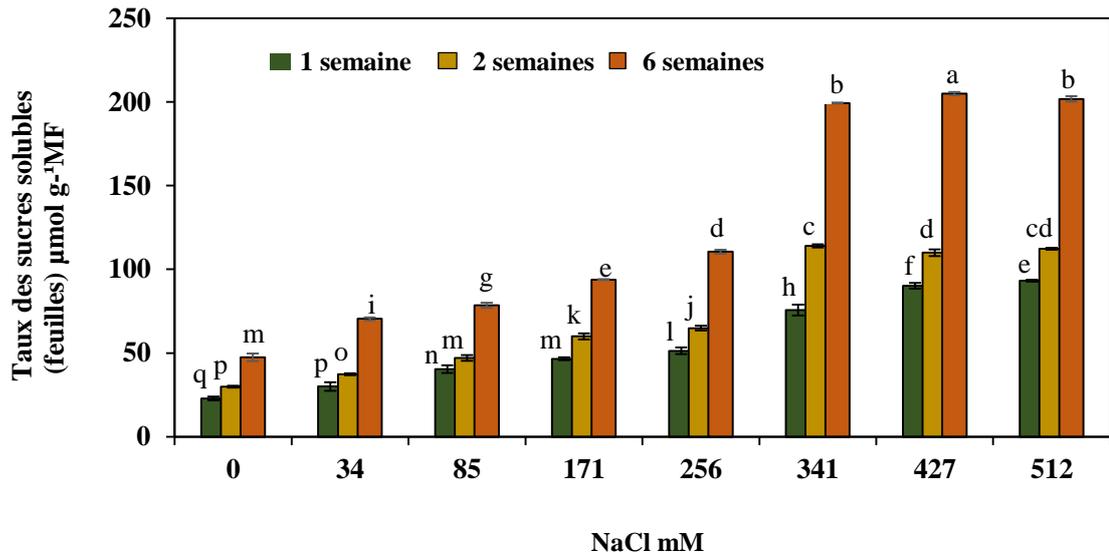


**Figure III. 47 :** Taux de proline au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

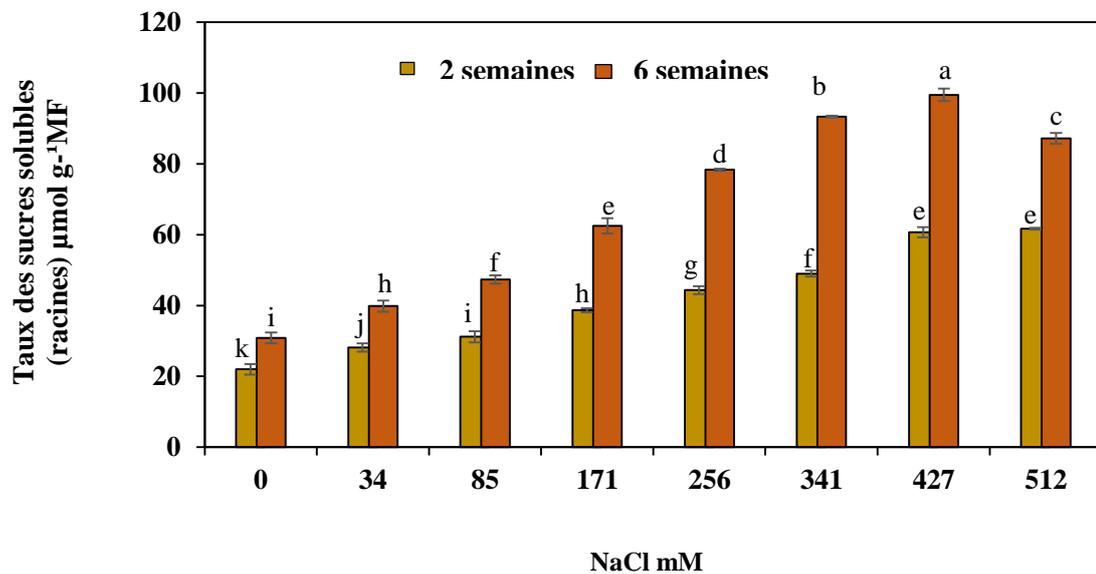
### 2. 1. 2. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux des sucres solubles

Une relation proportionnelle est enregistrée à travers le temps entre le taux des sucres solubles au niveau des feuilles et des racines de jeunes plantules stressées de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* et les différentes concentrations en NaCl. Les feuilles accumulent plus de sucres solubles que les racines à travers le temps. Les taux les plus élevés ( $199,333 \pm 0,289$ ,  $205 \pm 1$ ,  $201,833 \pm 1,607 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) sont obtenus après six semaines sous stress salin aux concentrations en NaCl 341, 427 et 512 mM respectivement (figure III. 48). Au niveau des racines, l'accumulation des sucres solubles atteint son maximum après six semaines sous l'effet du sel à 427 mM NaCl ( $99,5 \pm 1,732 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$ ) (figure III. 49).

Le tableau de l'analyse de la variance montre une action très hautement significative du traitement salin sur le taux des sucres solubles au niveau des feuilles (Annexe 43) et au niveau des racines (Annexe 44).



**Figure III. 48 :** Taux des sucres solubles au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

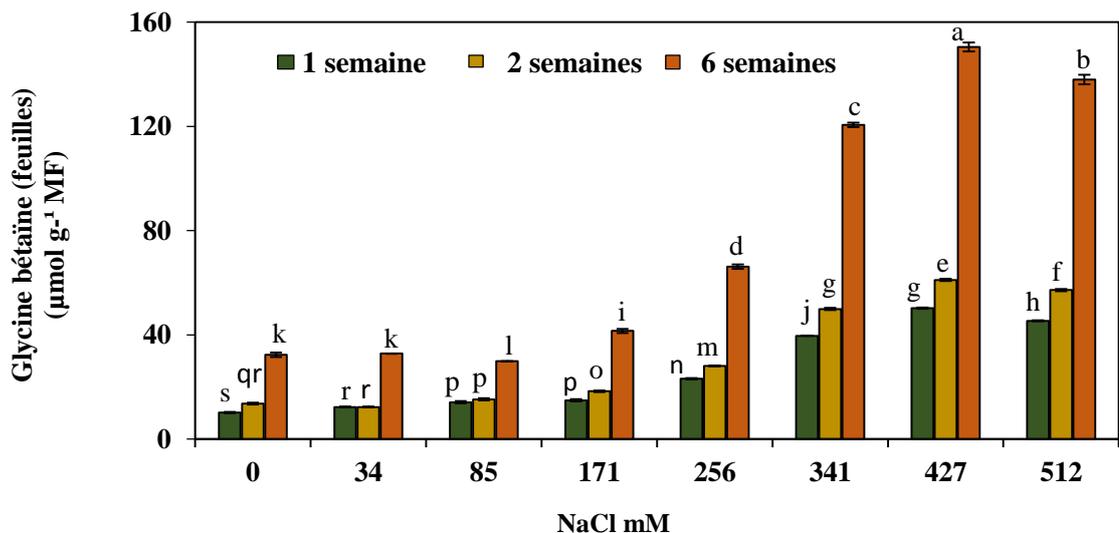


**Figure III. 49 :** Taux des sucres solubles au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

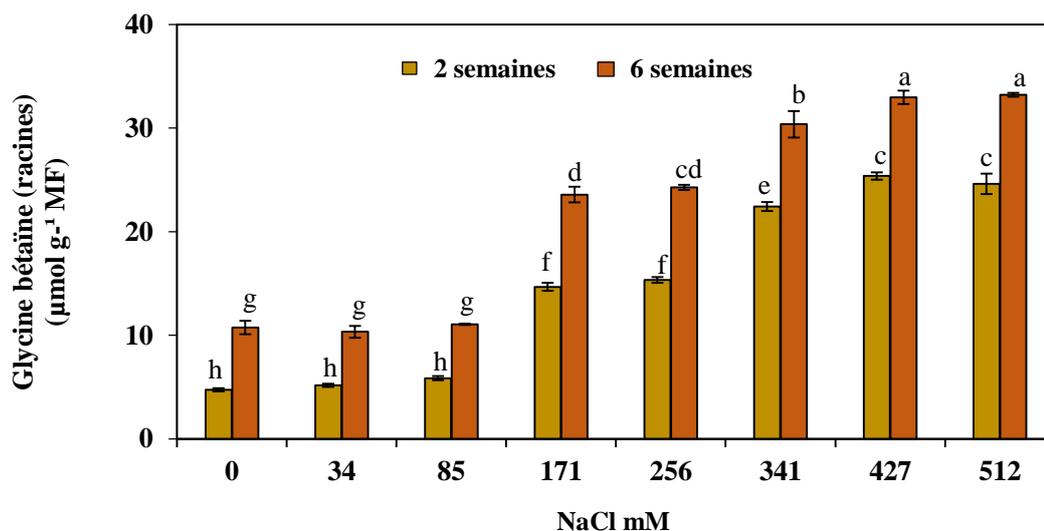
### 2. 1. 2. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en glycine bétaine

Après une semaine et deux semaines sous stress salin, les résultats obtenus montrent une relation proportionnelle entre le taux de la glycine bétaine les différentes concentrations en NaCl au niveau des feuilles (figure III. 50). Dont les teneurs les plus élevées après une semaine sous traitement salin sont obtenues à partir de 341 jusqu'à 512 mM NaCl ( $39,687 \pm 0,11$  ;  $50,253 \pm 0,245$  ;  $45,412 \pm 0,211 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement). Après deux semaines et aux mêmes concentrations en NaCl précitées, les teneurs en cet acide miné sont les suivantes :  $49,97 \pm 0,455$  ;  $61,11 \pm 0,397$  ;  $57,263 \pm 0,43 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF respectivement. Après six semaines sous l'effet du sel, le taux le plus élevé est enregistré chez les plantules stressées à 427 mM NaCl. Le même constat est conclu au niveau des racines. Une relation proportionnelle entre le taux de la glycine bétaine et les différentes concentrations en NaCl est enregistrée et ce après deux semaines et six semaines du traitement salin. Les taux les plus élevés sont obtenus à 341, 427 et 512 mM NaCl respectivement ( $22,429 \pm 0,428$  ;  $25,373 \pm 0,348$  ;  $24,621 \pm 0,979 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF après deux semaines sous stress salin) et ( $30,37 \pm 1,283$  ;  $32,963 \pm 0,641$  ;  $33,221 \pm 0,191 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF après six semaines sous salinité) (figure III. 51).

Ces résultats sont confirmés par l'analyse de la variance. Cette dernière révèle une action très hautement significative du NaCl sur l'accumulation de la glycine bétaine au niveau des feuilles (Annexe 45) et au niveau des racines (Annexe 46).



**Figure III. 50 :** Teneur en glycine bétaine au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

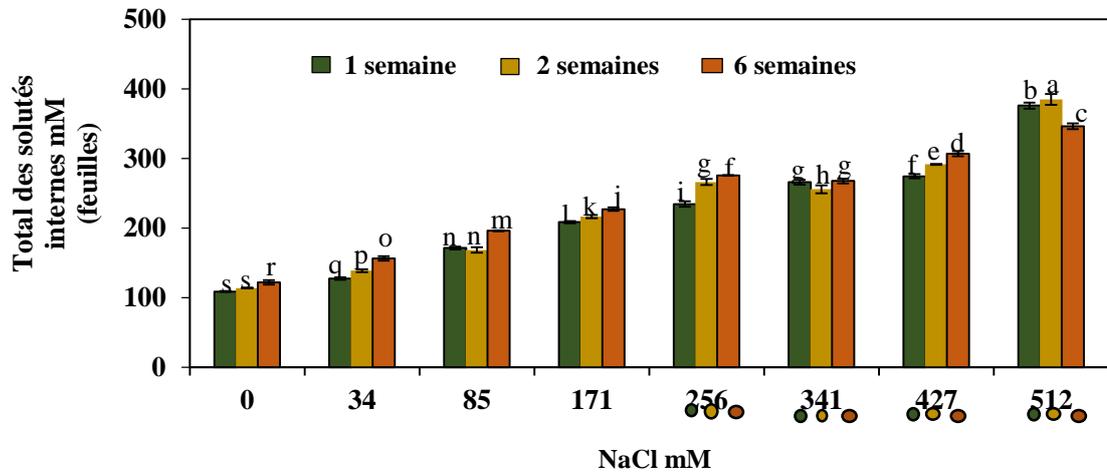


**Figure III. 51 :** Teneur en glycine bétaine au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de Newman-Keuls ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

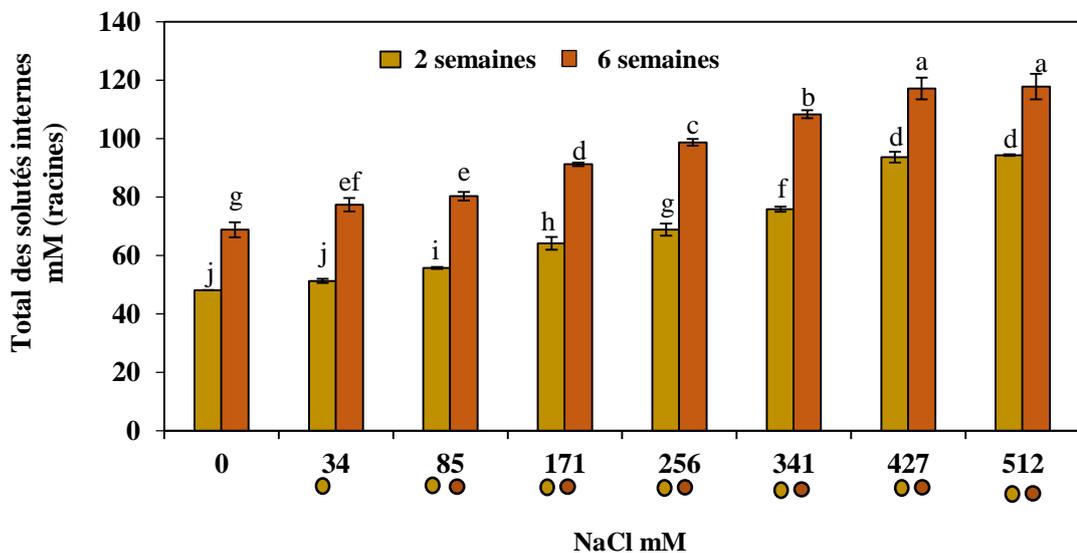
#### 2. 1. 2. 4. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le total des solutés internes

Le total des solutés internes augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl dans la solution nutritive à travers le temps au niveau des feuilles et des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum*. Comparé au témoin ( $108,617 \pm 0,708$  ;  $113,854 \pm 0,708$  ;  $121,874 \pm 3,318$  mM) après une semaine, deux semaines et six semaines du stress salin respectivement, le taux le plus élevé ( $384,695 \pm 7,798$  mM) au niveau des feuilles est enregistré à la concentration en NaCl 512 mM et ce après deux semaines du traitement salin suivi par ( $376,042 \pm 4,278$  mM) obtenu après une semaine sous l'effet du sel. Puis ce taux diminue après six semaines sous les conditions salines pour atteindre  $346,137 \pm 4,112$  mM à 512 mM NaCl (figure III. 52). La figure III. 53 montre qu'il y a une relation proportionnelle entre le total des solutés internes et les différentes concentrations en NaCl de la solution nutritive au niveau des racines. Après deux semaines et six semaines sous les conditions salines, les taux les plus élevés sont enregistrés à 341, 427 et 512 mM NaCl respectivement ( $75,815 \pm 0,903$  ;  $93,663 \pm 1,853$  ;  $94,316 \pm 0,279$  mM après deux semaines du traitement salin) et ( $108,329 \pm 1,332$  ;  $117,153 \pm 3,736$  ;  $117,76 \pm 4,378$  mM après six semaines sous l'effet du sel).

L'analyse de la variance, révèle un effet très hautement significatif du NaCl sur le total des solutés internes au niveau des feuilles (Annexe 47) et des racines (Annexe 48).



**Figure III. 52 :** Total des solutés internes (32,1 mM) au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum*, après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). Les cercles en vert, jaune et en orange indiquent que la concentration interne en soluté est inférieure à la concentration externe après une semaine, deux semaines et six semaines sous traitement salin respectivement.



**Figure III. 53 :** Total des solutés internes (32,1 mM) au niveau des racines de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum*, après deux semaines et six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ). Les cercles en jaune et en orange indiquent que la concentration interne en soluté est inférieure à la concentration externe après deux semaines et six semaines sous traitement salin respectivement.

### 2. 1. 2. 5. Effet des différentes concentrations en NaCl sur les antioxydants

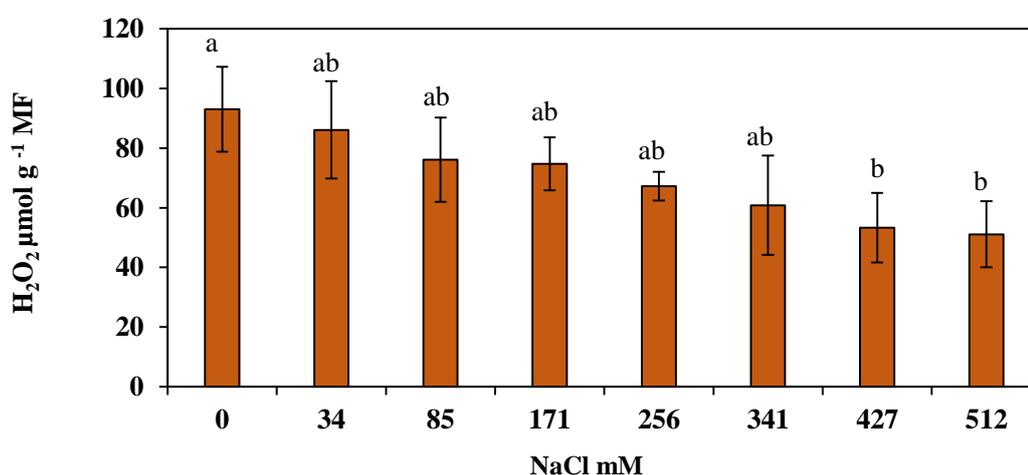
Le stress salin induit des changements dans l'activité enzymatique de la catalase et l'accumulation de l'acide ascorbique dans les tissus foliaires des jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum*.

#### 2. 1. 2. 5. 1. Effet des différentes concentrations en NaCl sur la concentration

##### en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles diminue avec l'augmentation du sel dans le milieu nutritif. Les faibles concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont obtenues à 427 et 512 mM NaCl ( $53,333 \pm 11,667$  et  $51,111 \pm 11,097 \mu\text{mol g}^{-1}$  MF après six semaines du stress salin (figure III. 54).

Suite à l'analyse de la variance, le NaCl a un effet hautement significatif sur la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles (Annexe 49).



**Figure III. 54 :** Concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles de jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

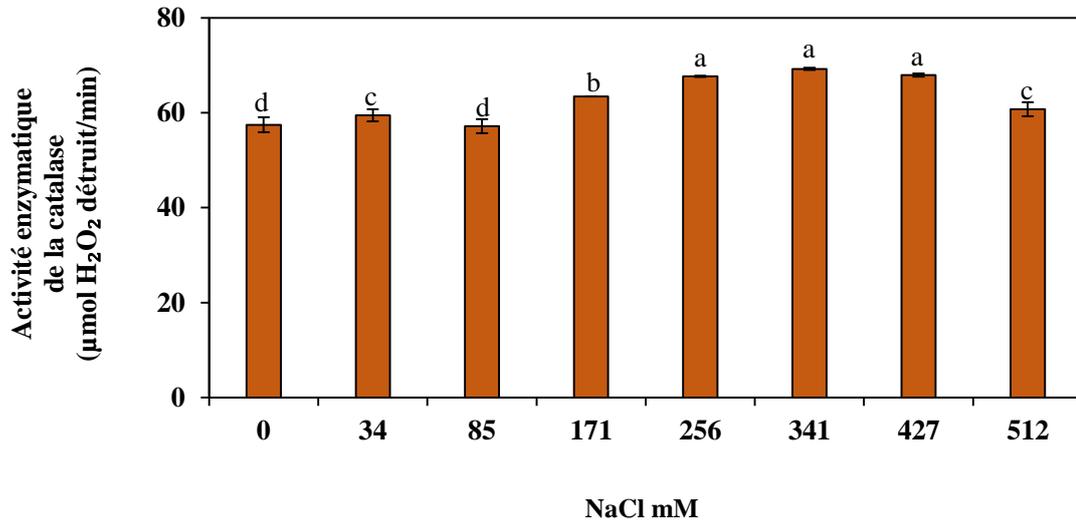
#### 2. 1. 2. 5. 2. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'activité de

##### la catalase

Après six semaines sous stress salin, les résultats obtenus montrent que l'activité de la catalase au niveau des feuilles augmente avec l'augmentation de la concentration en NaCl, jusqu'à 512 mM cette activité diminue. A 256, 341 et 427 mM NaCl l'activité de

cette enzyme atteint son maximum ( $67,681 \pm 0,147$  ;  $69,255 \pm 0,205$  ;  $67,969 \pm 0,333$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  détruit/min) (figure III. 55).

L'analyse de la variance révèle un effet très hautement significatif du facteur sel sur l'activité de la catalase au niveau des feuilles des jeunes plantules stressées (Annexe 50).

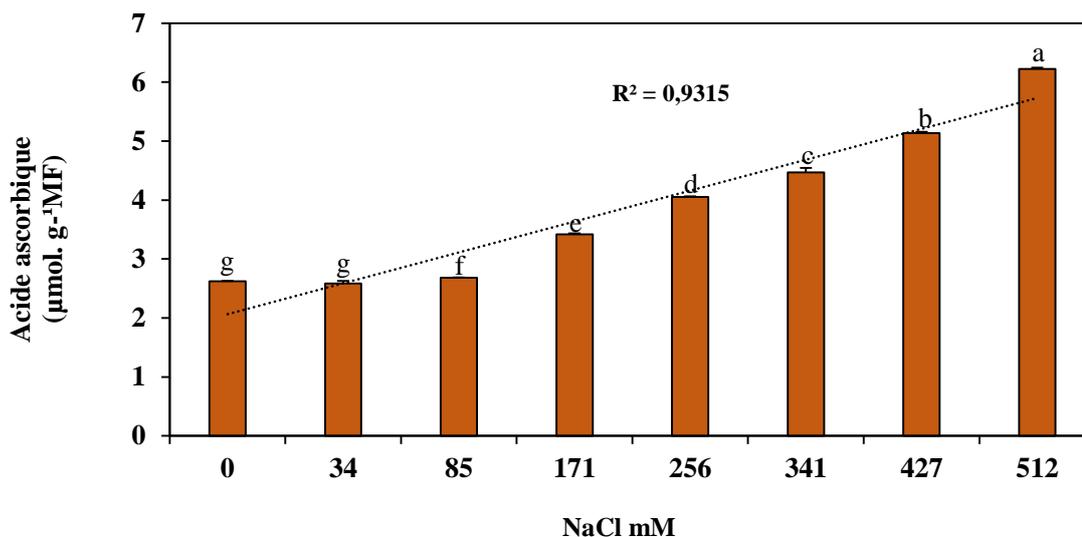


**Figure III. 55 :** Activité de la catalase au niveau des feuilles des jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

### 2. 1. 2. 5. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur le taux de l'acide ascorbique

L'accumulation de l'acide ascorbique au niveau des feuilles augmente avec l'augmentation des différentes concentrations en NaCl (figure III. 56). Le taux le plus élevé ( $6,225 \pm 0,019$   $\mu\text{mol. g}^{-1}\text{MF}$ ) est obtenu à 512 mM NaCl comparé au témoin ( $2,621 \pm 0,008$   $\mu\text{mol. g}^{-1}\text{MF}$ ).

L'analyse de la variance indique qu'il y a une action très hautement significative du sel sur le taux de l'acide ascorbique au niveau des feuilles des jeunes plantules stressées (Annexe 51).



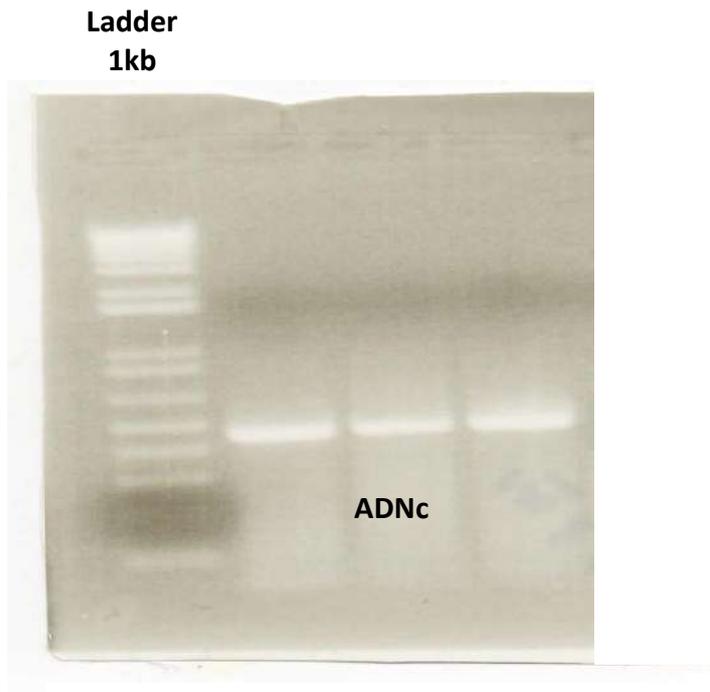
**Figure III. 56 :** Taux d'acide ascorbique au niveau des feuilles des jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après six semaines sous stress salin. Moyenne  $\pm$  écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* ( $P < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

### 2. 1. 3. Etude de l'expression génétique du gène $\text{Na}^+/\text{H}^+$ Antiporteur

L'expression génétique est liée aux conditions environnementales où l'espèce végétale croît. Les jeunes plantules de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* soumises au stress salin pendant six semaines ont manifesté une modification dans l'expression génétique du gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporteur. Avant de présenter les résultats concernant l'expression génétique, il est très important de présenter les résultats du séquençage (gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporteur) de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum*.

#### 2. 1. 3. 1. Résultats obtenus après PCR avec les amorces spécifiques du gène $\text{Na}^+/\text{H}^+$ Antiporteur

La PCR directe avec les amorces spécifique du gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporteur révèle une compatibilité de ces amorces avec l'ADNc de nos échantillons testés (soumises à 256 mM NaCl) de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* (figure III. 57). Cette compatibilité nous a permis de procéder à l'étude de l'expression génétique du gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporteur.



**Figure III. 57 :** Compatibilité des amorces avec les ADNc de nos échantillons choisis (*Crithmum maritimum*)

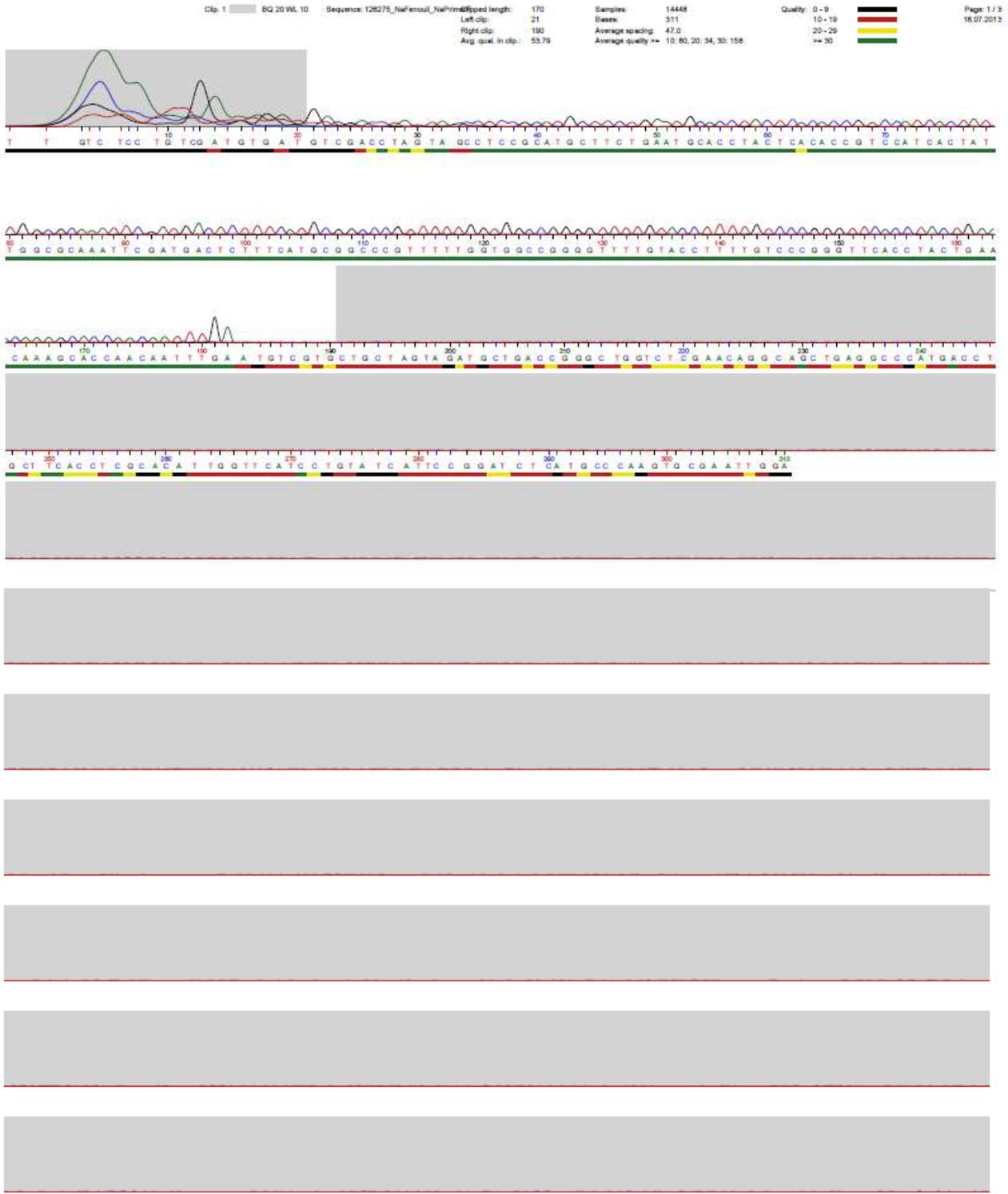
### 2. 1. 3. 2. Résultats de séquençage (gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter)

Le but du séquençage de l'ADN est de déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. La séquence de l'ADN est la suivante :

Fasta sequences :

```
>126275_NaFenouil_NaPrimerF      --      21..190      of      sequence
GTCGACCTAGTAGCCTCCGCATGCTTCTGAATGCACCTACTCACACCGTCCATCACTATT
GGCGCAAATTCGATGACTCTTTCATGCGGCCCGTTTTTGGTGGCCGGGGTTTTGTACCTT
TTGTCCCGGGTTCACCTACTGAACAAAGCACCAACAATTTGAATGTCGTG
```

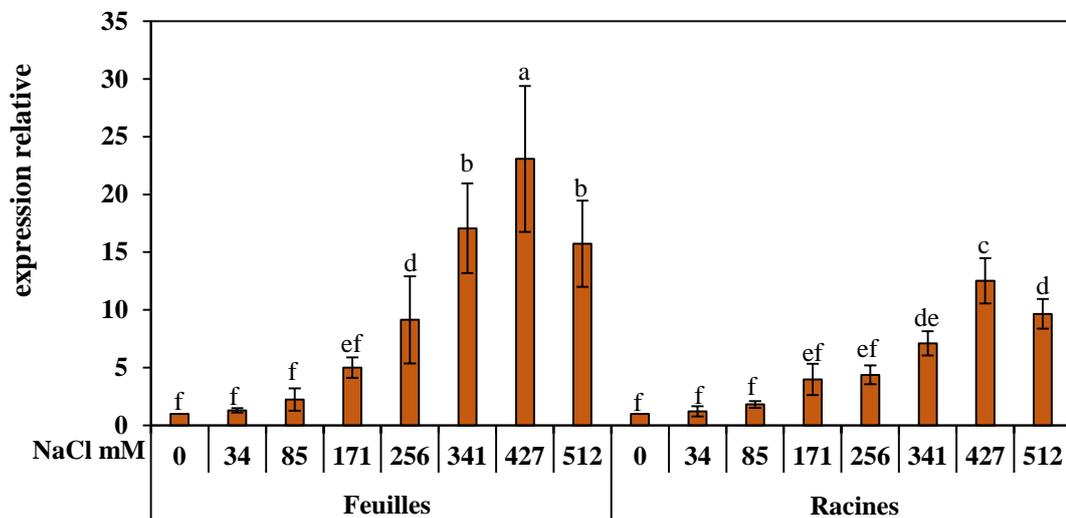
La confirmation de cette séquence est obtenue grâce au séquençage dont les résultats du séquençage (gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter) sont représentés par la figure III. 58. Les résultats sont présentés par la machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, ce qui permet de déterminer l'ordre (la séquence) des bases dans l'acide nucléique (ADN). La séquence des couleurs indique la séquence de l'ADN : vert pour A, rouge pour T, bleu pour C et jaune pour G.



**Figure III. 58 :** Séquençage (gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter) après clonage chez *Crithmum maritimum*.

### 2. 1. 3. 3. Effet des différentes concentrations en NaCl sur l'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter

L'expression génétique du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter au niveau des feuilles et des racines augmente avec l'augmentation des différentes concentrations en NaCl. Cette expression atteint son maximum (23,074 ± 6,325) à 427 mM NaCl au niveau des feuilles (figure III. 59). Le même constat est observé pour les racines, l'expression relative de ce gène atteint son maximum (12,532 ± 1,964) à 427 mM NaCl (figure III. 60). L'analyse de la variance montre une action très hautement significative du stress salin sur l'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter au niveau des feuilles (Annexe 52) et au niveau des racines (Annexe 53).



**Figure III. 59** : Expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter au niveau des feuilles et des racines de l'espèce halophyte *Crithmum maritimum* après six semaines sous stress salin. Moyenne ± écart-type ; différentes lettres au-dessus des barres indiquent les différences significatives sur la base d'un test de *Newman-Keuls* (P <0,05) (n =6).

## 2. 2. Discussion

Les plantes halophytes sont naturellement adaptées aux conditions de salinité élevée dans le sol et / ou l'atmosphère (Vicente et *al.*, 2004). Elles constituent un excellent modèle pour étudier les différents mécanismes de réponse des plantes au stress salin afin d'améliorer la tolérance au sel (Zhu, 2001). *Crithmum maritimum* est l'une de ces plantes halophytes qui se développe sur les rives rocheuses de la mer Méditerranée et de l'océan Atlantique (Ciccarelli et *al.*, 2015). L'étude des mécanismes de la tolérance de cette espèce halophyte au stress salin durant ce présent travail révèle des changements et des signes de résistance de cette plante à la phase juvénile à la salinité. Les jeunes plantules de fenouil marin exposées à une longue durée de salinité, montrent un % de survie  $\geq$  à 60% aux fortes concentrations en NaCl 427 et 512 mM NaCl. Ce taux de survie peut être considéré comme un bon signe de résistance de cette espèce à la salinité élevée, ce qui nous permet de connaître les limites de tolérance de cette espèce au stress salin. La croissance des plants après une semaine, deux semaines et six semaines sous l'effet du stress salin semble ne pas être trop affectée par les fortes concentrations en NaCl dont les jeunes plantules continuent de croître avec succès. De même pour le taux de croissance relative, une légère diminution de ce dernier est enregistrée chez les plantules stressées sous fortes concentrations en NaCl à travers le temps. Cette habilité de cette espèce à maintenir une bonne croissance à travers le temps et aux fortes concentrations en NaCl peut être due à sa naturelle provenance du littoral où elle est exposée aux embruns marins. Nos résultats sont identiques à ceux obtenus par Ben Hamed et *al.* (2008) dont la croissance relative des jeunes plantules de *Crithmum maritimum* (originaire de la Tunisie) soumises au stress salin reste presque constante aux concentrations en NaCl de 100 à 400 mM. Puis elle diminue aux très fortes concentrations en NaCl (600, 800 et 1000 mM). Par contre, les résultats obtenus par Debez et *al.* (2003) montrent que les deux espèces *Cakile maritima* et *Crithmum maritimum* d'origine tunisienne (Korbous et Raoued respectivement), sont capables de produire de la biomasse sous traitement salin mais avec une diminution progressive de la croissance avec l'augmentation des concentrations en NaCl dans le milieu (300 mM). Ben Fattoum et *al.* (2016) indique que le *Crithmum maritimum* (originaire du sud Est de Tunis d'une région semi-aride Korbous) lorsqu'il est exposé en permanence à la salinité (15 jours), des diminutions significatives dans la matière fraîche et sèche au niveau des feuilles et des racines sont enregistrées à partir 200 mM NaCl. Une très légère diminution de la teneur en eau au niveau des feuilles et des racines des jeunes plantules stressées à travers les différentes concentrations en NaCl et

à travers le temps a été enregistrée durant notre étude. Cette capacité de maintenir la teneur en eau supérieure à 60% pour les feuilles et supérieure à 55% au niveau des racines est due à la succulence de cette halophyte *C.maritimum* dont elle a habilité d'emmagasiner l'eau dans des conditions de sécheresse ou salinité (Ben Hamed et al., 2008). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Ben Amor et al. (2005). Ces derniers signalent que la teneur en eau au niveau des racines de l'halophyte *Crithmum maritimu* (originaire de Tabarka : 160 km north of Tunisia) est progressivement réduite par le sel (72% à 200 mM de NaCl), contrairement aux jeunes pousses, cette teneur est restée presque similaire aux valeurs du témoin. Ben Fattoum et al. (2016) indiquent que la salinité n'a aucun effet significatif sur la teneur en eau des feuille et des racines du *Crithmum maritimum* (originaire du sud est de Tunis d'une région semi-aride Korbous) lorsque cette dernière est exposée à des concentrations saline de NaCl 100, 200 et 300 mM.

Cette habilité de croître dans des concentrations salines élevées avec succès s'est répercutée positivement sur la bonne conduite de la photosynthèse de nos jeunes plantules soumises au stress salin. En effet, le taux de chlorophylle total reste plus ou moins stable à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl. Comparé aux autres plantes halophytes, le taux de chlorophylle total chez l'espèce halophyte *Sesuvium portulacastrum* est significativement amélioré chez les plantes soumises aux concentrations en NaCl suivantes : 100, 200, 300, 400 and 500 mM (Muchate et al., 2016). Chez l'halophyte *Salvadora persica*, le taux de chlorophylle est nettement amélioré à 750 mM NaCl comparé au témoin et aux autres concentrations salines 250, 500 et 1000 mM (Rangani et al ., 2016).

La tolérance au sel et à la sécheresse de *C. maritimum* dépend de son pouvoir d'accumuler des niveaux élevés d'ions dans les tissus (c'est-à-dire le parenchyme d'eau dans les feuilles) pour assurer l'ajustement osmotique (Ben Amor et al. 2005). *Crithmum maritimum* est une halophyte accumulateur de Na<sup>+</sup> (Ben Hamed et al., 2004, Ben Amor et al., 2005). Les résultats obtenus montrent qu'il y a une augmentation dans l'accumulation de Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles et des racines à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl. Ces résultats rejoignent ceux obtenus par Ben Amor et al. (2005). L'application du NaCl (50 et 200 mM) par ces derniers sur les jeunes plantules de l'halophyte *Crithmum maritimum* (originaire de Tabarka à 160 km nord de la Tunisie) a induit une accumulation plus importante de Na<sup>+</sup> au niveau des tissus foliaires

par rapport aux racines. Les résultats obtenus par Ben Fattoum et *al.* (2016) sur l'effet du stress salin sur *Crithmum maritimum* (originaire du sud est de Tunis d'une région semi-aride Korbous) montrent que les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sont significativement et progressivement accumulés au niveau des feuilles et des racines avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu (100, 200 et 300 mM). Une autre étude menée par Ben hamed et *al.* (2008) sur la réponse de deux halophytes *Batis maritima* et *Crithmum maritimum* au stress salin, montre qu'il y a augmentation de la teneur en  $\text{Na}^+$  au niveau de jeunes pousses des deux espèces étudiées soumises au traitement salin. Comparé à une autre halophyte, Kant et *al.* (2006) indique que l'accumulation de  $\text{Na}^+$  au niveau de jeunes pousses de l'espèce halophyte *Thellungiella halophila* augmente avec les fortes concentrations en NaCl (500 et 750 mM). Chez l'espèce halophyte *Sesuvium portulacastrum*, les résultats obtenus par Muchate et *al.* (2016) montrent qu'il y a une différence significative de la teneur en ion  $\text{Na}^+$  au niveau des feuilles des plantules non stressées et des plantules soumises aux différentes concentrations de sel (100, 200, 300, 400 and 500 mM NaCl).

La bonne sélectivité de  $\text{K}^+$  est un facteur très important de la tolérance des plantes au stress salin (Autores, 2013). Comparé au témoin et après une semaine et deux semaines sous les conditions salines, le taux de  $\text{K}^+$  accumulé au niveau des feuilles de nos plantules stressées reste constant même aux fortes concentrations en NaCl. Après six semaines sous l'effet du stress salin, l'accumulation de  $\text{K}^+$  au niveau des feuilles reste plus ou moins constante chez les plantules stressées (34 - 341 mM NaCl). Ce taux diminue légèrement à 427 et 512 mM NaCl. Même constat est conclu au niveau des racines dont le taux de  $\text{K}^+$  comparé au témoin reste plus ou moins stable à travers le temps et différentes concentrations en NaCl. Vu l'importance de  $\text{K}^+$  dans le déroulement de la photosynthèse, cette bonne sélectivité de  $\text{K}^+$  a permis à nos plantules de protéger l'appareil photosynthétique à travers le temps et de continuer de croître avec succès dans un milieu salin. Contrairement aux résultats obtenus par Ben Fattoum et *al.* (2016) chez *Crithmum maritimum* (originaire du sud est de Tunis d'une région semi-aride Korbous), l'accumulation de  $\text{K}^+$  au niveau des feuilles et des racines est accompagnée d'une baisse progressive de cet ion à 100, 200 et 300 mM NaCl. Ben Hamed et *al.* (2004) indiquent que l'application des traitements de NaCl (100, 200 et 300 mM) sur les plantules de *Crithmum maritimum* (originaire de Korbous Tunisie) provoque une baisse du taux de  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  dans toutes les parties de la plante (feuilles, tiges et racines). Les résultats obtenus par Ben Amor et *al.* (2005) chez *Crithmum maritimum* montrent qu'il y a une bonne

sélectivité de  $K^+$  au niveau des racines et des feuilles dont le taux enregistré au niveau des plantules stressées (200 mM NaCl) reste plus ou moins stable par rapport au témoin au niveau des racines et diminue progressivement au niveau des feuilles. Chez l'espèce halophyte *Sesuvium portulacastrum*, le taux de  $K^+$  au niveau des feuilles diminue à partir de 400 mM NaCl (Muchate et *al.*, 2016)

Cette sélectivité de  $K^+$  enregistrée durant notre étude expérimentale est étroitement liée au ratio  $K^+/Na^+$ . Le maintien d'un taux élevé de  $K^+/Na^+$  est susceptible d'être important pour éviter les effets de la toxicité ionique sous le stress salin (Flowers et *al.*, 2015). Toutes les valeurs enregistrées durant notre étude concernant ce rapport sont supérieures à 1 et ce au niveau des feuilles et des racines, à travers le temps et les différentes concentrations en NaCl. Par contre Ben Amor et *al.* (2005) signalent que le ratio  $K^+/Na^+$  est inférieur au témoin et inférieur à 1 au niveau des pousses et des racines des plantules de *Crithum maritimum* (originaire de Tabarka ; Tunisie) stressées par les concentrations en NaCl 50 et 200 mM.

L'accumulation des osmolytes comprenant la proline, bétaine et les sucres constitue un mécanisme d'adaptation bien connu chez les plantes contre le stress salin (Ashraf et Foolad 2007). Les osmolytes protègent les plants de la salinité par l'ajustement osmotique, par détoxification des espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species (ROS)) et en stabilisant la structure quaternaire des protéines (Dagar et *al.*, 2016).

La proline est accumulée dans les tissus de nombreuses plantes à des niveaux élevés en réponse au stress osmotique et joue un rôle adaptatif pendant le stress osmotique (Ahmad et *al.*, 2013). Chez les halophytes, la proline est l'acide aminé le plus important sous le stress salin (Arora et *al.*, 2017). Alors que les niveaux de proline restent faibles dans des conditions non salines, les plantes stressées par contre montrent une augmentation de la concentration en proline dans ses tissus. L'augmentation du contenu en proline est principalement corrélée positivement au niveau de la tolérance au sel, et les génotypes tolérants au sel montrent généralement des concentrations de proline plus élevées comparées aux génotypes sensibles au sel (Ghoulam et *al.*, 2002). Cette accumulation de la proline est également observée chez nos plantules stressées. Une relation proportionnelle est enregistrée au niveau des feuilles et des racines entre la teneur en proline et les différentes concentrations en NaCl et à travers le temps. Nos résultats sont similaires aux résultats obtenus par Ben Fattoum et *al.* (2016) chez *Crithmum maritimum* (originaire du sud est de Tunis d'une région semi-aride Korbous) dont

l'accumulation de la proline au niveau des feuilles et des racines augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl dans le milieu (100, 200 et 300 mM NaCl). Chez l'halophyte *Sesuvium portulacastrum*, la teneur en proline accumulée au niveau des feuilles est proportionnelle aux différentes concentrations en NaCl (100, 200, 300, 400 et 500 mM) (Muchate et al., 2016). Ce constat est confirmé par l'étude réalisée par Benzarti et al. (2012) sur les plantules de l'halophyte *Atriplex portulacoides* soumises au stress salin (200, 400, 800 et 1000 mM NaCl) pendant 40 jours. La teneur en proline enregistrée chez cette espèce au niveau des feuilles augmente avec l'élévation des concentrations en NaCl dans la solution nutritive. Chez l'halophyte *Atriplex nummularia*, le taux de proline au niveau des feuilles et des racines augmente avec l'élévation des concentrations en NaCl dans le milieu (25, 50, 100 et 150 mM) (Hussin et al., 2013).

Plusieurs études montrent que, dans des conditions de stress salin, les plantes accumulent des glucides non structuraux (saccharose, hexoses et alcools de sucre), mais à des degrés divers chez différentes espèces de plantes (Autores, 2013). Une forte corrélation entre l'accumulation de sucre et la tolérance au stress osmotique est rapportée (Abd-El Baki et al., 2000). Comme pour la proline, les sucres solubles accumulés au niveau des feuilles et des racines chez nos plantules stressées de *Crithmum maritimum* augmente avec l'élévation des concentrations en NaCl dans la solution nutritive et à travers le temps. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Ben Fattoum et al. (2016) chez *Crithmum maritimum* (originaire du sud est de Tunis d'une région semi-aride Korbous). Le taux des sucres solubles au niveau des feuilles et des racines augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl (100, 200 et 300 mM). Chez l'halophyte *Sesuvium portulacastrum*, la teneur en sucres solubles augmente au niveau des feuilles lorsque les concentrations en NaCl dans le milieu sont de 100, 200, 300 mM. Mais à partir de 400 mM NaCl et à 500 mM NaCl, ce taux diminue progressivement (Muchate et al., 2016). Parida et al. (2016) indique que le taux maximal de proline au niveau des feuilles chez l'espèce halophyte *Salvadora persica* est atteint à 750 mM NaCl après 21 jours sous traitement salin.

La glycine bêtaïne est accumulée chez plusieurs espèces halophytes. Elle maintient la balance du potentiel osmotique entre la vacuole et le cytoplasme (Bhargava et Srivastava, 2013). Elle protège les plantes supérieures contre les stress salés / osmotiques non seulement en maintenant l'ajustement osmotique mais aussi en protégeant le complexe photosystème II (PSII) en stabilisant la connexion des protéines complexes

extrinsèques PSII en présence de sel ou à des températures extrêmes (Tuteja et *al.*, 2011). L'accumulation de cet acide aminé augmente avec l'augmentation de la salinité (Khan et *al.*, 2000). L'analyse de cet osmolyte au niveau des feuilles et des racines de nos jeunes plantules de *Crithmum maritimum* soumises aux concentrations croissantes en NaCl montre qu'il y a une relation proportionnelle entre ce composé et ces concentrations en NaCl. Ce taux augmente avec l'augmentation des différentes concentrations en NaCl à travers le temps. Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par Muchate et *al.* (2016) chez l'halophyte *Sesuvium portulacastrum* dont la teneur en glycine bêtaïne au niveau des feuilles atteint son maximum aux fortes concentrations en NaCl (400 et 500 mM). Chez les deux espèces halophytes *Salicornia europaea* et *Suaeda maritima* soumises aux stress salin (85, 170, 340 et 510 mM NaCl) pendant 3 semaines, le taux de glycine bêtaïne augmente avec l'élévation de ces concentrations en NaCl dans le milieu (Moghaieb et *al.*, 2004).

Après une semaine, deux semaines et six semaines sous stress salin, la comparaison de la concentration totale des solutés internes avec la concentration de soluté externe montre qu'au niveau des feuilles des plantules stressées, l'ajustement osmotique des feuilles peut se produire à 34, 85 et 171 mM NaCl lorsque les solutés nutritifs 32.1 mM sont inclus dans les calculs. Par contre au niveau des racines, l'ajustement osmotique ne semble pas se produire à aucune concentration en NaCl sauf après deux semaines sous traitement salin et à 34 mM NaCl, l'ajustement osmotique a eu lieu. Notant ainsi que le calcul ici doit être interprété avec prudence et peut être une sous-estimation significative. Bien que la concentration de plusieurs des osmolytes organiques majeurs normalement considérés comme importants pour l'ajustement osmotique (proline, sucres solubles et glycine bêtaïne) ainsi que  $K^+$  (Singh et *al.*, 2015) ont été inclus durant nos calculs. D'autres solutés cellulaires tels que d'autres acides aminés et les ions contribueront à la concentration interne de soluté peuvent donc modifier le seuil.

Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) est l'espèce d'oxygène radical le plus stable. Par conséquent, la décomposition de  $H_2O_2$  est essentielle dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs (Vasil, 2013). Les antioxydants jouent un rôle important dans la protection des halophytes contre les ROS (espèces réactives de l'oxygène), empêchant ainsi la peroxydation lipidique pendant le stress salin. Il s'agit donc d'un mécanisme de défense adaptatif contre le stress salin chez les halophytes (Jain et Gupta, 2013). Mansour (1998) signale que la réduction des lésions de la membrane des tissus

foliaires sous stress salin pourrait s'expliquer par une réduction des concentrations en  $H_2O_2$ . La diminution de la concentration en  $H_2O_2$  au niveau des feuilles après six semaines sous traitement salin durant l'étude expérimentale est due à l'intervention des antioxydants dans la décomposition de ce dernier. L'acide ascorbique est considéré comme un antioxydant non enzymatique intervenant dans la réduction du  $H_2O_2$  dans la cellule. En effet cette réduction du  $H_2O_2$  au niveau des feuilles des plantules stressées a été accompagnée d'une accumulation de l'acide ascorbique et l'augmentation de l'activité enzymatique de la catalase. Cette activité atteint son maximum aux concentrations en NaCl (256-427 mM NaCl). Contrairement aux résultats obtenus par Ben Hamed et al. (2007) chez *Crithmum maritimum* (originaire de la Tunisie (Korbous)), la concentration en  $H_2O_2$  au niveau des feuilles et des racines augmente avec la forte concentration en NaCl (300 mM). Cette augmentation est accompagnée par la diminution de l'activité enzymatique. Selon ces auteurs, cette diminution de l'activité enzymatique peut être liée aux conditions sévères de la salinité. Chez l'halophyte *Limonium delicatulum*, l'activité enzymatique de la catalase au niveau des feuilles augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl (400 et 500 mM) et ce après deux mois sous traitement salin (Souid et al., 2016).

La physiologie et la biochimie de la tolérance au sel chez les halophytes sont contrôlées par un grand nombre de gènes. Parmi ces gènes (Packham et Willis, 1997), le gène étudié dans notre cas est le  $Na^+/H^+$  Antiporter. Ce gène est étroitement lié à la tolérance des plantes à la salinité. L'induction de l'expression génique de ce gène est un indice de tolérance à la salinité des halophytes (Madhava Rao et al., 2006). Les antiporters sont des groupes importants de gènes qui ont un rôle clé dans l'homéostasie ionique chez les plantes. Le  $Na^+/H^+$  Antiporter maintient la concentration appropriée d'ions dans le cytosol, réduisant ainsi la cytotoxicité (Fahmideh et Fooladvand, 2017). Yang et al. (2004) signalent que le  $Na^+/H^+$  Antiporter est une protéine membranaire importante responsable du pompage de  $Na^+$  dans la vacuole pour réduire la toxicité de  $Na^+$  et atténuer les effets néfastes du stress salin. Durant notre étude, l'expression génétique du gène  $Na^+/H^+$  Antiporter au niveau des feuilles et des racines après six semaines sous stress salin, augmente avec l'augmentation des concentrations en NaCl pour atteindre son maximum à 427 mM puis diminue légèrement à 512 mM. Nos résultats rejoignent ceux obtenus par Fahmideh et Fooladvand (2017) chez l'halophyte *Kochia scoparia* soumise au stress salin (100, 200, 300 et 400mM NaCl) dont l'expression du gène  $Na^+/H^+$

Antiporter élevée au niveau des feuilles est une indication de la réponse de cette espèce au traitement salin ce qui conduit à la diminution du taux de  $\text{Na}^+$  contenu dans le cytoplasme et maintenir l'équilibre des concentrations en eau dans la cellule. Chez l'halophyte *Puccinellia tenuiflora*, l'expression génique de l'Antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  atteint son maximum à 150 mM NaCl au niveau des pousses (Zhang et al., 2017). Chez les jeunes plantules de l'halophyte *Nitraria sibirica*, l'expression génique de l'Antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  atteint son maximum à 200 mM NaCl puis diminue à 300 et 400 mM NaCl (Wang et al., 2016).

## CONCLUSION GENERALE

Notre étude menée sur l'effet du stress salin (single step) sur les caractéristiques physiologiques, biochimiques et génétique des jeunes plantules de type halophytes de l'*Atriplex halimus* et *Crithmum maritimum*, nous a permis de conclure les différences de tolérance entre ces deux espèces. La première différence qui peut être enregistrée est liée aux limites de tolérance aux fortes concentrations en NaCl des deux espèces étudiées et ce à partir de l'étude du % de survie. En effet *Crithmum maritimum* présente des limites de tolérance plus large (jusqu'à 521 mM NaCl) que l'*Atriplex halimus* (jusqu'à 256 mM NaCl). Au sein de la même espèce de l'*A. halimus*, la population P2 (littoral) présente un % de survie plus important que la population P1 (steppe). Ce constat peut être dû à la provenance naturelle de la population du littoral de l'*Atriplex halimus* et *C. maritimum* qui est naturellement exposée aux embruns marins. Partant de cette conclusion, l'introduction de la population P2 et l'espèce *C. maritimum* dans les zones où les sols sont marginalisés à cause de la salinité semble plus appropriée.

Les plantes halophytes, face au stress salin peuvent développer plusieurs mécanismes de résistance aux fortes concentrations en NaCl. L'accumulation des ions  $\text{Na}^+$  avec la bonne sélectivité du  $\text{K}^+$  représentent un mécanisme clé de la tolérance à la salinité au stade juvénile chez les deux espèces *A. halimus* et *C. maritimum*. La population P2 (littoral) accumule plus de  $\text{Na}^+$  que la population steppique (P1) avec une bonne sélectivité du  $\text{K}^+$ . De même pour *C. maritimum* qui continue à accumuler le  $\text{Na}^+$  à des concentrations les plus élevées en NaCl tout en assurant la bonne sélectivité de l'ion  $\text{k}^+$ . Grâce à ce mécanisme, les deux espèces halophytes ont pu croître avec succès à travers le temps, tout en accumulant l'eau aux niveaux des feuilles et des racines même aux fortes concentrations en NaCl. Ce succès de développement est lié également à la synthèse des osmoprotecteurs tels que la proline, la glycine bêtaïne et les sucres solubles au niveau des feuilles et des racines à travers le temps chez les deux espèces étudiées. Chez l'*Atriplex halimus*, la population P2 (littoral) accumule plus de proline, de glycines bêtaïnes et des sucres solubles à travers le temps par rapport à la population steppique (P1). Même observation pour *Crithmum maritimum* où les racines et les feuilles accumulent des fortes concentrations en ces osmolytes à travers le temps et les forts traitements en NaCl. Cet ajustement osmotique du aux osmoprotecteurs constitue un grand indice de la tolérance

des jeunes plantules au stress salin. Ces deux mécanismes précités sont contrôlés par des gènes spécifiques. L'étude de l'expression génique chez les deux espèces halophytes, nous a permis de mettre en évidence d'une part le rôle du gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter dans le contrôle de l'accumulation et la circulation du  $\text{Na}^+$  à travers le cytoplasme et la vacuole chez l'*A. halimus* et *C. maritimu* et d'autre part le rôle du gène CMO (Choline mono-oxygénase) dans le contrôle de la synthèse de la glycine bétaine chez l'*A. halimus*. notre étude génétique nous a également permis de mettre en évidence des différences d'expression des deux gènes étudiés entre les deux populations d'*Atriplex halimus* dont la population P2 (littoral) présente une expression plus élevée aux fortes concentrations en NaCl que la population steppique (P1) au niveau des feuilles et des racines après six semaines sous des conditions salines. Le même constat est enregistré chez *C. maritimum* où les jeunes plantules présentent une surexpression génique du gène  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporter plus élevée aux concentrations en NaCl les plus élevées.

Le rôle des antioxydants est primordial dans la lutte contre les ROS (espèces réactives d'oxygène= ERO) ce qui empêche les dégâts causés (perturbation de l'homéostasie rédox conduisant à la peroxydation lipidique et à d'autres dommages cellulaires) par ces derniers. Notre présente étude nous a permis d'illustrer le rôle de ces antioxydants dans la protection des jeunes plantules des deux espèces étudiées contre ces dommages. Chez l'*A. halimus*, la population du littoral (P2) accumule plus d'acide ascorbique que la population steppique (P1) avec une élévation de l'activité de la catalase au niveau des feuilles après six semaines sous stress salin. Chez *C. martimum*, la concentration en acide ascorbique et l'activité enzymatique de la catalase sont très importantes aux forts traitements salins.

L'interaction de tous ces mécanismes précités et leurs rôles dans la tolérance des deux espèces halophytes étudiées à la salinité sont bien clairs. Ce qui nous a permis de conclure que chez l'*Atriplex halimus*, la population P2 (littoral) semble plus tolérante aux fortes concentrations en NaCl que la population steppique (P1) lorsqu'elles soumises brutalement (single step) à la salinité au stade très juvénile. Et si nous comparons l'*Atriplex halimus* avec l'halophyte *Crithmum maritimum*, cette dernière semble plus tolérante aux forts traitements salins. Ce qui lui rend une culture alternative par excellence dans les sols marginalisés dû à la salinité.

Comme perspective, cette présente étude doit être renforcée par l'identification de d'autres gènes liés au stress salin et l'étude de leur expression génique par PCR en temps réel et de mettre en évidence la réussite de la transgénèse de nos gènes étudiés dans d'autres cultures sensibles à la salinité par le biais des plantes modèles tels que le tabac et l'*Arabidopsis*. L'introduction de la population du littoral (P2) de l'*Atriplex halimus* et l'espèce *Crithmum maritimum* auprès de la population steppique (P1) de l'*A. halimus* dans les zones touchées par la salinité constitue une étape très importante dans le futur. Il serait intéressant de poursuivre l'étude in situ, afin d'appréhender la réponse à la salinité et à l'état adulte de ces deux espèces. L'étude de la salinité due aux autres types de sels hors le NaCl ou en interaction avec ce dernier semble également nécessaire dans le futur.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Abd-El Baki G.K., Siefritz F., Man H.M., Weiner H., Kaldenhoff R., Kaiser W. 2000.** Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant Cell Environ* 23, 515-521.

**Abdelly C., Barhoumi Z., Ghanya T., Debez A., Ben Hamed K., Sleimi N., Ouerghi Z., Smaoui A., Huchzermeyer B., Grignon C. 2006.** Potential utilisation of halophytes for the rehabilitation and valorisation of salt-affected areas in Tunisia. *Biosaline Agriculture and Salinity Tolerance in Plants*. Ed. Birkhäuser Verlag/Switzerland, 163-172.

**Abu-Zanat M., Louhaichi M. 2014.** Managing rangelands: promoting sustainable native shrub species. Dryland Systems Solutions Producing More with Less, ICARDA's Rangeland Ecology and Management Unit, 1-2 p.

**Acton Q.A. 2013.** Issues in Genetic Research. Ed. ScholarlyEditions, Atlanta, Georgia, Etats Unis, 85 p.

**Aebi H. 1984.** Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.

**Ahmad P., Azooz M.M., Prasad M.N.V. 2012.** Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 512 p.

**Ahmad R., Malik K.A. 2013.** Prospects for Saline Agriculture. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 460 p.

**Ahmad P., Azooz M.M., Prasad M.N.V. 2013.** Salt Stress in Plants: Signalling, Omics and Adaptations. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 509 p.

**Ahmad P. 2015.** Legumes under environmental stress: Yield, Improvement and Adaptations. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey,  tats-Unis, 328 p.

**Alhasnawi A.N., Kadhimi A.A., Isahak A., Mohamad A., Yusoff W.W., Zain C.M. 2015.** Exogenous application of ascorbic acid ameliorates detrimental effects of salt stress in rice (MRQ74 and MR269) seedlings. *Asian J. Crop Sci* 7, 186-196.

**Almohisen I.A.A. 2015.** Accumulation of antioxidant Enzymes, Proline, and ions in *Atriplex Nummularia* Subsp... seedlings as adaptive mechanisms to salinity. *International Journal Of Scientific Research*, 12, 84- 87.

**Anjum N.A., Gill S.S., Gill R. 2014.** Plant Adaptation to Environmental Change: Significance of Amino Acids and their Derivatives. Ed. CABI, Wallingford, Royaume-Uni, 344p.

**Anonyme 2003.** Recensement general de l'agriculture - 2001. Rapport general des resultats definitifs. Ministere De L'Agriculture Et Du Developpement Rural, 125 p.

**Anonyme 2008.** Les sols salins en algérie. Institut national des sols, de l'irrigation et du drainage, Algérie, 7 p.

**Apse M.P., Aharon G.S., Snedden W.A., Blumwald E. 1999.** Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285, 1256-1258.

**Arora S., Singh A.K., Singh Y.P. 2017.** Bioremediation of Salt Affected Soils : An Indian Perspective. Ed. Springer, Paris, 313 p.

**Arrignon J. 2011.** Lutter contre la désertification : l'espoir agro-écologique. Ed. Harmattan, Paris, 327 p.

**Asard H., Bérczi A., Caubergs R.J. 2013.** Plasma Membrane Redox Systems and their role in Biological Stress and Disease. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 334 p.

**Ashraf M., Foolad MR 2007.** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 59, 206-216.

**Ashraf M., Ozturk M., Ahmad M. S. A. 2010.** Plant Adaptation and Phytoremediation. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 481 p.

**Atia A., Barhoumi Z., Mokded R., Abdelly C., Smaoui A. 2011.** Environmental ecophysiology and economical potential of the halophyte *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *Journal of Medicinal Plants Research* 16, 3564–3571.

**Autores V. 2013.** Improving Crop Resistance to Abiotic Stress: -Omics Approaches. Ed. John Wiley & Sons John Wiley & Sons, New Jersey, États-Unis, 1518 p.

**Azooz M.M., Ahmad P. 2016.** Plant-Environment Interaction: Responses and Approaches to Mitigate Stress. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, États-Unis, 368 p.

**Baize D. 2016.** Petit lexique de pédologie : Nouvelle édition augmentée. Ed. Quae, Versailles, France, 288 p.

**Bajji M., Kinet MJ., Lutts S. 1998.** Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science* 137, 131–142.

**Baker N.R. 2006.** Photosynthesis and the Environment. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 491 p.

**Baker A., Graham I.A. 2013.** Plant Peroxisomes : Biochemistry, Cell Biology and Biotechnological Applications. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 505 p.

- Bassil E., Tajima H., Liang Y.C., Ohto M.A., Ushijima K., Nakano R., Esumi T., Coku A., Belmonte M., Blumwalda E. 2011.** The Arabidopsis Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters NHX1 and NHX2 Control Vacuolar pH and K<sup>+</sup> Homeostasis to Regulate Growth, Flower Development, and Reproduction. *The Plant Cell* 23, 3482–3497.
- Batt C.A. 2014.** Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, États-Unis 3248 p.
- Becker-André M., Hahlbrock K. 1989.** Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATITY) Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATITY). *Nucleic Acids Research* 17, 9437- 9446.
- Becker J.G. 2002.** Behavioral Endocrinology. Ed. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, États-Unis, 776 p.
- Belkheiri O., Mulas A.B. 2013.** The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. *Environmental and Experimental Botany* 86, 17–28.
- Belkhodja B., Bidai Y. 2004.** The response of *Atriplex halimus* L. seeds to salinity at the Stage of germination. *Science Planétaire and Sécheresse* 15, 1-9.
- Belot A., 1978.** Dictionnaire des arbres et arbustes de jardin, Ed. Bordas, Paris, 383p.
- Ben Amor N., Ben Hamed K., Debez A., Grignon C., Abdelly C. 2005.** Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Sci.* 168, 889–899.
- Benblidia M., Thivet G. 2010.** Gestion des ressources en eau : les limites d'une politique de l'offre. Les Notes d'analyse du CIHEAM, Centre international de hautes études Agronomiques Méditerranéennes, 58, 1- 15.
- Ben Fattoum R., Zaghdoud C., Attia A., Ben Khedher A., Gouia H., Haouari C.C. 2016.** Recovery capacity of the edible halophyte *Crithmum maritimum* from temporary salinity in relation to nutrient accumulation and nitrogen metabolism. *Biologia* 12, 1345-1352.
- Ben Hamed K., Debez A., Chibani F., Abdelly C. 2004.** Salt response of *Crithmum maritimum*, an oleagineous halophyte. *Tropical Ecol* 45, 151-159.
- Ben Hamed, K., Castagna, A., Elkahoui, S., Ranieri, A., Abdelly, C. 2007.** Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Reg.* 53, 185-194.
- Ben Hamed H., Ben Ammar D., Zid E. 2008.** Physiology of salt tolerance in *Atriplex halimus* L. *Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance.* 107-114.

- Ben Hassine A., Ghanem ME., Bouzid S, Lutts S. 2008.** An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycinebetaine in response to salinity and water stress. *Journal of Experimental Botany* 59, 1315-1326.
- Ben Hassine A., Ghanem M. E., Bouzid S., Lutts S. 2009.** Abscisic acid has contrasting effects on salt excretion and polyamine concentrations of an inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus*. *Annals of Botany* 104, 925–936.
- Ben Hassine A., Lutts S. 2010.** Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *Journal of Plant Physiology* 17, 1448–1456.
- Benzarti M., Ben Rejeb K., Debez A., Messedi D., Abdelly C., 2012.** Photosynthetic activity and leaf antioxidative responses of *Atriplex portulacoides* subjected to extreme salinity. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 1679–1688.
- Benzarti M., Ben Rejeb K., Messedi D., Ben Mna A., Hessini K., Ksontini M., Abdelly C., Debez A. 2014.** Effect of high salinity on *Atriplex portulacoides*: Growth, leaf water relations and solute accumulation in relation with osmotic adjustment. *South African Journal of Botany* 95, 70–77.
- Bhargava A., Srivastava S. 2013.** Quinoa: Botany, Production and Uses. Ed. CAB eBooks, Oxford, Royaume Uni, 264 p.
- Biswal B., Krupinska K., Biswal U.C. 2013.** Plastid Development in Leaves during Growth and Senescence. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 685 p.
- Boivin P., Le Brusq J.Y. 1985.** Désertification et salinisation des terres eu senegal. Problèmes et remèdes. Séminaire national sur la désertification, Ministère de la protection de la nature, 1-5.
- Bojórquez-Quintal E., Ruiz-Lau N., Velarde-Buendía A., Echevarría-Machado I., Pottosin I., Martínez-Estévez M. 2016.** Natural variation in primary root growth and K<sup>+</sup> retention in pepper roots under salt stress in habanero pepper. *Functional Plant Biology* 12, 1114-1125.
- Borg J., Reebar A. 2004.** Biochimie métabolique. Ed. Ellipes, Paris, France, 1207 p.
- Bouderbala, A.B. 2015.** Contribution des methodes hydrochimiques et Geophysiques A l'Acquisition de la Mineralisation dans les zones cotieres cas de la nappe Alluviale de l'oued nador –Tipaza (Algerie). Thèse de doctorat en sciences hydroiques. Université Hassiba Benbouali de Chlef, 212p.

- Boughalleb F., Denden M., Ben T. 2009.** Anatomical changes induced by increasing NaCl salinity in three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea*. *Acta Physiol Plant* 31, 947–960.
- Boughalleb F., Mhamdi M., Hailaoui H., Denden M. 2010.** Salinity effects on organic solutes and antioxidative enzymes in two halophytes, *Nitraria retusa* (Forssk) and *Atriplex halimus* (L.). *Research Journal of Biological Sciences* 5, 773-784.
- Boughalleb F., Denden M. 2011.** Physiological and Biochemical changes of two halophytes, *Nitraria retusa* (Forssk) and *Atriplex halimus* (L.) under increasing salinity. *Agricultural Journal* 6, 327-339.
- Boulanouar B., Chriyaa A., Boutouba A. 2000.** Moroccan Experience with Fodder shrub, research and development. *Fodder Shrub development in arid and semi-arid zones* 1, 134 - 152.
- Bounhoure J.P., Bui E., Schmitt L. 2012.** Stress, dépression et pathologie cardiovasculaire. Ed. Elsevier Masson, Paris France, 248 p.
- Bowes B.G., James D., Mauseth J.D. 2012.** Structure des plantes. Ed. QuaeVersailles, France, 288 p.
- Branger A. 2012.** Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Ed. Educagri, Dijon, France, 203 p.
- Bresler E.L., McNeal B.L., Carter D.L. 1982.** Saline and Sodic Soils : Principles-Dynamics-Modelling. Ed. SpringerVerlag, Berlin, 236 p.
- Brinis A., Belkhodja M. 2015.** Effet de la salinité sur quelques traits physiologiques et biochimiques chez *Atriplex halimus* L. *Rev. Sci. Technol., Synthèse* 31: 42 -51.
- Brisseau-Mirbel C.F.B., Jolyclerc N.M.T. 2014.** Traité d'anatomie et de physiologie végétale, suivi de la nomenclature méthodique ou raisonnée des parties extérieures des plantes et un exposé succinct des systèmes de botanique les plus généralement adoptés. Ed. National Library of the Netherlands, Pays-Bas, 18 p.
- Brouquisse R., Weigel P., Rhodes D., Yocum C.H., Hanson A.D. 1989.** Evidence for a Ferredoxin-Dependent Choline Monooxygenase from Spinach Chloroplast Stroma. *Plant Physiology* 90, 322-329.
- Brouwer R., Gasparikova O., Kolek J., Loughman B.C. 2012.** Structure and Function of Plant Roots. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 440 p.
- Brown G.W. 2013.** Desert Biology: Special Topics on the Physical and Biological Aspects of Arid Regions. Ed. Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas, 620 p.
- Bustin S.A., Benes A., Nolan T., Pfaffl M.W. 2005.** Quantitative real-time RT-PCR - A perspective. *Journal Molecul Endocrinol* 34,597-601.

- Cabot C., Sibole J.V., Barcelo J., Poschenrieder C. 2014.** Lessons from crop plants struggling with salinity. *Plant Sci* 226, 2–13.
- Cain M.L., Damman H., Lue R.A., Yoon C.K. 2006.** Découvrir la biologie. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, France, 812 p
- Cakmak I. 2005.** The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci* 168, 521–530.
- Carels N., Sujatha M., Bahadur B. 2012.** Jatropha, Challenges for a New Energy Crop : Volume 1: Farming, Economics and Biofuel. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 600 p.
- Capon S., James C., Reid M. 2016.** Vegetation of Australian Riverine Landscapes: Biology, Ecology and Management. Ed. Csiro Publishing. Clayton, Australie, 440 p.
- Chakraborty U., Chakraborty B. 2015.** Abiotic Stresses in Crop Plants. Ed. CABI, Wallingford, Royaume-Uni, 282 p.
- Chenntouf T. 2008.** L'Algérie face à la mondialisation. Ed. African Books Collective, Oxford, Royaume-Uni, 330 p.
- Cherry J.H., Locy R.D., Rychter A. 2012.** Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 360 p.
- Cheverry C., Bourrie G. 1998.** La salinisation des sols, In : Sol interface fragile. Ed INA, Paris, 127 p.
- Chiaroni J., Roubinet F., Bailly P., Mannessier L., Noizat-Pirenne F. 2011.** Les analyses immunohématologiques et leurs applications cliniques. Ed. John Libbey Eurotext, Londres, Royaume Uni, 324 p.
- Chinnusamy V., Jagendorf A., Zhu J., 2005.** Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45, 437–448.
- Chlyah H., Demarly Y. 1993.** Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ?. Ed. John Libbey Eurotext, Montrouge - France 409 p.
- Clark D.P., Pazdernik N.J., 2015.** Biotechnology. Ed. Newnes, Amsterdam, Netherlands, 850 p.
- Ciccarelli D., Picciarelli P., Bedini G., Sorce C. 2015.** Mediterranean sea cliff plants: morphological and physiological responses to environmental conditions. *Journal of Plant Ecology* 9, 153–164.
- Clergeau P., Machon N. 2014.** Où se cache la biodiversité en ville ? : 90 clés pour comprendre la nature en ville. Ed. Quae Versailles, France, 168 p.

- Cooper G.M. 1999.** La cellule : Une approche moléculaire. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, France, 706 p.
- Crocq L. 2012.** 16 Leçons sur le trauma. Ed. Odile Jacob, Paris France, 304 p.
- Cseke L.J., Kirakosyan A., Kaufman P.B., Warber S., Duke J.A., Brielmann H.L. 2016.** Natural Products from Plants. Ed. CRC Press, Floride, États-Unis Floride, États-Unis, 632 p.
- Cunsolo F., Ruberto G., Amico V., Piatelli M. 1993.** Bioactive metabolites from Sicilian marine fennel, *Crithmum maritimum*. *Journal of Natural Products* 56, 1598 – 1600.
- Dagar J.C., Sharma P.C., Sharma D.K., Singh A.K. 2016.** Innovative Saline Agriculture. Ed. Berlin, Allemagne, 519 p.
- Daly B.A., Messedi D., Smaoui A., Ksouri R., Bouchereau A., Abdelly C. 2016.** Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. *Plant Physiology et Biochemistry*. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.02.037.
- Dan Y., Ow D.W. 2011.** Plant Transformation Technology Revolution in Last Three Decades. Ed. Bentham Science Publishers, Sharjah - Émirats Arabes Unis, 148 p.
- Daoud Y., Halitim A. 1994.** Irrigation et salinisation au Sahara algérien. *Sécheresse* 3, 151 – 160.
- Davidovic L. 2003.** Caractérisation de la protéine PARL, le prototype d'une nouvelle sous-famille de sérine-protéases assurant la protéolyse intramembranaire régulée. Thèse de Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire. Faculté De Médecine. Université de Laval Québec. Canada, 159 p.
- Debez A., Chaibi W., Bouzid S. 2003.** Physiological responses and structural modifications in *Atriplex halimus* L. plants exposed to salinity. *Cash Crop Halophytes : Recent Studies* 38,19-30.
- Denis F. 2007.** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Ed. Elsevier Masson, Paris, 573 p.
- Deysson Y. 1982.** Physiologie et botanique des plantes vasculaires-nutrition et métabolisme. Ed. Du et Sedes, Paris, France, 353 p.
- Dickison W.C. 2000.** Integrative Plant Anatomy. Ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, États-Unis, 533 p.
- Diédhiou C.J., Popova O.V., Gollack D. 2009.** Transcript profiling of the salt-tolerant *Festuca rubra* ssp. *litoralis* reveals a regulatory network controlling salt acclimatization. *Journal of Plant Physiology* 7, 697–711.

- Dejean J., Recgros R. 1978.** Petit guide panoramique de la flore mediterraneenn Ed. Delachaux, Paris, 78 p.
- Djerroudi O., Bissati S., Belkhodja M. 2011.** Biochemical response of two *Atriplex* species (*Atriplex halimus* L. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.) under salt stress conditions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry* 10, 163-168.
- Dooms M., Abalo Chango A., Abdel-Nour A. 2014.** La PCR quantitative (qPCR) et le guide de bonnes pratiques MIQE : adaptation et pertinence dans le contexte de la biologie clinique. *Ann Biol Clin* 72, 265-9.
- Doudech N., Mhamdi M., T. Bettaieb T., Denden M. 2008.** Tolérance à la salinité d'une graminée à gazon : *Paspalum notatum* Flüggé. *Tropicultura* 3, 182-185.
- Dubey R.C. 2014.** Advanced Biotechnology. Ed. S. Chand Publishing, New Delhi, India, 1161 p.
- Dumont G., Mazzacurati A. 2013.** *Crithmum maritimum* la succulente des tempêtes. *Acta Succulenta* 1, 23-51.
- Dutuit P., Gorenflot R. 2016.** Unité du monde vivant et développement durable : Glossaire. Ed. Educagri, Dijon, France, 311 p.
- Ellouzi H., Ben Hamed K., Cela J., Munné-Bosch S., Abdelly C. 2011.** Early effects of salt on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *thaliana* (Glycophyte). *Physiologia Plantarum* 142, 128–143.
- Fageria N.K. 2014.** Nitrogen Management in Crop Production. Ed. CRC Press, Florida, Etats Unis, 436 p.
- Fahmideh K.S.L., Fooladvand Z. 2017.** Isolation and semi quantitative PCR of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (SOS1 & NHX) genes under salinity stress in *Kochia scoparia*. DOI : <https://doi.org/10.1101/145953>
- FAO 2006.** Conférence électronique sur la salinisation : Extension de la salinisation et Stratégies de prévention et réhabilitation. Modérée par : Le projet CISEAU : (Centre d'Information Sur l'Eau Agricole et ses Usages), 12 p.
- Faurie C. 2011.** Ecologie : Approche scientifique et pratique. Ed. Lavoisier, Paris, France, 450 p.
- Flowers T.J., Colmer TD. 2008.** Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* 179, 945–963.
- Flowers T.J., Munns R., Colmer T.D. 2015.** Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany* 115, 419-431.

- Forbes J.C., Watson D. 1992.** Plants in Agriculture. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, 355 p.
- Foyer C.H., Noctor G. 2003.** Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119, 355-364.
- Foyer C.H., Noctor G. 2005.** Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28, 1056–1071.
- Franklin G., Čellárová E. 2017.** Molecular and Biotechnological Advancements in Hypericum Species. Ed. Frontiers Media SA, Madrid, Espagne, 160 p.
- Fu J., Zhang D.F., Liu Y.H., Ying S., 2012.** Isolation and characterization of maize PMP3 genes involved in salt stress tolerance. *PLoS One* 7, 31-32.
- Fukuda A., Nakamura A., Tanaka Y. 1999.** Molecular cloning and expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger gene in *Oryza sativa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1446, 149-155.
- Garrett R.H., Grisham C.M. 2000.** Biochimie. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 1292 p.
- Gaur R.K., Sharma P. 2013.** Approaches to Plant Stress and their Management. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 396 p.
- Ghoulam C., Foursy A., Fares K. 2002.** Effect of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and experimental botany* 47, 39-50.
- Grieve C.M., Grattan S.R. 1983.** Rapid assay for determination of water-soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* 70, 303-307.
- Grigore M.N., Toma C. 2010.** Halophytes: Ecological anatomy aspects. Ed. University of Iasi, Romania, 323 p.
- Grigore M.N. 2012.** Romanian Salt Tolerant Plants: Taxonomy and Ecology. Ed. University of Iasi, Romania, 455 p.
- Grigore M.N., Ivanescu L., Toma C. 2014.** Halophytes: An Integrative Anatomical Study. Ed. Springer, Paris, France, 548 p.
- Grigoriadou K., Maloupa E. 2008.** Micropropagation and salt tolerance of in vitro grown *Crithmum maritimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 94, 209–217.
- Guignard J.L. 2000.** Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris, France, 274 p.
- Guil-Guerrero J.L., Gimenez Martinez J.J., Isasa T.M.E. 1998.** Mineral nutrient composition of edible wild plants. *Journal of Food Composition and Analysis* 11, 322–328.

**Guillaume V. 2009.** Parasitologie sanguine. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, France, 208 p.

**Gupta D.K., Palma J.M., Corpas F.J. 2016.** Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses. Ed. Springer, Paris, 386 p.

**Hadjadj S., Djerroudi O., Bissati S. 2011.** Etude comparative des mecanismes biochimiques de tolerance au stress salin de deux especes d'atriplex : *atriplex halimus* l. et *atriplex canescens* (purch) nutt. *Algerian journal of arid environment* 2, 3-10.

**Hakeem K.R., Rehman R.U, Tahir I. 2013.** Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 355 p.

**Hamada A., Shono M., Xia T., Ohta M., Hayashi Y., Tanaka A., Hayakawa T. 2001.** Isolation and characterization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Molecular Biology* 46, 35- 42.

**Harrag A., Kaabache M. 2001.** Etude de la diversité biologique de : *Atriplex halimus* L. dans les régions désertiques méditerranéennes, arides et semi-arides de l'Algérie : repérage in vitro et in vivo d'individus résistants aux stress abiotiques et constitution de clones. In : Hamon Serge (ED). Des modèles biologiques à l'amélioration des plantes. Paris, France ; Montréal : IRD ; AUF, 545 – 546. (Colloques et séminaires). Journée Scientifiques du Réseau Auf : Biotechnologie végétales : Amélioration des plantes et sécurité Alimentaires, 7, Montpellier, France, 2000/07/03 – 05. ISBN 2- 7099- 1472- 7.

**Hawkesford M.J., Peter Buchner P. 2013.** Molecular Analysis of Plant Adaptation to the Environment. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 276 p.

**Hirt H., Shinozaki K. 2004.** Plant Responses to Abiotic Stress. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 300 p.

**Hodson M.J., Bryant J.A. 2012.** Functional Biology of Plants. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, États-Unis, 400 p.

**Hopkins W.G. 2003.** Physiologie végétale. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, France, 532 p.

**Hu Y., Zhang L., He S., Huang M., Tan J., Zhao L. 2012.** Cold stress selectively unsilences tandem repeats in heterochromatin associated with accumulation of H3K9ac. *Plant Cell Environ* 35, 2130–2142.

**Huang B. 2016.** Plant-Environment Interactions. Ed. CRC Press Floride, États-Unis, 416 p.

**Huddart D., Stott T. 2013.** Earth Environments: Past, Present and Future. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, États-Unis, 912 p.

**Hussin S., Geissler N., Koyro H.W. 2013.** Effect of NaCl salinity on *Atriplex nummularia* (L.) with special emphasis on carbon and nitrogen metabolism. *Acta Physiologiae Plantarum* 4, 1025–1038.

**Igarashi Y., Yoshiba Y., Sanada Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Shinozaki K. 1997.** Characterization of the gene for 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L.. *Plant Molecular Biology* 33, 857–865.

**Ingri D., Schonfelder P. 1988.** Guide de la flore méditerranéenne, Ed. Hliet Paris, 314 p.

**Jain S.M., Gupta S.D. 2013.** Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops. *Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne*, 459 p.

**Jain M., Garg R., Varshney R.K. 2014.** Abiotic Stress: Molecular Genetics and Genomics. Ed. Frontiers E-books, Lausanne Switzerland, 101 p.

**Jackson M., Lloyd B., Parry M., 2013.** Plant Genetic Resources and Climate Change. Ed. CABI, Wallingford, Royaume-Uni, 312 p.

**Jamagne M. 2011.** Grands paysages pédologiques de France. Ed. Quae, Versailles, France, 535 p.

**Jebara M., Aouani M., Mhamdi R., Mar M. 2000.** Effet du sel sur des isolats sinorhizobium sp. Detunisie in vitro ou en association avec Medicago sp, Cahiers de recherche francophones/ Agricultures, V. 9, 2, 99 - 102.

**Jenks M.A, Hasegawa P.M., Jain S.M. 2009.** Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 817 p.

**Johnson G.B., Raven P.H., Losos J.B., Singer S.R. 2011.** Biologie - Version luxe. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 1406 p.

**Joseph P. 2009.** Écosystèmes forestiers des Caraïbes. Ed. Karthala Editions, Paris, France, 777 p.

**Kant S., Kant P., Raveh E., Barak S. 2006.** Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na<sup>+</sup> uptake in *T. halophila*. *Plant, Cell and Environment* 29, 1220–1234.

**Kant P., Kant S., Gordon M. , Shaked R., Barak S. 2007.** Stress response suppressor1 and stress response suppressor2, Two DEAD-Box RNA Helicases That Attenuate *Arabidopsis Responses to Multiple Abiotic Stresses*. *Plant Physiology* 145, 814–830.

- Karp G. 2010.** Biologie cellulaire et moléculaire : Concepts and experiments. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, France, 840 p.
- Kessira M. 2002.** Gestion de l'irrigation dans les miliux salins, In : Advances in soil salinity and drainage management to save water and protect the environment. Ed. Ministry of agriculture, Algeria, 323 p.
- Keunen E., Peshev D., Vangronsveld J., Van den Ende W., Cuypers A. 2013.** Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant Cell and Environment* 36, 1242–1255.
- Khan M.A., Ungar I.A., Showalter A.M. 2000.** Effects of Salinity on Growth, Water Relations and Ion Accumulation of the Subtropical Perennial Halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Annals of Botany* 85 2, 225-232.
- Khan M.A., Weber D.J. 2006.** Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 404 p.
- Khan M.N., Mobin M., Mohammad F., Corpas F.J. 2015.** Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants Nitric Oxide Action in Abiotic Stress Responses in Plants. Ed. Springer, Paris, 252 p.
- Khelifi H., Bioret F., Farsi B. 2008.** Apport à la connaissance syntaxonomique du littoral rocheux ouest-algérois. *Acta Botanica Gallica* 2, 163-177.
- Kole C. 2013.** Genomics and Breeding for Climate-Resilient Crops. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 520 p.
- Kozłowski T.T., Pallardy S.G. 1996.** Physiology of Woody Plants. Ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, États-Unis, 411 p.
- Kubitzki K., Rohwer J.G., Bittrich V. 2013.** Flowering Plants · Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families Flowering Plants ·. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 653 p.
- Kuiper P.J.C., Bos M. 2012.** Plantago: A Multidisciplinary Study. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 368 p.
- Kulkarni V.N. 2002.** Hirsutisation of *Gossypium arboreum* cotton and genetic emendation of *G. hirsutum* for sucking pest resistance. Ph thesis, University of Agricultural Sciences Dharwad, India, 264 p.
- Lamattina L., Polacco J.C. 2007.** Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 283 p.
- Lamy M. 1995.** L'eau de la nature et des hommes. Presses Univ de Bordeaux, France, 230 p.

- Larcher W. 2003.** Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 513 p.
- Leboudire-Delalande L.S. 2012.** Traité élémentaire de physiologie végétale. Ed. Université de Californie, Etats Unis, 388 p.
- Le Houérou H.N., Claudin J., Pouget M. 1977.** Etude bioclimatique des steppes algérienne. *O. R. S.T.O.M.Bull. Soc. Hist. nat. Afr. Nord Alger*, 4, 33-74.
- Le Houérou H.N. 1976.** Rehabilitation of degraded arid lands. In: Rapp, A, Le Houérou, HN and Lundhoolm, B, eds, Can Desert Encroachment Be Stopped? *Ecolog Bull* 24, 189–206.
- Leigh R.A., Storey R. 1993.** Intercellular Compartmentation of Ions in Barley Leaves in Relation to Potassium Nutrition and Salinity. *Journal of Experimental Botany* 261, 755-7.
- Li C.H., Wang G., Zhao J.L., Zhang L.Q., Ai L.F., Han Y.F. 2014.** The receptor-like kinase SIT1 mediates salt sensitivity by activating MAPK3/6 and regulating ethylene homeostasis in rice. *Plant Cell* 26, 2538–2553.
- Lieth H., Sucre M.G, Herzog B. 2008.** Mangroves and Halophytes: Restoration and Utilisation. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 160 p.
- Lieth H., Mochtchenko M. 2013.** Cash Crop Halophytes: Recent Studies. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 254 p.
- Littré E. 2012.** Dictionnaire de la langue française contenant ... la nomenclature ... la grammaire ... la signification des mots ... la partie historique ... l'étymologie. Ed. Hachette et Cie, Paris, France, 2531 p.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. 2001.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2–DDCT method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, 402–408.
- Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Darnell J. 2005.** Biologie moléculaire de la cellule. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 1096 p.
- Lonvaud-funel A., Renauf V., Strehaiano P. 2010.** Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications. Ed. Lavoisier, Paris, 380 p.
- Lorkowski S., Cullen P.M. 2006.** Analysing Gene Expression, A Handbook of Methods: Possibilities and Pitfalls. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, États-Unis, 992 p.
- Lozer J., Mathieu C. 1990.** Dictionnaire de science du sol, Ed. Technique et Documentation - Lavoisier, Paris, 384 p.

- Lutts S., Almansouri M.M., Kinet J.M. 2004.** Salinity and water stress have contrasting effects on the relationship between growth and cell viability during and after stress exposure in durum wheat callus. *Plant Science* 167, 9-18.
- Madhava Rao K.V., Raghavendra A.S., Reddy K.J. 2006.** Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 345 p.
- Maire R. 1962.** Flore de l'Afrique du nord (Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara). Ed. Lechevalier. Paris 93 p.
- Makowski G.D. 2005.** Advances in Clinical Chemistry. Ed. Gulf Professional Publishing, Texas, États-Unis, 379.
- Males E., Zuntar I., Nigovic B., Plazibat M., Bilus I.c., Vundac V. 2003.** Quantitative analysis of the polyphenols of the aerial parts of rock samphire—*Crithmum maritimum* L. *Acta Pharmaceutica* 53, 139–144.
- Mansour M.M.F. 1998.** Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiol. Biochem* 36 (10), 767–772.
- Martell M., Gomez J., Esteban J.I., Sauleda S., Quer J., Cabot B., Esteban R., Guardia J. 1999.** High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 327-332.
- Martinez J.P., Kinet J.M., Bajji M., Lutts S. 2005.** NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water stress in the halophyte species *Atriplex halimus* L. *Journal of Experimental Botany* 56, 2421-2431.
- Mäser P., Gierth M., Schroeder I.J. 2002.** Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. *Plant and Soil* 247, 43–54.
- Mathieu C., Lozet J. 2011.** Dictionnaire encyclopédique de science du sol. Ed. Lavoisier Paris, 733 p.
- Mattiuzzo N. 2009.** Étude du transcriptome kératinocytaire au cours du programme de différenciation de l'épiderme. Thèse de doctorat (Gènes, Cellules & Développement), Université de Toulouse, France, 289 p.
- Medina J., Ballesteros M.L., Salinas J. 2007.** Phylogenetic and functional analysis of Arabidopsis RCI2 genes. *J. Exp. Bot* 58, 4333-4346.
- Miransari M. 2014.** Use of Microbes for the Alleviation of Soil Stresses: Volume 2: Alleviation of Soil Stress by PGPR and Mycorrhizal Fungi. Ed. Springer Science & Business, Berlin, Allemagne, 192 p.
- Moghaieb R.E.A., Saneoka H., Fujita K. 2004.** Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene

expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. *Plant Science* 166, 1345–1349.

**Mohamed A.A., Matter M.A., Mahmoud M. S. 2010.** Effect of salt stress on some defense mechanisms of transgenic and wild potato clones (*Solanum tuberosum* L.) grown *in vitro*. *Nature and Science* 8, 181- 193.

**Mohr H., Schopfer P. 2012.** Plant Physiology. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 629 p.

**Mold R.J. 2012.** Ecology of Halophytes. Ed. Elsevier, Amsterdam, Pays-Bas, 620 p.

**Morard P. 1995.** Above ground vegetable crops. Agricultural publications Agen, Paris.

**Mozas M., Ghosn A. 2013.** État des lieux du secteur de l'eau en Algérie. Etude et Analyse. Institut de prospective économique du monde méditerranéen (IPEMED), 1-25.

**Moulay B., Bidai Y. 2004.** La réponse des grains d'*Atriplex halimus* L. à la salinité au stade de la germination. *Science planétaire/Sécheresse* 4, 1-9.

**Muchate N.S., Nikalje G.C., Rajurkar N.S., Suprasanna P. 2016.** Physiological responses of the halophyte *Sesuvium portulacastrum* to salt stress and their relevance for saline soil bio-reclamation *Flora* 224, 96–105.

**Mulas M., Mulas G. 2004.** Potential of strategic use of *Atriplex* and *Opuntia* plants in the fight against desertification. Activity Report of the Desertification Research Group. Sassari University, Sardaigne, Italy 101 p.

**Mulhardt C. 2010.** Molecular Biology and Genomics. Ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, États-Unis, 272 p.

**Munns R. 2005.** Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol* 167, 645–663.

**Murphy D. 2011.** Plants, Biotechnology and Agriculture. Ed. CABI, Wallingford, Royaume-Uni, 310 p.

**Nahal I. 2004.** La désertification dans le monde : Causes - Processus - Conséquences – Lutte. Ed. Harmattan, Paris, 166 p.

**Navarre C., Goffeau A. 2000.** Membrane hyperpolarization and salt sensitivity induced by deletion of PMP3, a highly conserved small protein of yeast plasma membrane. *EMBO J* 19, 2515-2524.

**Nedjimi B. 2010.** Étude de la résistance d'*Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* aux sels solubles. *Acta Botanica Gallica* 4, 787-791.

**Nedjraoui D. 2009.** Intégration des aspects socio-économiques dans la mise en oeuvre d'un système de surveillance environnementale : Side Event OSS ; UNCCD/CST First

Scientific Conference, Buenos Aires, Argentina, 22-24.

**Nègre R. 1964.** Notice de la carte de Tipaza au 1/50 000e. Mém. Soc. Hist. Nat. Afr. N., N.S. 8- 69.

**Nemat Alla M.M., Abdel-Hamid A., Khedr M.M., Serag M.M., Abu-Alnaga A.Z., Nada R.M. 2012.** Regulation of metabolomics in *Atriplex halimus* growth under salt and drought stress. *Plant Growth Regul* 67, 281–304.

**Neumann K.H., Kumar A., Sopory S.K. 2008.** Recent Advances in Plant Biotechnology and Its Applications. Ed. I. K. International Pvt Ltd, New Delhi, Inde, 694 p.

**Nicot N., Hausman J.F., Hoffmann L., Evers D. 2005.** Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 421, 2907–2914.

**Nojavan S., Khalilian F., Momen Kiaie F., Rahimi A., Arabanian A., Chalavi S. 2008.** Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis* 21: 300-305.

**Ohta M., Hayashia Y., Nakashima A., Hamada A., Tanakaa A., Nakamura T., Hayakawa T. 2002.** Introduction of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Letters* 532, 279-282.

**Ortiz-Dorda J., Martinez-Mora C., Correal E., Simon B., Cenis J.I. 2005.** Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean Basin. *Annals of Botany* 95, 827-834.

**Ozcan M., Akgul A., Bascr K.H., Ozck T., Tabanca N. 2001.** Essential oil of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) from Turkey. *Nahrung/Food* 5,353–356.

**Ozenda P. 1977.** Flore du sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 622 p.

**Packham J.R., Willis A. J. 1997.** Ecology of Dunes, Salt Marsh and Shingle. Ed. Springer Science & Business Media Berlin, Allemagne, 335 p.

**Paech K., Tracey M.V. 2013.** Modern Methods of Plant Analysis / Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 766 p.

**Pandey S.N., Pandey S.N., Chadha A. 1993.** A Text Book Of botany: Plant Anatomy and Economic Botany. Ed. Vikas Publishing House Pvt Ltd, New Delhi, Inde 644 p.

**Pandey G.K. 2015.** Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomics Perspectives. Ed. Springer, Paris, France, 488 p.

**Papageorgiou G.C., Murata N. 1995.** The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research* 44, 243–252.

**Parida A.K., Veerabathini S.K., Asha Kumari A., Agarwal P.K. 2016.** Physiological, Anatomical and Metabolic Implications of Salt Tolerance in the Halophyte *Salvadora persica* under Hydroponic Culture Condition. *Frontiers in Plant Science* 351. DOI : 10.3389/fpls.2016.00351

**Patrinos G.P., Patrinos G., Ansoerge w. 2009.** *Molecular Diagnostics*. Ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, États-Unis, 616 p.

**Peel G.J., Mickelbart M.V., Rhodes D. 2010.** Choline metabolism in glycinebetaine accumulating and non-accumulating near-isogenic lines of *Zea mays* and *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* 71, 404-414.

**Pessarakli M. 2001.** *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Ed. CRC Press, Floride, États-Unis, 1000 p.

**Pessarakli M. 2014.** *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Ed. CRC Press, Florida, Etats Unis, 1031 p.

**Pessarakli M. 2016.** *Handbook of Plant and Crop Stress*. Ed. CRC Press, Floride, États-Unis, 1245 p.

**Petersen S.A., Richard D., Fetter R., Noordermeer J.N., Corey S., Goodman C.S., DiAntonio A. 1997.** Genetic Analysis of Glutamate Receptors in *Drosophila* Reveals a Retrograde Signal Regulating Presynaptic Transmitter Release. *Neuron*, 19, 1237–1248.

**Pinkert C.A. 2014.** *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook*. Ed. Newnes, Amsterdam, Netherlands, 714 p.

**Plummer D.T. 1989.** *Introduction to Practical Biochemistry*. McGraw-Hill, Paris. 331 p

**Poitras E., Houde A. 2002.** La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev Biol Biotechnol* 2, 2-11.

**Preedy V. 2015.** Betaine: Chemistry, Analysis, Function and Effects *Food and Nutritional Components in Focus*. Ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge UK, 445 p.

**Prescott L.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. 2010.** *Microbiologie*. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 1216 p.

**Pugnière P. 2012.** Contribution à l'Amélioration de la Quantification des Acides Nucléiques par qPCR et RT-qPCR. Thèse de doctorat (Biotechnologie, Instrumentation, Signal et Imagerie pour la Biologie, la Médecine et l'Environnement (BIS), Université de Grenoble, France, 198 p.

**Qiu-Li L., Da-Wei L., Xiao- Rong G., Qiao S., Li-Jia A. 2003.** Cloning of cDNA encoding choline monooxygenase from *Sueada liatungensis* and salt tolerance of transgenic Tobacco. *Acta Botanica Sinica* 45, 242-247.

**Okusanya O.T. 1977.** The effect of Sea Water and Temperature on the Germination Behaviour of *Crithmum maritimum*. *Physiol. Plant* 41, 265-267.

**Oudija F., Ismaili M. 2002.** Effet de NaCl sur l'embryogenese somatique et sur 1 capacites de regeneration chez le ble. Etude de la competence embryogene des cultures ble initiees directement en presence de NaCl. *Affrican Crop Science Journal* 3, 221-230.

**Quezel R., Santa S. 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions méditerranéenne. Ed. INRA, Paris, 565 p.

**Rahmani B. 2016.** Approche hydrogéologique et hydrochimique des eaux souterraines dans une zone semi-aride. Cas de la nappe moiplio-quaternaire du synclinal de djelfa (Algérie centrale). Thèse magistère, Université Larbi Tebessi, Tébessa.

**Ramade F. 2002.** Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement, Ed. Science international, Paris, 1075 p.

**Rangani J., Parida A.K., Panda A., Kumari A. 2016.** Coordinated Changes in Antioxidative Enzymes Protect the Photosynthetic Machinery from Salinity Induced Oxidative Damage and Confer Salt Tolerance in an Extreme Halophyte *Salvadora persica* L. *Frontiers in Plant Science*. DOI: 10.3389/fpls.2016.00050.

**Raven P.H., Johnson G.B., Mason K.A., Losos B.J. 2011.** Biologie. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 1406 p.

**Raven P.H., Mason K.A., Mason G.B., Losos J.B., Singer S.R. 2017.** Biologie. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 1400 p.

**Read A., Donnai D. 2008.** Génétique médicale : De la biologie à la pratique clinique. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 488 p.

**Redondo-GO' Mez S., Mateos-Naranjo E., Davy A.J., Ferna- Ndez-Munoz F., Castellanos E.M., Luque T., Enrique figueroa M. 2007.** Growth and Photosynthetic Responses to Salinity of the Salt-marsh Shrub *Atriplex portulacoides*. *Annals of Botany* 100, 555–563.

**Rémillard S. 2011.** Solutions face à la désertification d'une écorégion. Maîtrise en écologie internationale, Université De Sherbrooke, Québec, Canada, 84 p.

**Reski R., Kroemer K., Frank W. 2004.** Abiotic stress response in the moss *Physcomitrella patens*: evidence for an evolutionary alteration in signaling pathways in land plants. *Plant Cell Rep* 22, 864-870.

- Rhodes D., Hanson A.D. 1993.** Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 357-384.
- Rickard S. 2011.** The New Ornamental Garden. Ed. Csiro Publishing Clayton, Australie 268 p.
- Rioux R. 2009.** Étude de l'expression différentielle des gènes impliqués dans la production d'exopolysaccharides chez quatre souches de *la ctoba cillus rhamnosus*. Thèse maîtrise en microbiologie agricole, Université de Laval, Québec, Canada, 156 p.
- Roberfroid M.B., Coxam V., Delzenne N. 2008.** Aliments fonctionnels. Ed. Lavoisier, 1088 p.
- Robert D., Rland J.C. 1998.** Biologie végétale- organisation cellulaire. Ed. Doin Incitatives Santé, Hauts-de-Seine, France, 367 p.
- Roshchina V.V., Roshchina V.D. 2013.** Ozone and Plant Cell. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 267 p.
- Rundel P.W., Gibson A.C. 2005.** Ecological Communities and Processes in a Mojave Desert Ecosystem. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, Royaume-Uni, 388 p.
- Russell P.J., Hertz P.E., McMillan B. 2013.** Biology: The Dynamic Science. Ed. Cengage Learning, Boston, Massachusetts, États-Unis, 1456 p.
- Sadji A. 1987.** Arbres et arbustes fourragers dans les zones arides et semi-arides. Colloc sur les zones arides et sahariennes, INRF, Algérie, 61- 66.
- Samouelian F., Gaudin V., Boccara M. 2009.** Génétique moléculaire des plantes. Ed. Quae, Versailles, France, 205 p.
- Sangam S., Jayasree D., Janardham- Reddy K., Chari P.V.B., Sreenivasulu N., Kavi-Kishor P.B. 2005.** Salt tolerance in plants-transgenic approaches. *Journal of Plant Biotechnology* 7, 1-15.
- Sawahel W.A., Hassan A.H. 2002.** Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnology Letters* 24, 721-725.
- Selye H. 1950.** Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal* 1, 1383-1392.
- Sen D.N., Rajpurohit K.S. 2012.** Contributions to the ecology of halophytes. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 272 p.
- Servant J.M. 1975.** Etude pédologique des sols halomorphes. Thèse. Doc. Uni. Montpellier, 194 p.

- Setlow J.K. 2005.** Genetic Engineering: Principles and Methods. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 262 p.
- Setlow P. 2006.** Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol* 101, 514–525.
- Setlow J.K. 2012.** Genetic Engineering: Principles and Methods. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 278 p.
- Shabala S. 2013.** Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany* 112, 1209–1221.
- Shakespeare W. 2003.** La physiologie des plantes soumises aux stress. In : Physiologie végétale. Ed. De Boeck et Larcier, Bruxelles, Belgique, 446 p.
- Shen Y.G., Du B.X., Zhang W.K., Zhang J.S., Chen SY. 2002.** *AhCMO*, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. *Theoretical and Applied Genetics* 6, 815–821.
- Shi H., Lee B.H., Wu S.J., Zhu J.K. 2003.** Overexpression of a plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21, 81–85.
- Silveira J.A.G., Araújo S., Lima J.P.M.S., Viégas R.A. 2009.** Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environmental and Experimental Botany* 66, 1-8.
- Singh M., Kumar J., Singh S. 2015.** Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 14, 407–426.
- Singh B.P., Gupta V.K. 2017.** Molecular Markers in Mycology: Diagnostics and Marker Developments. Ed. Springer, Paris, 361 p.
- Siracusa L., Kulisic-Bilusic T., Politeo O., Krause I., Branka Dejanovic B., Ruberto G. 2011.** Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Aqueous Infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after Submission to a Two-Step in Vitro Digestion Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 12453–12459.
- Smirnoff N. 2000.** Ascorbate biosynthesis and function in photo-protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 355, 1455–1464.
- Smith A.M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A. 2009.** Plant Biology. Ed. Garland Science, Etats Unis, 680 p.
- Somma M. 2004.** Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés, extraction et purification de l'ADN. *Organisation Mondiale De La Sante*, 1-19.

- Souid A., Gabriele M., Longo V., Pucci L., Bellani L., Smaoui A., Abdely C., Ben Hamed k. 2016.** Salt tolerance of the halophyte *Limonium delicatulum* is more associated with antioxidant enzyme activities than phenolic compounds. *Functional Plant Biology*. DOI: 10.1071/FP15284
- Squires V.R. 2011.** The Role of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in Human Nutrition. Ed. EOLSS Publications, Paris, France, 416 p.
- Squires V., Ayoub A.T. 2012.** Halophytes as a resource for livestock and for rehabilitation of degraded lands. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 318 p.
- Sreedharan S., Shekhawat U.K.S., Ganapathi T.R. 2013.** Transgenic banana plants overexpressing a native plasma membrane aquaporin *MusaPIP1; 2* display high tolerance levels to different abiotic stresses. *Plant Biotechnology Journal* 11, 942–952.
- Sreedharan S., Shekhawat U.K.S., Ganapathi T.R. 2015.** Constitutive and stress-inducible overexpression of a native aquaporin gene (*MusaPIP2; 6*) in transgenic banana plants signals its pivotal role in salt tolerance. *Plant Molecular Biology* 88, 41–52.
- Srivastava Ak., Rai A.N., Neilan B.A. 2013.** Stress Biology of Cyanobacteria: Molecular Mechanisms to Cellular Responses. Ed. CRC Press Floride, États-Unis, 394 p.
- Stanta G. 2011.** Guidelines for Molecular Analysis in Archive Tissues. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 323 p.
- Steinberg C.E.W. 2012.** Stress Ecology: Environmental Stress as Ecological Driving Force and Key Player in Evolution. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 480 p.
- Stryer L. 1959.** La biochimie, Ed. Flammanion, Paris, 1065 p.
- Suaire S.R., Durickovic I., Framont-Terrasse L., Leblain J.Y., De Rouck A.C., Simonnot M.O. 2016.** Phytoextraction of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> by *Atriplex halimus* L. and *Atriplex hortensis* L.: A promising solution for remediation of road runoff contaminated with deicing salts. *Ecological Engineering* 94, 182–189.
- Susanne C. 1997.** Les manipulations génétiques : Jusqu'où aller ?. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, 224 p.
- Szabados L., Savouré A. 2009.** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89-97.
- Szabolcs I. 1989.** Salt affected soils. Ed. CRP Press Inc, Boca Raton, Université de Californie, 274 p.
- Tabuchi T., Kawaguchi Y., Azuma T., Nanmori T., Yasuda T. 2005.** Similar regulation patterns of choline monoxygenase, phosphoethanolamine N-

methyltransferase and S-adenosyl-L-methionine synthetase in leaves of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant and Cell Physiology* 46, 505–513.

**Tagu D., Moussard C. 2003.** Principes des techniques de biologie moléculaire. Ed. Quae, Versailles, France, 176 p.

**Toppi L.S.T., Pawlik-Skowronska B. 2013.** Abiotic Stresses in Plants. . Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 233 p.

**Tripathi B.N., Müller M. 2015.** Stress Responses in Plants: Mechanisms of Toxicity and Tolerance. Ed. Springer, Berlin, Allemagne, 292 p.

**Troll W., Lindsley J. 1955.** A photometric method for the determination of proline. *Journal of Biological Chemistry* 215, 655-660.

**Tropp B.E. 2011.** Molecular Biology. Ed. Jones & Bartlett Publishers, Burlington, Massachusetts, États-Unis, 1097 p.

**Tuteja N., Gill S.S., Tuteja R. 2011.** Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance. Ed. Bentham Science Publishers, Sharjah, Émirats Arabes Unis, 176 p.

**Tuteja N., Gill S.S., Tiburcio A.F., Tuteja R. 2012.** Improving Crop Resistance to Abiotic Stress. Ed. Wiley, New Jersey, Etats Unis, 1534 p.

**Turkan I. 2011.** Plant Responses to Drought and Salinity stress: Developments in a Post-Genomic Era. Ed. Academic Press, Cambridge, Massachusetts, États-Unis, 592 p.

**Ueda T., Uemura T., Sato M.H., Nakano A. 2004.** Functional differentiation of endosomes in Arabidopsis cells. *Plant Journal* 40: 783–789.

**Ulrich L., Kluge M., Bauer G. 1992.** Traité fundamental de botanique. Ed. Technique et documentation, Paris, 574 p.

**Vasil I.K. 2013.** Plant Biotechnology and Beyond. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 619 p.

**Venkateswarlu B., Shanker A.K., Shanker C., Maheswari M. 2011.** Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 612 p.

**Vicente O., Boscaiu M., Naranjo M.A., Estrelles E., Belles J.M., Soriano P. 2004.** Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal Arid Environnement* 58, 463–481.

**Vinocur B., Altman A. 2005.** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress achievements and limitations. *Cur Opin Biotech* 29, 109-113.

**Voet D., Voet J.G. 2005.** Biochimie. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, France, 1600 p.

- Voet D., Voet J.G. 2016.** Biochimie. Ed. De Boeck Supérieur, Paris, France, 1784 p.
- Vromman D., Zdenka I.L.E., Martínez S.J.P., Vanhecke N., Briceno M., Kumar M., Lutts S., 2016.** Salinity influences arsenic resistance in the xerohalophyte *Atriplex atacamensis* Phil. Doi :10.1016/j.envexpbot.2016.01.004.
- Walker M.J., Rapley R. 2009.** Molecular Biology and Biotechnology. Ed. Royal Society of Chemistry, Royaume Uni, 604 p.
- Walker D.J., Lutts S., Sánchez-García M., Correal E. 2014.** *Atriplex halimus* L. : Its biology and uses. *Journal of Arid Environments* 100, 111-121.
- Wang L.W., Showalter A.M. 2004.** Cloning and salt-induced, ABA independent expression of choline mono-oxygenase in *Atriplex prostrata*. *Physiologia Plantarum* 120, 405–412.
- Wang G.P., Hui Z., Li F., Zhao M.R., Zhang J., Wang W. 2010.** Improvement of heat and drought photosynthetic tolerance in wheat by overaccumulation of glycinebetaine. *Plant Biotechnology Reports* 4, 213–222.
- Wang Y. 2011.** The adaptation Mechanism of *Leymus chinensis* to grazing and salt-alkali stress. Thesis submitted in partial fulfilment of the requirement for the ward of Master of Science degree in Agricultural Sciences. University of Hohenheim, Germany, 49 p.
- Wang L., Ma Y.K., Lin N., Zhang W.B., Mao H.P., Lin X.F. 2016.** Isolation and characterization of a tonoplast Na<sup>+</sup> /H<sup>+</sup> antiporter from the halophyte *Nitraria sibirica* L. *Biologia Plantarum* 1, 113-122.
- Weber D.L., Ansari R., Gul B., Khan M.A. 2007.** Potential of halophytes as source of edible oil. *Journal of Arid Environ* 68, 315–321.
- Weil H.J., Bonnet J., Boulanger Y., Chambon P., Dubertret G., Florentz C., Kedinger C., Lazdunsk M., Montreuil J., Patte J.C., Rebel G., Rossignol M., Shechter E., Wright M. 2001.** Biochimie genera. Ed. Masson, Paris, 655 p.
- Weissensteiner T., Nolan T., Bustin S.A., Griffin H.G., Griffin A. 2003.** PCR Technology: Current Innovations. Ed. CRC Press, Floride, États-Unis 416 p.
- Whitford D. 2013.** Proteins: Structure and Function. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, États-Unis 520 p.
- Willey N. 2015.** Environmental Plant Physiology. Ed. Garland Science, Etats Unis, 378 p.
- Witlekens H., Inz D., Van Montagu M., van Camp W. 1995.** Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1, 207-228.

- Wolfgang F. 1982.** Vitamin C in sea fennel (*Crithmum maritimum*), an edible wild plant. *Economic Botany*, (2), 163-165.
- Wu Y., Meng K., Liang X. 2016.** Distinct patterns of natural selection in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter genes in *Populus euphratica* and *Populus pruinosa*. *Ecology and Evolution* 7, 82–91.
- Yadav S.S., McNeil D.L., Redden R., Patil S.A. 2010.** Climate Change and Management of Cool Season Grain Legume Crops. Ed. Springer Science & Business Media, Berlin, Allemagne, 460 p.
- Yan L.P., Liu C.L., Liang H.M., Mao X.H., Wang F., Pang C.H., Shu J., Xia Y. 2012.** Physiological responses to salt stress of T2 alfalfa progenies carrying a transgene for betaine aldehyde dehydrogenase. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 2, 191–199.
- Yang Y., Qi M., Mei C. 2004.** Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. *Plant Journal* 40, 909– 919.
- Yu Z.X., Wang L. J., Zhao B., Shan C.M., Zhang Y. H., Chen D.F. 2015.** Progressive regulation of sesquiterpene biosynthesis in Arabidopsis and Patchouli (*Pogostemon cablin*) by the miR156-targeted SPL transcription factors. *Molecular. Mol Plant* 8, 98–110.
- Zahran M., Daidone I., Smith J.C., Imhof P. 2010.** Mechanism of DNA Recognition by the Restriction Enzyme EcoRV. *Journal of molecular biology* 401, 415- 432.
- Zarrouk M., Almi H.E.L., Ben Youssef N., Sleimi N., Ben Miled D., Smaoui A., Abdelly C. 2004.** Lipid composition of seed of local halophyte species *Cakile maritime*, *Zygophyllum album* and *Crithmum maritimum*. *Cash Crop Halophytes : Recent Studies* 38, 121-124.
- Zhang H., Dong H., Li W., Sun Y., Chen S., Kong X. 2009.** Increased glycine betaine synthesis and salinity tolerance in AhCMO transgenic cotton lines. *Molecular Breeding* 23, 289–298.
- Zhang Y. 2016.** Biotechnology and Medical Science: Proceedings of the 2016 International Conference on Biotechnology and Medical Science. Ed. World Scientific, Singapore, 700 p.
- Zhang W.D., Wang P., Bao Z., Ma Q., Duan L.J., Bao A.K., Zhang J.L., Wang S.M. 2017.** SOS1, HKT1; 5, and NHX1 Synergistically Modulate Na<sup>+</sup> Homeostasis in the Halophytic Grass *Puccinellia tenuiflora*. *Frontiers in Plant Science*. Doi: 10.3389/fpls.2017.00576
- Zhu J.K. 2001.** Plant salt tolerance. *Trends Plant Science* 6, 66–71.

**Zhu J.K. 2002.** Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu Rev Plant Biol* 53, 247–273.

**Zhu J.K. 2003.** Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 441- 445.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Tampon TAE (Tris-acetate-EDTA) 50X.

- 242 g Tris-base.
- 57,1 ml acide acétique glacial.
- 100 ml EDTA (0,5 M) pH 8,0.
- Ajustez à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Laissez dissoudre ces composés pendant une heure.

### Annexe 2 : Préparation de milieux de culture.

- **Milieu de culture liquide** : pour un volume de 100 ml préparez :

4. 1.0g tryptone	} Dans de l'eau distillée et vérifiez le pH à 7,0 puis stérilisation à l'autoclave.
5. 0.5g extrait de levure	
6. 1.0g NaCl	

- **Milieu de culture solide** : 1,5 g d'agar-agar ont été ajoutés à chaque 100 ml de milieu liquide préalablement préparé après avoir vérifié le pH et avant autoclavage. Laissez refroidir à environ 45 ° C avant d'ajouter des antibiotiques (Ampicilline and Kanamycine) et versez immédiatement dans des boîtes de Pétri (prévoir environ 25 ml pour chaque boîte).

**NB** : Les cellules *Escherichia coli* ont été maintenues congelées à -80 ° C en aliquotes de 100µl dans des tubes Eppendorf 1,5 ml.

**Annexe 3 : Analyse de la variance du taux de survie (*Atriplex halimus*).**

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	6942,75	99	70,129				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	4779	4	1194,75	59,821	0		
<b>VAR.FACTEUR F1*2</b>	30,25	1	30,25	1,515	0,21929		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	336	4	84	4,206	0,00375		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	1797,5	90	19,972			4,469	5,03 %

**Annexe 4 : Analyse de la variance la hauteur des plantules (*Atriplex halimus*).**

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	11201,7	299	37,464				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	10003,79	2	5001,893	7781,209	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	304,566	4	76,142	118,45	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	438,611	1	438,611	682,327	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	225,293	8	28,162	43,81	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	30,108	2	15,054	23,419	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	14,896	4	3,724	5,793	0,00021		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	10,874	8	1,359	2,115	0,03456		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	173,561	270	0,643			0,802	10,71%

**Annexe 5 : Analyse de la variance du taux de croissance relative (*Atriplex halimus*).**

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	15129,27	199	76,027				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	5468,415	1	5468,415	361,696	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	1173,459	4	293,365	19,404	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	2423,451	1	2423,451	160,294	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	1793,085	4	448,271	29,65	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	323,16	1	323,16	21,375	0,00002		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	652,372	4	163,093	10,787	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	573,945	4	143,486	9,491	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	2721,385	180	15,119			3,888	12,09%

**Annexe 6 :** Analyse de la variance de la teneur en eau au niveau des feuilles  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	6602,255	89	74,183				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	5065,754	2	2532,877	12050,95	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	62,817	4	15,704	74,718	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	1196,804	1	1196,804	5694,167	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	16,531	8	2,066	9,831	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	216,286	2	108,143	514,523	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	21,405	4	5,351	25,46	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	10,048	8	1,256	5,976	0,00001		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	12,611	60	0,21			0,458	0,66%

**Annexe 7 :** Analyse de la variance de la teneur en eau au niveau des racines  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	10205,66	59	172,977				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	10067,07	1	10067,07	70789,22	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	12,881	4	3,22	22,644	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	96,968	1	96,968	681,854	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	16,107	4	4,027	28,316	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	2,78	1	2,78	19,55	0,0001		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	1,893	4	0,473	3,327	0,01912		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	2,269	4	0,567	3,988	0,00822		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	5,688	40	0,142			0,377	0,61%

**Annexe 8 :** Analyse de la variance du taux de chlorophylle (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	84,562	89	0,95				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	61,11	2	30,555	4954,586	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	16,221	4	4,055	657,56	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	0,072	1	0,072	11,724	0,00125		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	4,591	8	0,574	93,055	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	0,47	2	0,235	38,126	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	1,022	4	0,256	41,432	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	0,706	8	0,088	14,312	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,37	60	0,006			0,079	2,56%

**Annexe 9 :** Analyse de la variance du taux de Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	576549,8	89	6478,087				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	237327,1	2	118663,6	18674,92	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	207707,4	4	51926,86	8172,096	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	5018,75	1	5018,75	789,836	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	112378,1	8	14047,26	2210,716	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	4625,156	2	2312,578	363,947	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	3623,375	4	905,844	142,559	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	5488,594	8	686,074	107,972	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	381,25	60	6,354			2,521	2,78%

**Annexe 10 :** Analyse de la variance du taux de Na<sup>+</sup> au niveau des racines (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	19024,73	59	322,453				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	4340,396	1	4340,396	831,537	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	12993,76	4	3248,441	622,339	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	75,729	1	75,729	14,508	0,00056		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	1172,973	4	293,243	56,18	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	1,258	1	1,258	0,241	0,63153		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	160,924	4	40,231	7,707	0,00012		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	70,9	4	17,725	3,396	0,01749		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	208,789	40	5,22			2,285	6,30%

**Annexe 11 :** Analyse de la variance du taux de K<sup>+</sup> au niveau des feuilles (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	1271092	89	14281,93				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	1261277	2	630638,4	20550,33	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	1844,625	4	461,156	15,028	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	923,375	1	923,375	30,09	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	3027,5	8	378,438	12,332	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	576,75	2	288,375	9,397	0,00034		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	715,5	4	178,875	5,829	0,00055		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	886	8	110,75	3,609	0,0018		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	1841,25	60	30,688			5,54	3,43%

**Annexe 12 :** Analyse de la variance du taux de  $K^+$  au niveau des racines (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	4814,614	59	81,604				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	4353,142	1	4353,142	1372,953	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	45,034	4	11,258	3,551	0,01432		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	2,233	1	2,233	0,704	0,41103		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	173,207	4	43,302	13,657	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	18,884	1	18,884	5,956	0,01832		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	38,883	4	9,721	3,066	0,0269		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	56,405	4	14,101	4,447	0,00465		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	126,826	40	3,171			1,781	5,16%

**Annexe 13 :** Analyse de la variance Ratio  $K^+/Na^+$  au niveau des feuilles (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	257,633	89	2,895				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	34,338	2	17,169	1298,001	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	184,167	4	46,042	3480,796	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	0,678	1	0,678	51,221	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	27,457	8	3,432	259,477	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	1,981	2	0,99	74,879	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	0,637	4	0,159	12,036	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	7,582	8	0,948	71,651	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,794	60	0,013			0,115	4,97%

**Annexe 14 :** Analyse de la variance Ratio  $K^+/Na^+$  au niveau des racines (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	19,519	59	0,331				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	0,356	1	0,356	26,486	0,00001		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	16,487	4	4,122	306,482	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	0,15	1	0,15	11,118	0,00196		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	1,672	4	0,418	31,083	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	0	1	0	0	0,99		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	0,233	4	0,058	4,323	0,00542		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	0,084	4	0,021	1,555	0,20415		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,538	40	0,013			0,116	9,97%

**Annexe 15 :** Analyse de la variance du taux de la proline au niveau des feuilles (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	39162,86	89	440,032				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	20593,56	2	10296,78	6348,179	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	11663,91	4	2915,979	1797,761	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	778,43	1	778,43	479,918	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	4154,844	8	519,356	320,194	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	829,59	2	414,795	255,73	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	619,219	4	154,805	95,44	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	425,981	8	53,248	32,828	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	97,32	60	1,622			1,274	4,02%

**Annexe 16 :** Analyse de la variance du taux de la proline au niveau des racines (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	3916,007	59	66,373				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	567,302	1	567,302	2382,821	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	2907,418	4	726,855	3052,987	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	33,896	1	33,896	142,37	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	259,392	4	64,848	272,379	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	0,149	1	0,149	0,625	0,43965		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	118,86	4	29,715	124,811	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	19,468	4	4,867	20,442	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	9,523	40	0,238			0,488	3,26%

**Annexe 17 :** Analyse de la variance du taux des sucres solubles au niveau des feuilles (*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	55803,12	89	627,001				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	26300,09	2	13150,04	6556,879	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	23539,95	4	5884,988	2934,375	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	661,508	1	661,508	329,841	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	4657,998	8	582,25	290,322	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	173,959	2	86,979	43,37	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	202,883	4	50,721	25,29	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	146,4	8	18,3	9,125	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	120,332	60	2,006			1,416	2,65%

**Annexe 18** : Analyse de la variance du taux des sucres solubles au niveau des racines  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	2034,412	59	34,482				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	573,504	1	573,504	401,286	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	1297,392	4	324,348	226,949	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	57,037	1	57,037	39,91	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	32,558	4	8,14	5,695	0,00106		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	0,504	1	0,504	0,353	0,56288		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	13,192	4	3,298	2,308	0,07393		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	3,058	4	0,765	0,535	0,71348		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	57,167	40	1,429			1,195	6,52%

**Annexe 19** : Analyse de la variance du taux de la glycine bétaine au niveau des feuilles  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	64233,41	89	721,724				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	15422,87	2	7711,434	179738,4	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	33528,45	4	8382,112	195370,6	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	6955,172	1	6955,172	162111,4	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	4136,809	8	517,101	12052,61	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	822,727	2	411,363	9588,072	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	3004,191	4	751,048	17505,46	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	360,617	8	45,077	1050,66	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	2,574	60	0,043			0,207	0,63%

**Annexe 20** : Analyse de la variance du taux de la glycine bétaine au niveau des racines  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	4124,386	59	69,905				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	150,075	1	150,075	2669,166	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	1826,034	4	456,509	8119,231	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	1330,817	1	1330,817	23669,25	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	18,155	4	4,539	80,725	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	11,737	1	11,737	208,741	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	772,381	4	193,095	3434,297	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	12,937	4	3,234	57,523	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	2,249	40	0,056			0,237	2,38%

**Annexe 21** : Analyse de la variance du total des solutés internes au niveau des feuilles  
(*Atriplex halimus*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	215113,8	89	2417,009				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	183799,9	2	91899,97	20702,56	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	25111,69	4	6277,922	1414,245	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	172,094	1	172,094	38,768	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	4004,016	8	500,502	112,75	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	738,016	2	369,008	83,127	0		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	638,641	4	159,66	35,967	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	383,047	8	47,881	10,786	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	266,344	60	4,439			2,107	2,21%

**Annexe 22** : Analyse de la variance du total des solutés internes au niveau des racines  
(*Atriplex halimus*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	3086,807	59	52,319				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	0,684	1	0,684	0,863	0,36129		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	2484,278	4	621,07	784,12	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	242,452	1	242,452	306,103	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	107,271	4	26,818	33,858	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	0,26	1	0,26	0,328	0,57674		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	197,765	4	49,441	62,421	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	22,415	4	5,604	7,075	0,00023		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	31,682	40	0,792			0,89	2,81%

**Annexe 23** : Analyse de la variance de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles  
(*Atriplex halimus*)

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	10524,17	29	362,902				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	8111,667	4	2027,917	25,888	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	187,501	1	187,501	2,394	0,13399		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	658,332	4	164,583	2,101	0,11784		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	1566,667	20	78,333			8,851	13,24%

**Annexe 24 :** Analyse de la variance de la catalase activité au niveau des feuilles  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	145,55	29	5,019				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	135,627	4	33,907	965,927	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	1,857	1	1,857	52,903	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	7,364	4	1,841	52,445	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,702	20	0,035			0,187	0,37%

**Annexe 25 :** Analyse de la variance du taux d'acide ascorbique au niveau des feuilles  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	81,875	29	2,823				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	71,728	4	17,932	1754,468	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	7,486	1	7,486	732,473	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	2,457	4	0,614	60,09	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,204	20	0,01			0,101	1,91 %

**Annexe 26 :** Analyse de la variance de l'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	4202,879	119	35,318				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	34,479	1	34,479	11,817	0,00099		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	2979,401	4	744,85	255,288	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	178,723	1	178,723	61,255	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	315,054	4	78,763	26,995	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	61,062	1	61,062	20,928	0,00003		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	112,425	4	28,106	9,633	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	229,966	4	57,492	19,704	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	291,769	100	2,918			1,708	27,55%

**Annexe 27** : Analyse de la variance de l'expression relative du gène CMO  
(*Atriplex halimus*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	3659,918	119	30,756				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	213,96	1	213,96	70,509	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	1367,84	4	341,96	112,691	0		
<b>VAR.FACTEUR 3</b>	440,003	1	440,003	145,001	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	330,401	4	82,6	27,221	0		
<b>VAR.INTER F1*3</b>	65,484	1	65,484	21,58	0,00002		
<b>VAR.INTER F2*3</b>	772,522	4	193,13	63,645	0		
<b>VAR.INTER F1*2*3</b>	166,26	4	41,565	13,698	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	303,449	100	3,034			1,742	44,75%

**Annexe 28** : Analyse de la variance du taux de survie (*Crithmum maritimum*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	11937,36	47	253,987				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	10877,28	7	1553,897	58,633	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	1060,086	40	26,502			5,148	6,42%

**Annexe 29** : Analyse de la variance de la taille des plantules (*Crithmum maritimum*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	5955,316	143	41,646				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	84,284	7	12,041	51,704	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	5814,873	2	2907,436	12485,04	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	28,215	14	2,015	8,654	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	27,945	120	0,233			0,483	5,97%

**Annexe 30** : Analyse de la variance du taux de croissance relative (2 semaines comparées à une semaine) (*Crithmum maritimum*).

	<b>S.C.E</b>	<b>DDL</b>	<b>C.M.</b>	<b>TEST F</b>	<b>PROBA</b>	<b>E.T.</b>	<b>C.V.</b>
<b>VAR.TOTALE</b>	1552,079	47	33,023				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	898,731	7	128,39	7,86	0,00001		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	653,348	40	16,334			4,041	17,02%

**Annexe 31 :** Analyse de la variance du taux de croissance relative (6 semaines comparées à 1 semaine) (*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	449,075	47	9,555				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	419,925	7	59,989	82,319	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	29,15	40	0,729			0,854	2,10%

**Annexe 32 :** Analyse de la variance de la teneur en eau au niveau des feuilles (*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	3822,807	71	53,842				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	165,032	7	23,576	117,169	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	3629,269	2	1814,635	9018,495	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	18,848	14	1,346	6,691	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	9,658	48	0,201			0,449	0,62%

**Annexe 33 :** Analyse de la variance de la teneur en eau au niveau des racines (*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	1352,711	47	28,781				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	339,53	7	48,504	54,125	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	826,299	1	826,299	922,055	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	158,206	7	22,601	25,22	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	28,677	32	0,896			0,947	1,55%

**Annexe 34 :** Analyse de la variance du taux de chlorophylle (*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	141,602	71	1,994				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	1,691	7	0,242	15,052	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	138,565	2	69,282	4317,246	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	0,576	14	0,041	2,563	0,0079		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,77	48	0,016			0,127	4,09%

**Annexe 35** : Analyse de la variance du taux de Na<sup>+</sup> au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	4244147	71	59776,71				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	988687,5	7	141241,1	3159,167	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	2197487	2	1098743	24575,8	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	1055827	14	75416,18	1686,848	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	2146	48	44,708			6,686	3,27%

**Annexe 36** : Analyse de la variance du taux de Na<sup>+</sup> au niveau des racines  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	28070,83	47	597,252				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	16058,12	7	2294,016	475,557	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	9596,615	1	9596,615	1989,409	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	2261,736	7	323,105	66,981	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	154,363	32	4,824			2,196	4,27%

**Annexe 37** : Analyse de la variance du taux de K<sup>+</sup> au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	2833970	71	39915,07				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	27083	7	3869	93,417	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	2779605	2	1389802	33556,59	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	25294,5	14	1806,75	43,624	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	1988	48	41,417			6,436	1,35%

**Annexe 38** : Analyse de la variance du taux de K<sup>+</sup> au niveau des racines  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	25272,84	47	537,72				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	1936,967	7	276,71	82,274	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	23168	1	23168	6888,51	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	60,252	7	8,607	2,559	0,03257		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	107,625	32	3,363			1,834	2,07%

**Annexe 39** : Analyse de la variance Ratio  $K^+/Na^+$  au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	1140,205	71	16,059				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	959,233	7	137,033	303,334	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	50,456	2	25,228	55,845	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	108,832	14	7,774	17,208	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	21,684	48	0,452			0,672	12,96%

**Annexe 40** : Analyse de la variance Ratio  $K^+/Na^+$  au niveau des racines  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	43,561	47	0,927				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	42,514	7	6,073	311,823	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	0,054	1	0,054	2,771	0,10197		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	0,369	7	0,053	2,707	0,02532		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,623	32	0,019			0,14	6,80%

**Annexe 41** : Analyse de la variance du taux de la proline au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	110395,3	71	1554,863				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	58044,71	7	8292,102	951,154	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	41163,1	2	20581,55	2360,828	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	10769	14	769,214	88,234	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	418,461	48	8,718			2,953	4,34%

**Annexe 42** : Analyse de la variance du taux de la proline au niveau des racines  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	12018,68	47	255,717				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	7572,536	7	1081,791	307,267	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	3992,484	1	3992,484	1134,006	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	341,001	7	48,714	13,837	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	112,662	32	3,521			1,876	4,66%

**Annexe 43 :** Analyse de la variance du taux des sucres solubles au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	195721,7	71	2756,644				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	113138,3	7	16162,62	6474,321	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	64077,91	2	32038,95	12833,96	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	18385,66	14	1313,261	526,058	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	119,828	48	2,496			1,58	1,87%

**Annexe 44 :** Analyse de la variance du taux des sucres solubles au niveau des racines  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	26533,08	47	564,534				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	16993,7	7	2427,672	1425,422	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	7739,379	1	7739,379	4544,223	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	1745,496	7	249,357	146,411	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	54,5	32	1,703			1,305	2,39%

**Annexe 45 :** Analyse de la variance du taux de la glycine bétaïne au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	106506,7	71	1500,094				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	54747,14	7	7821,021	17235,42	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	36248,86	2	18124,43	39941,36	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	15488,9	14	1106,35	2438,097	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	21,781	48	0,454			0,674	1,50%

**Annexe 46 :** Analyse de la variance du taux de la glycine bétaïne au niveau des racines  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	4389,175	47	93,387				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	3713,36	7	530,48	1677,711	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	638,584	1	638,584	2019,603	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	27,114	7	3,873	12,25	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	10,118	32	0,316			0,562	3,05%

**Annexe 47** : Analyse de la variance du total des solutés internes au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	451981,3	71	6365,935				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	440872,7	7	62981,81	5487,552	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	3247,219	2	1623,609	141,464	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	7310,531	14	522,181	45,497	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	550,906	48	11,477			3,388	1,48%

**Annexe 48** : Analyse de la variance du total des solutés internes au niveau des racines  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	22257,26	47	473,559				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	13883,13	7	1983,304	491,476	0		
<b>VAR.FACTEUR 2</b>	8092,656	1	8092,656	2005,416	0		
<b>VAR.INTER F1*2</b>	152,347	7	21,764	5,393	0,0004		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	129,133	32	4,035			2,009	2,45%

**Annexe 49** : Analyse de la variance de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	7349,535	23	319,545				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	4728,206	7	675,458	4,123	0,00914		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	2621,329	16	163,833			12,8	18,20%

**Annexe 50** : Analyse de la variance de la catalase activité au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	520,479	23	22,63				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	503,399	7	71,914	67,366	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	17,08	16	1,068			1,033	1,64%

**Annexe 51** : Analyse de la variance du taux d'acide ascorbique au niveau des feuilles  
(*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	37,073	23	1,612				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	37,055	7	5,294	4665	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	0,018	16	0,001			0,034	0,86 %

**Annexe 52** : Analyse de la variance de l'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter  
Au niveau des feuilles (*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	3381,754	47	71,952				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	2955,709	7	422,244	39,643	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	426,045	40	10,651			3,264	35,01%

**Annexe 53** : Analyse de la variance de l'expression relative du gène Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter  
Au niveau des racines (*Crithmum maritimum*).

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
<b>VAR.TOTALE</b>	793,87	47	16,891				
<b>VAR.FACTEUR 1</b>	746,842	7	106,692	90,748	0		
<b>VAR.RESIDUELLE 1</b>	47,028	40	1,176			1,084	20,80%



## Diverse salinity responses in *Crithmum maritimum* tissues at different salinities over time

Faiza Hamdani<sup>1,2,3</sup>, Arezki Derridj<sup>1</sup>, Hilary J. Rogers<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Faculté des sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 15000 Tizi-Ouzou, Algeria. <sup>2</sup>Département des Sciences Agronomiques. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Kasdi Merbah Ouargla, 30000 Ouargla, Algeria. <sup>3</sup>School Biosciences, Cardiff University, Main Building, Park Place, Cardiff, CF10 3AT, UK. \*Corresponding author: rogershj@cf.ac.uk

### Abstract

*Crithmum maritimum* (sea fennel) withstands high salinity, and to better understand how different protective mechanisms against salinity are activated, young seedlings were exposed to increasing concentrations of NaCl (0 to 512 mM) over six weeks. Plant survival and chlorophyll content were reduced at > 85 mM NaCl and growth was affected at  $\geq$  341 mM NaCl. Relative water content fell and Na<sup>+</sup> accumulated more in leaves than in roots. Induction of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter expression reached a maximum at 427 mM NaCl in both tissues. Salinity induced the accumulation of proline, soluble sugars and glycine betaine. All three accumulated to higher levels in leaves than roots and greatest accumulation was after 6 weeks and the highest salt concentrations. Hydrogen peroxide levels fell with increasing salinity in leaves, while ascorbic acid and catalase activity rose. Overall, the most dramatic changes occurred after six weeks of saline stress but different mechanisms were activated at different salinity thresholds and in the two tissues. Key salinity thresholds in the response of *Crithmum maritimum* to salinity stress are identified activating different mechanisms. At 85 mM NaCl roots reach osmotic adjustment, at 171 mM further osmolyte protection mechanisms are activated, at 256 mM NaCl leaves reach osmotic adjustment, at 341 mM plant growth is affected and at the highest salinity tested, 512 mM, protective mechanisms are affected in leaves but not in roots.

**Keywords:** *Crithmum maritimum* L., halophyte, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> antiporter, reactive oxygen species, salt stress

## 1. Introduction

Over 6% of land and one third of world-wide irrigated land are considered saline (FAO, 2008). Algeria is no exception: long periods of dryness have resulted in outward signs of soil salinization affecting 3.2 million hectares (Szabolcs, 1989). Faced with the prospect of further dryness due to climate change, urgent measures are being taken to identify, select and introduce species adapted to local conditions. *Crithmum maritimum* L. (sea fennel) is a halophyte typical of coastal ecosystems that shows high salt tolerance during its vegetative growth (Ben Amor et al., 2005). In fact it has been suggested that it may be of value as an oil seed crop in semi-arid saline soils where other oil crops cannot be grown (Atia et al., 2010). Furthermore, *Crithmum maritimum* L. is an aromatic plant that is rich in antioxidant compounds and is already used in the Mediterranean diet (Siracusa et al., 2011). Salt stress results in water deficit, which in turn results in osmotic stress and ionic imbalance (Flowers et al., 2015). At the cellular level one of the major effects of salinity is an accumulation of reactive oxygen species (ROS) including hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) and hydroxyl radical (OH $\cdot$ ) which are damaging to cellular macromolecules (Hossain and Dietz, 2016). These cellular changes produce adverse effects on plant growth and development in salt-sensitive plants (e.g. in rice; Mahdieh et al., 2015). Several mechanisms contribute to halophyte salt tolerance. One mechanism involves sequestering salts in the vacuole to control the cellular  $K^+/Na^+$  ratio through a family of  $Na^+/H^+$  antiporters (Flowers and Colmer, 2008). Many plants also accumulate organic osmolytes in their cytoplasm (Negrão et al., 2017; Dong

et al., 2015). These increase cellular water retention without affecting normal metabolic processes and include soluble sugars, proline, and glycine betaine.

Proline has a protective effect on membranes, proteins and enzymes against damage from a range of abiotic stresses (Ashraf and Foolad, 2007). Glycine betaine is a quaternary ammonium compound that protects the photosynthetic machinery. It does this by accelerating the recovery of PSII from photoinactivation (Hölmstrom et al., 2000). Furthermore, it may directly or indirectly induce  $H_2O_2$ -mediated signalling that increase both the expression and the activity of antioxidant enzymes (Gill and Tuteja, 2010). Plants have evolved both non-enzymatic and enzymatic antioxidative defence mechanisms in order to mitigate the effects of increased ROS during salinity stress. Ascorbic acid is a primary substrate in the cyclic enzymatic pathway that detoxifies hydrogen peroxide (Akram et al., 2017). The enzymatic defence system consists of a battery of enzymes that interconvert ROS moieties into the less damaging  $H_2O_2$ , and then remove it. These include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) (Hossain and Dietz, 2016). Catalases (CAT) degrade the  $H_2O_2$  by its dismutation to water and oxygen.

Given the interplay of these multiple detoxification and tolerance mechanisms, the current study aimed to resolve the deployment of these strategies in an Algerian population of the halophyte *Crithmum maritimum*. As salt concentrations were ramped up over a six week treatment period, deployment of different strategies came into play indicating a complex regulation of salt tolerance in this species.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant material and growth

*Crithmum maritimum* seeds were collected from the Northern Algerian coastline (province of Tipaza: 36° 35' 22" N, 2° 26' 50" E). This area is characterized by an annual precipitation of 600 mm (1978-2004) (Boudjelal, 2007). The annual average temperature is around 18 °C (1990-2005) with average temperatures around 11 °C in winter (December-February) and 25 °C in summer (June -August). *Crithmum maritimum* grows on rocky headlands and sandstone slabs from the Pleistocene and Early Pliocene overlooking the sea. Because of the exposure of this area to salty sea winds, the plants growing here are frequently subjected to sea water spray and sea water (55.38 dSm<sup>-1</sup>; Khelifi *et al.*, 2013).

Seeds were sown in pots (10 -15 seedlings per pot with six replicate pots) containing medium coarse sand

which had been washed and then dried, acting as an inert support for the plants. Following sowing, seeds were watered with distilled water. Once cotyledons appeared, plants were irrigated with a nutrient solution at pH 5.6 (Morard, 1995). Just after the first leaf pair appeared (10 days after sowing), salt treatments were applied (NaCl concentrations: 0, 34, 85, 171, 256, 341, 427 and 512 mM) for six weeks. Six replicate pots were set up for each salt concentration in a homogeneous completely randomized design. Electrical conductivity was checked (Table 1) throughout the 6 week growing period and was constant.

All plant growth was in a Phytotron growth cabinet at 25 °C, with a photoperiod of: 16 hours light / 8 hours darkness and at 90 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> using warm white fluorescent tubes. After 1, 2 and 6 weeks under saline conditions, leaves and roots were sampled randomly from more than one plant for each analysis. Roots were not washed prior to analyses as the sandy medium was easy to remove.

**Table 1.** Electrical Conductivity of different treatments

NaCl concentration (mM)	0	34	85	171	256	241	427	512
Electrical Conductivity (ms) at 25°C	2.34	5.78	10.93	18.75	25	34.25	43	54.14

The % survival and plant growth were determined on the seedlings after six weeks for each of the six replicate pots. Relative growth rate (RGR) was calculated from the shoot height data over time (Wang, 2011). Relative water content (RWC) in leaves and roots,

was determined on three replicate samples that were dried in an oven at 105 °C to a constant dry weight and was calculated using the following formula: RWC (%) = (FW – DW)/ FW X 100 where FW indicates fresh weight and DW indicates dry weight.

## 2.2. Metabolite analyses and enzyme activity measurements

Ion ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) and osmolyte (proline and soluble sugars) concentration, and chlorophyll content were measured in leaves and roots over time (after 1, 2 and 6 weeks for leaves; 2 and 6 weeks for roots).  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  were analysed by flame photometry (using a Cecil 6000 series spectrophotometer). After drying for 1 h at 105 °C, 100 mg of each triplicate dry sample were placed in a cold muffle furnace, raising the temperature gradually to 520 °C (for 2 h) and then left overnight to cool. Following 15 mins in a desiccator, samples were dissolved in 2 mL  $\text{HNO}_3$  (0.5N) and were then boiled for 20 min. They were then filtered, and the volume was adjusted to 50 mL with distilled water. The  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  ratio was calculated following analysis by flame photometry.

Chlorophyll extraction was performed as described by Plummer (1989): 100 mg of leaf tissue (in triplicate) was ground in 80% acetone. Extracts were then centrifuged at 3000 rpm for 10 min in an Eppendorf mini-spin microcentrifuge. Absorption of the supernatant was measured at 652 nm. To calculate the amount of chlorophyll the formula: chlorophyll mg/mL = absorbance at 652 nm  $\times$  5.8, was used then converted to  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW.

Proline was determined by spectrophotometry (Troll and Lindsley, 1955). Plant material (triplicate samples of 100 mg) was suspended in 2 mL of 40% ethanol and heated to 85 °C in a water bath for 60 min. After cooling, 1 mL of ninhydrin reagent was added (ninhydrin reagent consisted of 120 mL distilled water, 300 mL of acetic acid, 80 mL acetic orthophosphoric acid, at a density of 1.7, and 25 mg of ninhydrin). After boiling the mixture for 30 min and then cooling, benzene (5 mL) was added to each tube. The upper phase was used for the measurement of proline concentration by spectrophotometry at 528 nm.

Soluble sugar content was measured according to the anthrone method (Plummer, 1989). Triplicate, 100 mg plant material samples were macerated in 3 mL 80% ethanol and stored for 48 hours. Samples were heated to 70 °C for 30 minutes and then diluted 10 fold with 80% ethanol. Two mL of the sample were then added to 4 mL of anthrone reagent (0.2 g of anthrone in 100 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). The samples were heated for 8 min to 92 °C, and cooled for 30 min on ice in the dark. Absorbance was measured at 585 nm.

Glycine betaine was measured by spectrophotometry (Grieve and Grattan, 1983). Triplicates of plant tissue (150 mg) were dried to constant weight at 80 °C. After grinding to a fine powder, they were shaken at 25 °C with 20 mL deionised water for 24 h. Samples were filtered through Whatman filter paper and filtrates were diluted to 1:1 with 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Samples were cooled in ice/water for 1 h and then cold KI-I2 reagent (15.7 g iodine and potassium iodide (20 g) dissolved in 100 mL of water) was added and they were vortexed rapidly. Following storage of the samples at 4 °C for 16 h, they were centrifuged at 0 °C and 10,000 g for 15 min using an Allegra Beckman Coulter microcentrifuge. The supernatant was then carefully removed with a fine glass tube. The periodide crystals were dissolved in 9 mL of 1,2-dichloroethane. Following storage for 2 h at room temperature, absorbance at 365 nm was measured. Glycine betaine (Sigma Aldrich Poole. UK) was used as a standard, and glycine betaine content of the plant samples was expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  DW.

Total solute concentration in roots and leaves over time was calculated by dividing the sum of proline, glycine betaine, soluble sugars and  $\text{K}^+$  concentrations by the amount of water present in the plant tissue, based on % relative water content of the tissue.

Ascorbic acid was analyzed by HPLC following extraction using a freezing procedure (Nojavan et al., 2008). Triplicate 100 mg samples of plant material were snap frozen in liquid nitrogen. Samples were then

mixed with 5 mL of 5% metaphosphoric acid (MPA). The mixture was homogenized for 5 min and then was centrifuged for 10 min at 2000 rpm in an Allegra Beckman Coulter microcentrifuge. All extractions were conducted at 4 °C in reduced light. HPLC analysis was performed using an isocratic elution procedure and a UV Detector at 240 nm. Separation was on a 5 µm RP C18 column of 250 mm × 4.6 mm (Kinetex-Phenomenex) with a mobile phase of 0.5% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2.25 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) - acetonitrile (2% of final volume). Quantitative analyses were performed using an injection volume of 20 µl. Amber flasks were used for all standard solutions and samples to avoid loss of the ascorbic acid, due to light exposure.

After six weeks of salt stress, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in leaves was measured using an Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen). Leaf tissue (in triplicate) was ground in liquid nitrogen, then to each 50 mg of ground frozen tissue, 500 µl of phosphate buffer (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.5) were added and samples were centrifuged for 5 min at 13 000 rpm in an Eppendorf minispin microcentrifuge. Horseradish peroxidase (0.2 U mL<sup>-1</sup>) and 100 mM Amplex Red reagent (10-acetyl-3,7-dihydrophenoxazine) were added to 50 µl of the supernatant and the reaction was incubated at room temperature in the dark for 30 min. Absorbance at 560 nm was measured using an Infinite 200 PRO microplate reader (Tecan, Switzerland).

Catalase activity was determined following the method of Aebi (1984). Leaf tissue (250 mg in triplicate) was ground with polyvinylpyrrolidone (10% w/w) and 10 mL of 100 mM K-phosphate buffer (pH 7.0), and the homogenate filtered through four layers of cheesecloth. The filtrate was then centrifuged at 27 000 × g at 4 °C for 20 min and the supernatant was used for the enzyme activity assay. The enzyme extraction procedure was carried out at 0-4 °C throughout. To determine catalase activity, the reaction mixture (1 mL) comprised

0.05 mL of enzyme extract, 50 mM K-phosphate buffer (pH 7.0), 0.1% (v/v) Triton X-100, and 0.1 mL of 10.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution. The reaction was at 25 °C for 2.5 min. The amount of enzyme which breaks down 1 µmol of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> under the assay conditions described is defined as one unit of catalase activity.

### 2.3. RNA extraction and Real time PCR

RNA extractions were performed using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) and contaminating genomic DNA was removed on the column. cDNA was synthesized using an Ambion kit (RETROscript<sup>®</sup> Reverse transcription for RT-PCR) and 2 µg of extracted RNA. Real time PCR was performed using an Absolute TM QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Mix (Thermo Scientific) kit. Reactions, in a total volume of 25 µl, contained: 5 µl of cDNA (diluted 1:20), 12.5 µl of Absolute TM QPCR SYBR<sup>®</sup> Green Mix, 1.75 µl of each primer (10 µM) and 4 µl H<sub>2</sub>O. Triplicate reactions were cycled in an MJ Research OPTICON TM 2, at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s and one cycle of 72 °C for 30 s. For verifying primer specificity, melting curve analysis (from 60 °C to 98 °C with an increasing heat rate of 0.5 °C s<sup>-1</sup>) was carried out after amplification. The relative quantification of the gene expression data was calculated using the 2<sup>-DDCT</sup> or comparative CT method (Livak and Schmittgen, 2001). Mt18S rRNA primers (Mt 18S-F: TGACGGAGAATTAGGGTTCG and Mt 18S-R: CCTCCAATGGATCCTCGTTA) (El Maghrabi *et al.*, 2013) were used for normalization. Primers for the *Crithmum maritimum* antiporter gene (Na-HF: GATGTGGGAAACGAAACC and Na-HR: CAAATTGTTGGTGCTTTGTT), were derived from alignment of sequences from *Atriplex dimorphostegia* (AY211397) and *Atriplex gmelini* (AB038492). The *C. maritimum* PCR products were sequenced fully

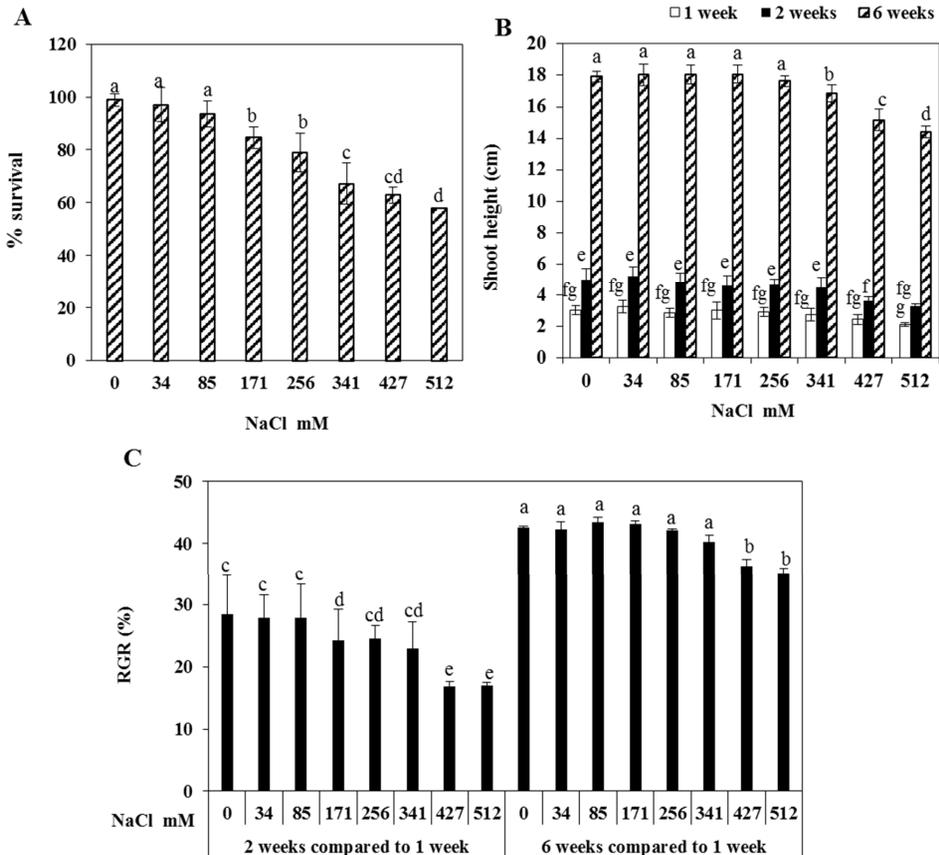
2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using StatBox6 and R software (R version 2.15.3, R Foundation for Statistical Computing). One –way or 2-way ANOVA tests were used, as appropriate, to analyse all the data sets, and where significant ( $P < 0.05$ ) interactions or mean effect were found, a Newman-Keuls test was used, consolidated by a Tukey’s test.

3. Results

3.1. Seedling survival, plant growth and chlorophyll content under saline stress

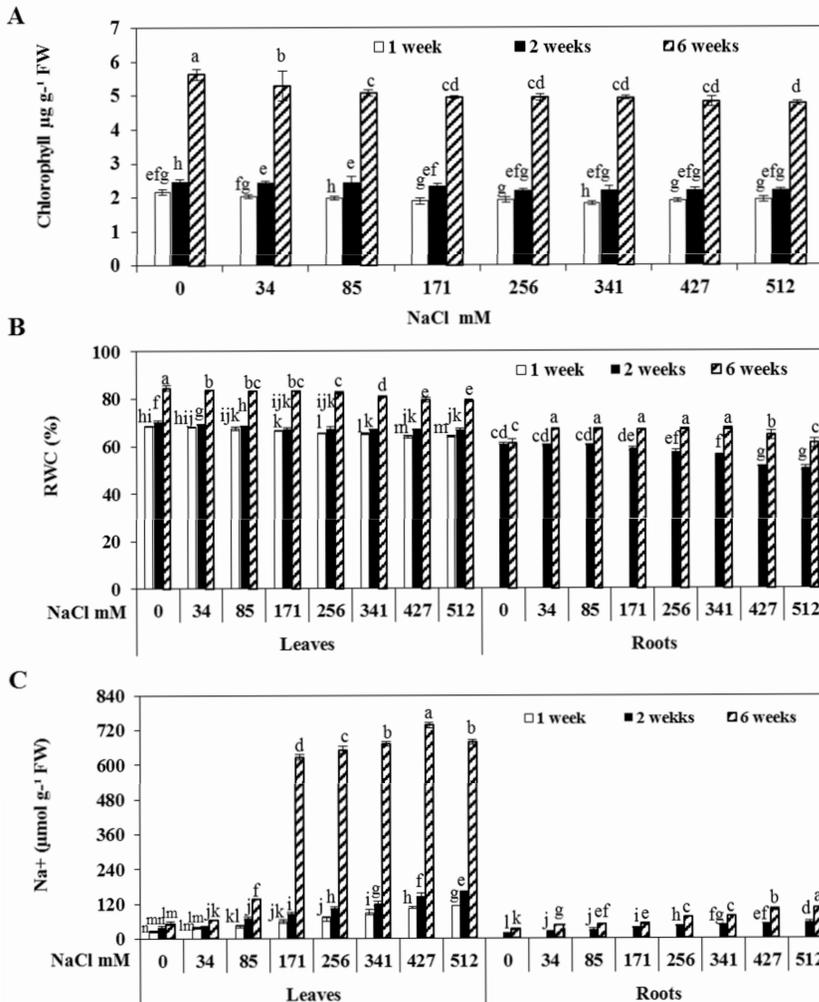
Six weeks growth under saline stress resulted in significantly reduced seedling survival above 85 mM NaCl which was reduced again at 341 mM NaCl ( $P < 0.05$ ). At the highest concentration tested (512 mM NaCl), survival was reduced to  $58\% (\pm 3.0)$  of the non-stressed controls where survival was  $99 \pm 1.7\%$  (Figure 1A).



**Figure 1.** Growth and survival of *Crithmum maritimum* seedlings under salt stress. Mean percentage survival per pot after 6 weeks (A), shoot height over time per pot (B), RGR (% shoot height) after 2 weeks compared to 1 week and 6 weeks compared to 1 week (C). Mean  $\pm$  S.D; different letters above the bars indicate significant differences based on a Tukey’s test ( $P < 0.05$ ) across all samples ( $n = 6$ ).

This was accompanied by a significant reduction in shoot height at > 341 mM NaCl with a maximum reduction at 512 mM of 18% compared to the controls after 6 weeks (Figure 1B). The relative growth rate (RGR) of shoot height was significantly lower between the first and second week at NaCl concentrations >341 mM (Figure 1C). After 6 weeks (relative

to growth after 1 week), a significant effect of salt stress on RGR was recorded at NaCl concentrations > 256 mM with a further significant reduction at 427 and 512 mM NaCl. Although chlorophyll levels rose during the 6 week period as the leaves developed, the effect of the salinity treatment became more pronounced with time (Figure 2A).



**Figure 2.** Chlorophyll content (A), relative water content (RWC) (B) and Na<sup>+</sup> accumulation (C) of *Crithmum maritimum* seedlings over time under salt stress. Mean ± S.D.; n = 3; different letters above the bars indicate significant differences based on a Tukey’s test (P < 0.05) across all samples.

After 2 weeks chlorophyll levels were slightly but significantly reduced at all salinity concentrations; at 6 weeks the effects of salinity treatments could be divided into three tiers. The first tier is represented by the control plants which had the highest chlorophyll content. At 34 mM NaCl concentration and above, chlorophyll levels were reduced, and the effect was significantly greater at 85 to 512 mM NaCl.

### 3.2. Ion accumulation $\text{Na}^+/\text{H}^+$ antiporter gene expression and relative water content in seedling roots and leaves under saline stress.

In both leaves and roots, relative water content (RWC) fell significantly with increasing NaCl concentration, but rose with time (Figure 2B). After 6 weeks relative water content was affected differentially in roots and leaves. Leaf relative water content fell significantly at NaCl levels of just 34 mM whereas in roots, it was in fact higher at 34 mM NaCl compared to no salt controls but then remained stable until 427 mM NaCl. The magnitude of the effect also differed significantly ( $P < 0.05$ ): while leaves lost only 6% of their relative water content, roots lost 9%.

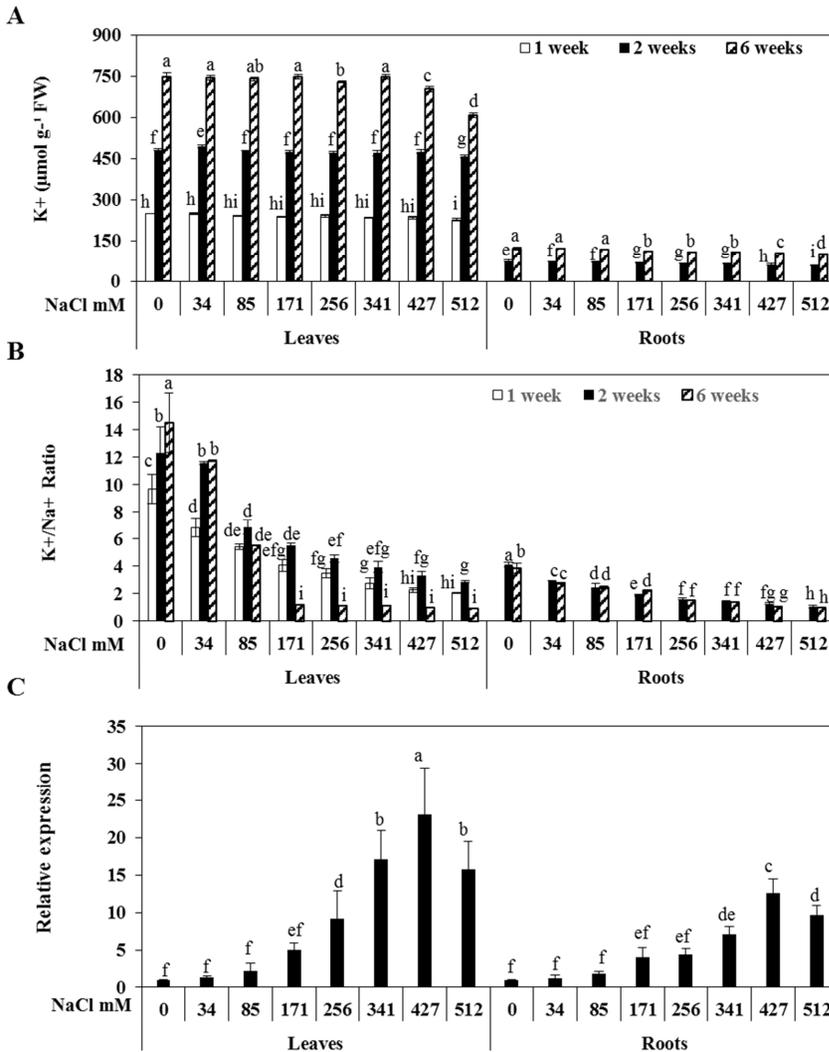
The increase in  $\text{Na}^+$  was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in leaves compared to the roots (Figure 2C). The difference became more pronounced over time with about a 3-fold difference after 2 weeks and a 6-fold difference after 6 weeks at the highest salt concentration tested. Effects of salinity treatments also differed between the two organs. In leaves the effect of salinity became much more pronounced after 6 weeks of treatment with a sudden almost 6-fold increase between 85 mM and 171 mM treatments. In the roots, however, the sudden increase in  $\text{Na}^+$  occurred at a higher concentration of  $\text{Na}^+$  (256 mM) and was less dramatic with only a 1.4-

fold increase, although a further 1.4- increase was noted between 341 and 427 mM NaCl.

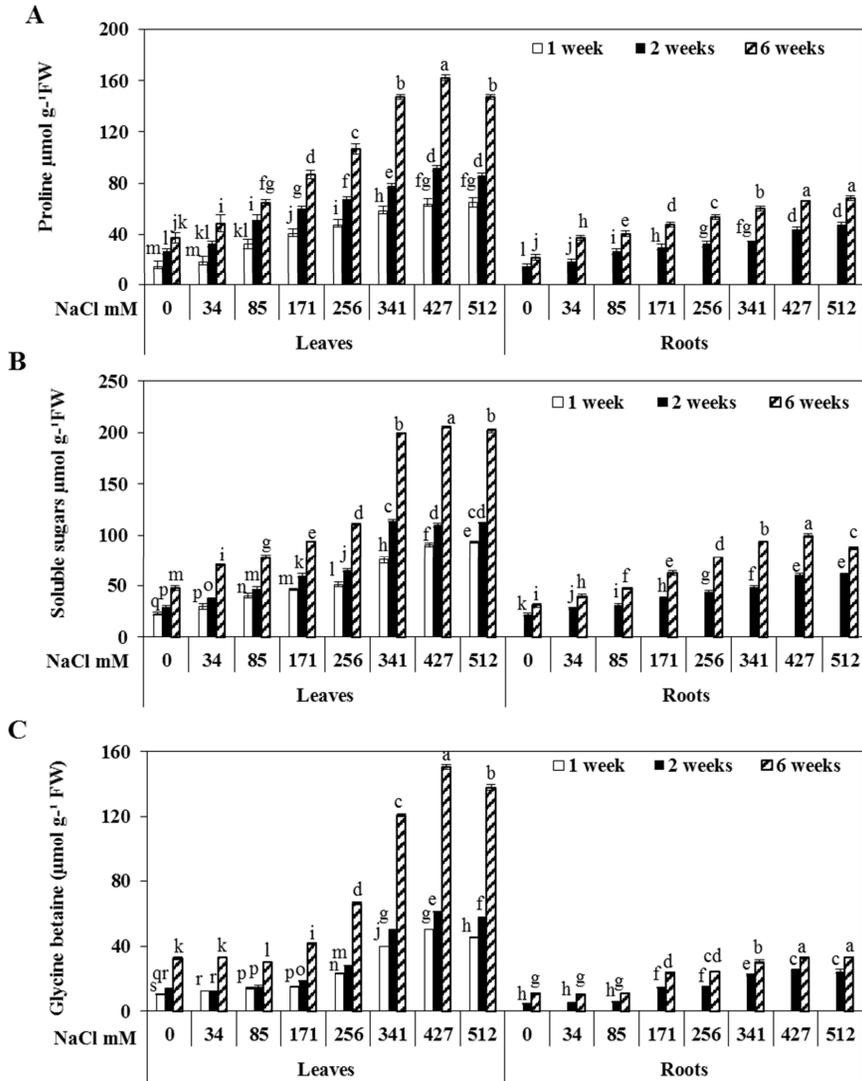
In control seedlings,  $\text{K}^+$  levels increased in both leaves and roots over time, to a similar extent (1.6-fold increase between 2 and 6 weeks; Figure 3A). Following 2 weeks of treatment,  $\text{K}^+$  levels in seedling leaves were relatively constant at most salt treatment concentrations compared to the control. However, after 6 weeks  $\text{K}^+$  concentration fell significantly, by 19%, at 512 mM ( $607 \pm 8$  compared to the control at  $747 \pm 16 \mu\text{molg}^{-1}$  FW). This pattern was different from that in roots: here  $\text{K}^+$  accumulation fell substantially (by 24%) even after only two weeks at 512 mM NaCl compared to the control ( $57 \pm 2$  compared to the control at  $75 \pm 3 \mu\text{molg}^{-1}$  FW; Figure 4A). After six weeks of salt treatment at 512 mM NaCl, root  $\text{K}^+$  seemed to have recovered a bit as it was only 18% lower than the control  $99 \pm 2$  compared to the control at  $120 \pm 4 \mu\text{molg}^{-1}$  FW.

Changes in relative  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  concentrations resulted in a fall of the  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  ratio with NaCl increases at all three time points in both seedling leaves and roots (Figure 3B). However, the pattern of change differed markedly between time points and between the two organs. Whereas the decrease was gradual at the earlier time points in both organs, by 6 weeks there was a dramatic decrease in  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  ratio in leaves between 85 and 171 mM NaCl treatments. In roots however, there seemed to be a more gradual decline in the ratio with increasing salinity.

The changes in  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  accumulation were reflected in an induction of the *Crithmum maritimum*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene expression in leaves and roots under salt treatment (Figure 3C). Expression increased significantly at  $\geq 256$  mM NaCl in leaves and rose to a maximum expression at 427 mM NaCl before falling back at 512 mM NaCl. In roots the pattern of induction was similar: expression was induced at a lower salinity of 171 mM NaCl but again reached a maximum at 427 mM NaCl before falling back at the highest salt concentration tested.



**Figure 3.** K<sup>+</sup> accumulation (A), K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio (B) of *Crithmum maritimum* seedlings over time under salt stress. Relative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter expression (C) after 6 weeks under salt treatment. Mean ± S.D.; n = 3 (A and B); n = 6 (C); different letters above the bars indicate significant differences based on a Tukey’s test (P < 0.05) across all samples.



**Figure 4.** Proline concentration (A), soluble sugars concentration (B) and glycine betaine concentration of *Crithmum maritimum* seedlings over time under salt stress. Mean  $\pm$  S.D; n = 3 (A and B); n = 6 (C); different letters above the bars indicate significant differences based on a Tukey’s test ( $P < 0.05$ ) across all samples.

### 3.3. Induction of osmolyte accumulation in leaves and roots

There was a significant increase in proline in both the leaves and the roots with increasing NaCl concentrations. However after 1 week the maximal concentration of proline in the leaves was recorded at the highest two NaCl concentrations tested (427 mM and 512 mM; Figure 4A) while after 2 and 6 weeks, proline concentration peaked at 427 mM ( $162 \pm 2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ ) and then fell back at 512 mM NaCl. In contrast, root proline concentration continued to increase with increasing salt concentration up to and including 512 mM NaCl even after 6 weeks of treatment. After 6 weeks of treatment there was a marked rise in proline between 256 and 341 mM NaCl in leaves, whereas this threshold effect was not seen in the roots.

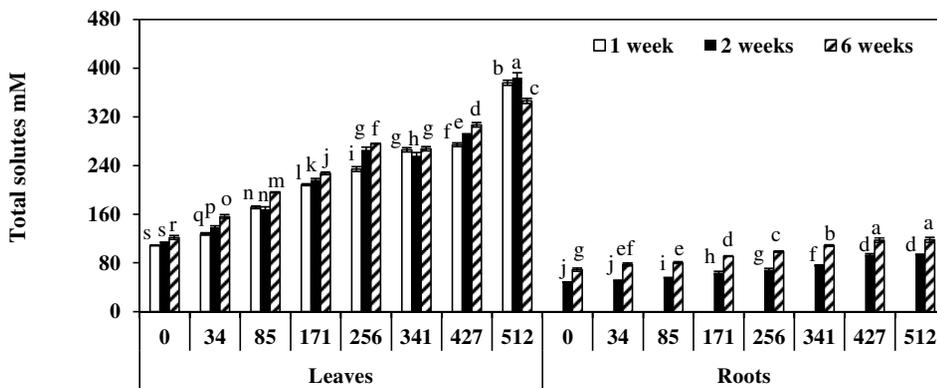
Soluble sugar concentration in leaves and roots also rose significantly with increasing time and NaCl concentration (Figure 4B). However, the 256 to 341 mM threshold effect noted with proline concentration in leaves, was seen with leaf soluble sugars after only 2 weeks as well as after 6 weeks and again was not evident in the roots. In leaves, soluble sugar concentration reached a maximum at 427 mM NaCl with only a slight reduction in level at the highest salt concentration. In contrast soluble sugar accumulation in roots after 6 weeks clearly peaked at 427 mM NaCl and fell significantly at 512 mM NaCl. Glycine betaine accumulation was also induced with increasing salinity. In leaves again a threshold effect between 256 to 341 mM NaCl was evident after 6 weeks and concentrations fell at the highest salinity tested (Figure 4C). In roots however, after

6 weeks, there were two notable rises in glycine betaine concentration: between 85 and 171 mM and between 256 and 341 mM NaCl. Furthermore, in roots glycine betaine concentrations remained high even at the highest salt concentration tested whereas in leaves they fell significantly at 512 mM NaCl. Over time, glycine betaine concentrations increased significantly in both tissues at most salt concentrations, however the most dramatic increases were seen at the higher NaCl concentration between 2 and 6 weeks in leaves.

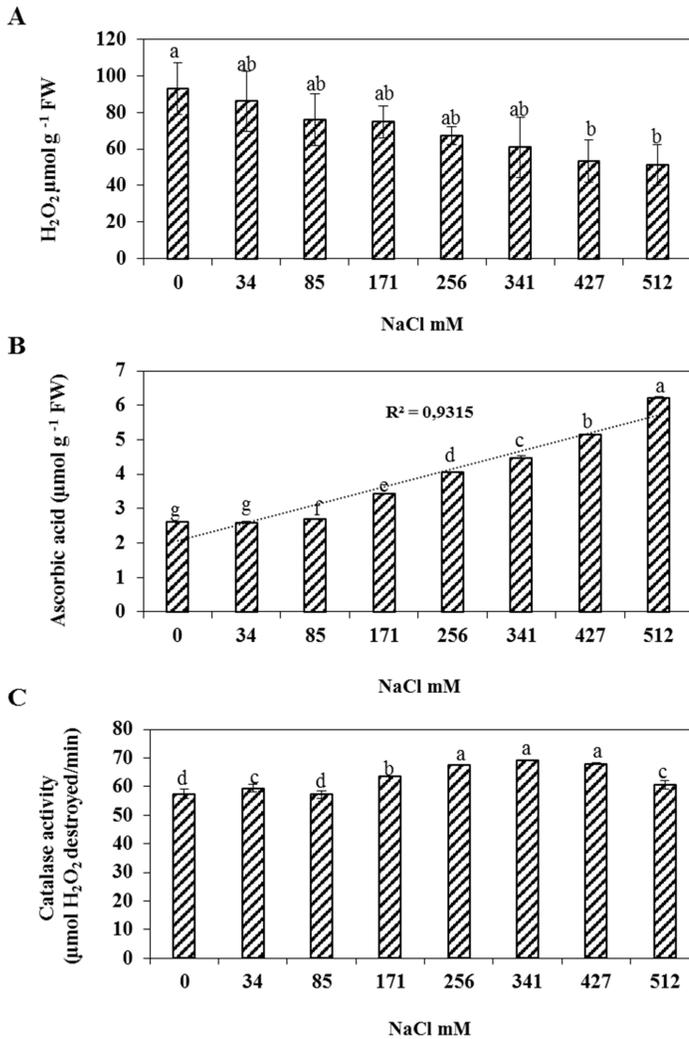
In leaves the total internal solutes were greater than external solute concentration up to about 256 mM NaCl, while in roots this threshold was reached at 85 mM NaCl, indicating that this is the point at which osmotic adjustment occurs. However, this is clearly an estimate, as other cellular solutes which were not measured here will contribute to the total internal solute concentration (Figure 5).

### 3.4 Antioxidant capacity and catalase activity rose with increasing salinity, while ROS levels fell.

Leaf  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration fell significantly between control (no salt) and plants exposed to the highest two salt concentrations (Figure 6A). In contrast seedling leaves accumulated ascorbic acid in response to saline treatment with a linear increase with increasing NaCl concentration from 34-512 mM NaCl (Figure 6B) and the highest accumulation at 512 mM. Catalase activity was also induced by the saline treatment in leaves of *C. maritimum*. However the activity was only consistently greater than control levels at 256-427 mM NaCl, falling back again at 512 mM NaCl (Figure 6C).



**Figure 5.** Total internal solutes (expressed in mM) of *Crithmum maritimum* seedlings over time against total external solutes comprising NaCl (0, 34, 85, 171, 256, 341, 427, 512 mM) and total nutrient solutes of 32.1 mM. Mean  $\pm$  S.D; n = 3; different letters above the bars indicate significant differences based on a Tukey's test (P < 0.05) across all samples.



**Figure 6.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (A), Ascorbic acid concentration (B) and catalase activity (C) in leaves of *Crithmum maritimum* seedlings. After 6 weeks (means ± S.D ; n = 3 ; different letters above the bars indicate significant differences based on a Tukey’s test (P < 0.05) across all samples for B and C, while for A, letters indicate differences based only on the salt concentration).

#### 4. Discussion

The reduced growth of *C. maritimum* under elevated salt treatments was in agreement with previous reports (Ben Hamed *et al.*, 2004; Ben Hamed *et al.*, 2007; Ben Amor *et al.*, 2005). However here effects on shoot height were only significant at  $\geq 341$  mM NaCl whereas in the Tunisian population studied by Ben Hamed *et al.* (2004), biomass after 5 weeks as well as leaf number and total leaf area were affected even at 150 mM NaCl. This suggests that the Algerian population studied here was substantially more salt tolerant. Ben Hamed *et al.* (2004) saw no chlorosis even at 300 mM NaCl. The more sensitive chlorophyll measurements made here indicate some loss of chlorophyll even at low salt concentrations of  $> 34$  mM after similar periods of treatment, although losses were relatively small even at the highest salt concentrations applied. This suggests that the salt stress imposed was not inducing premature senescence as it does on less salt-tolerant species (e.g. pomegranate; Mastrogiannidou *et al.*, 2016), although it may be contributing to the reduced growth even in halophytes such as *C. maritimum* through reduced carbon fixation as previously suggested (Flowers and Colmer, 2008). The apparently better growth of the plants in their natural habitat was ascribed by Ben Hamed *et al.* (2004) to small differences in growth conditions or, more likely, a protection of the root system from extremes of salt due to their growth in rock crevices. The Algerian population used here also grew vigorously very close to the sea indicating a similar protection of the roots from the saline water.

Maintaining a high  $K^+/Na^+$  ratio is likely to be important to avoid effects of ion toxicity under salt stress (Flowers *et al.*, 2015). Although this ratio dropped dramatically with increasing salinity, even after 6 weeks it remained relatively constant between 171 and 512 mM NaCl. A clear difference was seen, however,

in the accumulation of  $Na^+$  between roots and shoots, consistent with the studies of Tunisian *C. maritimum* populations (Ben Hamed *et al.*, 2004; Ben Amor *et al.*, 2005). In both the Tunisian *C. maritimum* (Ben Hamed *et al.*, 2004), and the Algerian population reported here, there was a sudden increase in shoot  $Na^+$  accumulation at  $> 100$  mM NaCl. However, whereas in the Tunisian *C. maritimum* roots,  $Na^+$  accumulation plateaued after 100 mM NaCl, the Algerian *C. maritimum* roots continued to accumulate increasing  $Na^+$  concentrations with increasing salinity up to the maximal level of 512 mM tested. Thus, the increased tolerance to salinity seen in the Algerian population here is not due to better exclusion of the  $Na^+$  from the roots. Leaf relative water content changes also differed between the Algerian *C. maritimum* presented here and the Tunisian populations previously studied (Ben Hamed *et al.*, 2004; Ben Amor *et al.*, 2005). Whereas the relative water content remained stable in the Tunisian *C. maritimum* populations, here a significant loss in relative water content was seen at concentrations of  $> 85$  mM NaCl. In contrast, root relative water content remained much more stable up to 427 mM NaCl, linked presumably to the lower accumulation of  $Na^+$ . In both tissues, loss of relative water content seems to be linked to  $Na^+$  accumulation of  $> 100 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW, which may therefore be a threshold level of  $Na^+$  before water retention is affected. Differences between the Algerian and Tunisian *C. maritimum* response may also be due to the maturity of the plants used since the Tunisian *C. maritimum* plants were already 1 month (Ben Amor *et al.*, 2005) or 2 months (Ben Hamed *et al.*, 2004) old when the saline treatments were applied. Alternatively the method of treatment may have affected the outcome: here salinity was imposed directly to simulate natural conditions where changes in salinity can occur rapidly; the previous studies (Ben Hamed *et al.*, 2004; Ben Amor *et al.*, 2005) applied the salinity treatments gradually.

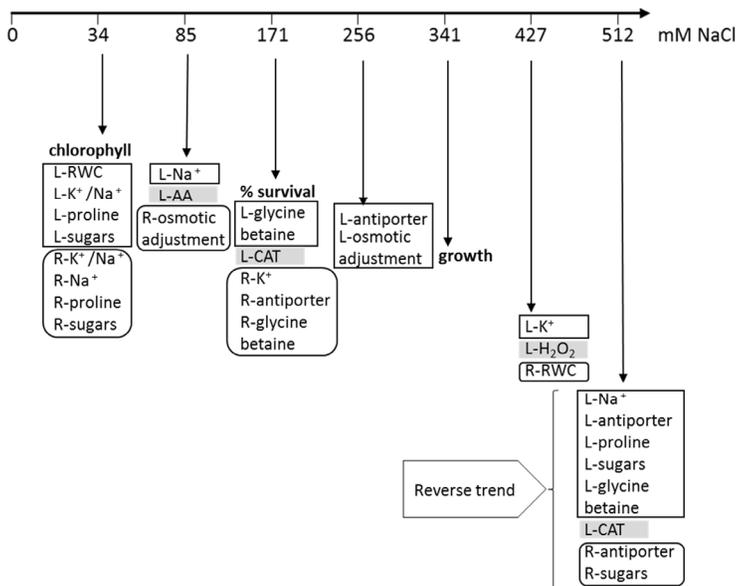
Despite the increases in  $\text{Na}^+$  accumulation,  $\text{K}^+$  concentrations remained remarkably stable up to 427 mM NaCl in leaves, while there was a gradual decline in root  $\text{K}^+$  concentration from 171 mM NaCl. This again contrasts with the previous studies (Ben Hamed *et al.*, 2004; Ben Amor *et al.*, 2005) where both leaf and root  $\text{K}^+$  concentrations fell dramatically between the no salt control and a 50 mM NaCl treatment. Again, this suggests a better resilience of the Algerian population to the salt stress. Part of this resilience may be due to the induction of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene expression, which rises significantly at  $\geq 256$  mM and 171 mM NaCl in leaves and roots respectively. It is assumed, based on experimental evidence from other halophytes (Flowers and Colmer, 2008) that the activation of the antiporter in *C. maritimum* is important for  $\text{Na}^+$  sequestration into the vacuole. Its activation in both organs contrasts with *Mesembryanthemum crystallinum* L where expression of subunit E of the vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase, required for  $\text{Na}^+$  transport into the vacuole, was only upregulated in leaves but not roots in response to salt (Golldack and Dietz, 2001). However the *M. crystallinum* gene expression was only studied following a very short salt exposure of 72 h so it may be that both root and leaf  $\text{Na}^+$  transport into the vacuole only become important after prolonged salt exposure. The reduction in expression of the *C. maritimum*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter at 512 mM NaCl in both organs is presumably linked to a failure of the salt tolerance mechanisms which may be down-regulating transcription of many genes and which is also seen in the significant reduction of shoot height and  $\text{K}^+$  concentration at this level of salinity.

Despite the importance of osmolyte production in halophytes, known to mitigate effects of saline stress by providing cytoplasmic osmotic adjustment (Flowers *et al.*, 2015), to our knowledge this is the first analysis of these metabolites in *C. maritimum*. All three osmolytes analysed here: proline, glycine

betaine and soluble sugars accumulated with increasing salt concentrations as has been found for other halophytes (Flowers and Colmer, 2008). Increase in proline was not as high as is some halophytes such as *Mesembryanthemum crystallinum* L., where the increase is  $> 10$ -fold (Sanada *et al.*, 1995) but its concentration was still significantly (3 to 4-fold) induced. It was proposed (Tipirdamaz *et al.*, 2006), that there was an inverse relationship between proline and glycine betaine accumulation amongst halophyte species. However, *C. maritimum* does not appear to follow this trend since both osmolytes accumulated to similar extents in both roots and leaves. All three osmolyte concentrations increased substantially between 256 and 341 mM NaCl suggesting that as salinity rises above 300 mM osmolytes become particularly important in *C. maritimum*. Concentrations of all three osmolytes also fell in leaves at 512 mM NaCl supporting the hypothesis that at this high salt level transcription and/ or biosynthetic pathways are being affected. At this salt level, the concentration of soluble sugars fell back also in roots, however concentrations of proline and glycine betaine remained stable suggesting that their biosynthesis was not being inhibited, and that at this very high salt concentration their action as osmolytes may be important for cellular protection. By considering the total concentration of solutes measured here, which are considered to be the major contributors to osmotic adjustment (Singh *et al.*, 2015) it was possible to estimate the concentration at which osmotic adjustment occurs. Unlike some other halophytes such as *Atriplex mummularia* (Silveira *et al.*, 2009) osmotic adjustment appeared to occur in both leaves and roots of *C. maritimum*. However, this occurred at very different concentrations of external salts: with roots the osmotic adjustment occurred at 85 mM NaCl maximally, while in leaves that maximum was reached at 171 mM. One reason proposed for a growth reduction at high salinity is an increase in

reactive oxygen species causing cellular damage. A rise in markers for lipid peroxidation has been seen in several halophytes at >300 mM NaCl even over short treatments (Ben Hamed *et al.*, 2007). However an increase in ROS seems an unlikely explanation for the growth effects in *C. maritimum*. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations in fact decreased with increasing salinity while ascorbic acid concentrations rose, indicating that redox status was not adversely affected. Catalase activity also increased with salinity indicating an induction of protective antioxidant mechanisms which may be resulting in the maintenance of redox balance. This

contrasts with a previous report on a Tunisian population of *C. maritimum* (Ben Hamed *et al.*, 2007) where H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations rose while ascorbic acid concentrations and catalase activity fell as salinity was increased to 300 mM NaCl. This further suggests that the Algerian population studied here is less affected by the salinity. A fall in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and induction of CAT activity in response to increased salinity has been reported for other halophytes (e.g. *Atriplex halimus* and *Nitraria retusa*, Boughalleb *et al.*, 2010) indicating that the response of the *C. maritimum* population reported here is not entirely anomalous.



**Figure 7.** Diagram of changes in physiological (bold), metabolite, enzyme activity and gene expression changes with increasing salinity after 6 weeks growth of *Crithmum maritimum*. L= leaf (square box); R= root (rounded box); RWC (relative water content); shaded box = ROS regulation.

## 5. Conclusions

Overall the response to increased salinity in this population of *Crithmum maritimum* seems to involve concentration thresholds which activate different tolerance mechanisms (Figure 7). Already at 34 mM NaCl concentration, some osmolyte production is upregulated, but protective mechanisms in leaves, and some signals of stress are evident. At 85 mM NaCl roots reach osmotic adjustment, and at 171 mM further osmolyte protection mechanisms are upregulated in both, leaves and roots but % survival has been compromised. At 256 mM NaCl leaves reach osmotic adjustment and at 341 mM plant growth is affected suggesting that tolerance mechanisms are struggling to overcome the stress. Finally at 512 mM all leaf osmolyte levels but only soluble sugars fall in roots, and catalase activity is reduced, indicating that at this very high salinity concentration, most protective mechanisms in leaves are unable to be sustained. In roots however, where Na<sup>+</sup> concentrations are still increasing, stress is less severe enabling some growth to continue.

## Acknowledgements

We thank Mike O'Reilly for assistance with the metabolite analyses. This work was supported by the Algerian Government and Cardiff University, UK.

## References

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105, 121-126.
- Akram, N.A., Shafiq, F., Ashraf, M. 2017. Ascorbic acid - a potential oxidant scavenger and its role in plant development and abiotic stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 8, 613.
- Ashraf, M., Foolad, M.R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Env. and Exper. Bot.* 59, 206–216
- Atia, A.A., Debez, A., Barhoumi, Z., Abdelly, C., Smaoui, A.R. 2010. Localization and composition of seed oils of *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae). *African J. of Biotechnol.* 39, 6482-6485.
- Ben Amor, N., Ben Hamed, K., Debez, A., Grignon, C., Abdelly, C. 2005. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. *Plant Sci.* 168, 889–899.
- Ben Hamed, K., Debez, A., Chibani, F., Abdelly, C. 2004. Salt response of *Crithmum maritimum*, an oleagineous halophyte. *Tropical Ecol.* 45, 151-159.
- Ben Hamed, K., Castagna, A., Elkahoui, S., Ranieri, A., Abdelly, C. 2007. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Reg.* 53, 185-194.
- Boudjelal, A.A. 2007. Determination of the water needs of crops using cropwat 4.3 software in the province of Tipaza. Thesis to obtain the status of engineering degree in Agronomy. National Agronomy Institute, Algeria, 95 p.
- Boughalleb, F., Mhamdi, M., Hailaoui, H., Denden, M. 2010. Salinity effects on organic solutes and antioxidative enzymes in two halophytes, *Nitraria retusa* (Forssk) and *Atriplex halimus* (L.). *Research J. of Biol. Sci.* 5, 773-784.
- Dong, Y.J., Wang, Z.L., Zhang, J.W., Liu, S., He, Z.L., He, M.R. 2015. Interaction effects of nitric oxide and salicylic acid in alleviating salt stress of *Gossypium hirsutum* L. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 15, 561-573.
- El Maghrabi, A.M., Ochatt, S., Rogers, H.J., Francis, D. 2013. Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 114, 61-70.

- Flowers, T.J., Colmer, T.D. 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New Phytol.* 179, 945–963.
- Flowers, T.J., Munns, R., Colmer, T.D. 2015. Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Ann. Bot.* 115, 419–431.
- Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. and Biochem.* 48, 909–930.
- Golldack, D., Dietz, K.J. 2001. Salt-induced expression of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. *Plant Physiol.* 125, 1643–1654.
- Grieve, C.M., Grattan, S.R. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil.* 70, 303–307.
- Hölmstrom, K.O., Somersalo, S., Mandal, A., Palva, T.E., Welin, B. 2000. Improved tolerance to salinity and low temperature in transgenic tobacco producing glycine betaine. *J. Exp. Bot.* 51, 177–185.
- Hossain, M.Z., Dietz, K.J. 2016. Tuning of Redox Regulatory Mechanisms, Reactive Oxygen Species and Redox Homeostasis under Salinity Stress. *Front. Plant Sci.* 7, 548.
- Khelifi, H., Bioret, F., Farsi, B. 2013. Apport à la connaissance syntaxonomique du littoral rocheux ouest-algérois. *Acta Bot. Gallica.* 155, 163–177.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 25, 402–408.
- Mahdieh, M., Habibollahi, N., Amirjani, M.R., Abnosi, M.H., Ghorbanpour, M. 2015. Exogenous silicon nutrition ameliorates salt-induced stress by improving growth and efficiency of PSII in *Oryza sativa* L. cultivars. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 15, 1050–1060.
- Mastrogiannidou, E., Chatzissavvidis, C., Antonopoulou, C., Tsabardoukas, V., Giannakoula, A., Therios I. 2016. Response of pomegranate cv. wonderful plants to salinity. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 16, 621–636.
- Morard, P. 1995. Above ground vegetable crops. Agricultural publications Agen, Paris, 304 p.
- Negrão, S., Schmöckel, S. M., Tester, M. 2017. Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Annals of Botany.* 119, 1–11.
- Nojavan, S., Khalilian, F., Momen Kiaie, F., Rahimi, A., Arabanian, A., Chalavi, S. 2008. Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *J. Food Composition and Anal.* 21, 300–305.
- Plummer, D.T. 1989. Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill, Paris, 331p.
- Sanada, Y., Ueda, H., Kuribayashi, K., Andoh, T., Hayashi, F., Tamai, N., Wada, K. 1995. Novel light-dark change of proline levels in halophyte (*Mesembryanthemum crystallinum* L.) and glycophytes (*Hordeum vulgare* L. and *Triticum aestivum* L.) leaves and roots under salt stress. *Plant Cell Physiol.* 6, 965–970.
- Silveira, J.A.G., Araújo, S.A.M., Lima, J.P.M.S., Viégas, R.A. 2009. Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Env. and Exp. Bot.* 66, 1–8.
- Singh, M., Kumar, J., Singh, S. 2015. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Rev. Env. Sci. Biotechnol.* 14, 407–426.
- Siracusa, L., Kulisic-Bilusic, T., Politeo, O., Krause, I., Dejanovic, B., Ruberto, G. 2011. Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12453–12459.

- Szabolcs, I. 1989. Salt affected soils. CRP Press Inc, Boca Raton, Florida.
- Tipirdamaz, R., Gagneul, D., Duhaze, C., Aïnouche, A., Monnier, C., Özkum, D., Larher, F. 2006. Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Env. and Exp. Bot.* 57, 139–153.
- Troll, W., Lindsley, J. 1955. A photometric method for the determination of proline. *J. of Biol. Chem.* 215, 655-660.
- Wang, Y. 2011. The adaptation Mechanism of *Leymus chinensis* to grazing and salt-alkali stress. MSc Thesis, University of Hohenheim, Germany, 49 pp.

# Multiple mechanisms mediate growth and survival in young seedlings of two populations of the halophyte *Atriplex halimus* (L.) subjected to long single-step salinity treatments

Faiza Hamdani<sup>A,B,C</sup>, Arezki Derridj<sup>A</sup> and Hilary J. Rogers<sup>C,D</sup>

<sup>A</sup>Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 15000 Tizi-Ouzou, Algeria.

<sup>B</sup>Département des Sciences Agronomiques, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah Ouargla, 30000 Ouargla, Algeria.

<sup>C</sup>School of Biosciences, Cardiff University, Main Building, Park Place, Cardiff, CF10 3AT, UK.

<sup>D</sup>Corresponding author. Email: rogershj@cf.ac.uk

**Abstract.** Understanding how halophytes survive high soil salinity in realistic long-term experiments is important for strategies to mitigate the effects of increasing soil salinity worldwide. Protective mechanisms in halophytes enabling survival include sequestration of salt via Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters, synthesis and accumulation of osmolytes, and activation of protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS). Protective mechanisms elicited by a single step-up to a range of NaCl treatments (34–256 mM) in two populations of the halophyte *Atriplex halimus* L. from contrasting environments (arid steppe and saline coastline) were compared over 6 weeks. The coastal population survived significantly better at high salinity compared with the steppe population, although in both populations, salinity inhibited growth. Increased Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> concentration was accompanied by higher induction of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene expression in coastal than in steppe population leaves. Osmolytes increased more significantly in the coastal than in the steppe population with greater induction of choline mono-oxygenase gene expression. Activation of ROS scavenging mechanisms was greater in coastal than in steppe plants. Differential responses found through time, in different salt concentrations, and between leaves and roots indicate a finely tuned response. Sharp changes in responses at 171 mM NaCl indicate that different mechanisms may be invoked at different stress levels.

**Additional keywords:** choline mono-oxygenase gene expression, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter, osmolytes, reactive oxygen species.

Received 25 January 2017, accepted 4 May 2017, published online 7 June 2017

## Introduction

Increases in irrigated agriculture and intense use of water resources in hot and dry countries lead to inevitable increases in soil and water salinity. In Algeria, long periods of dryness have resulted in soil salinisation affecting 3.2 million ha (Belkhouja and Bidai 2004). Faced with likely increases in aridity as a result of climate change, species adapted to local conditions such as *Atriplex halimus* L. are being identified and selected to mitigate desertification (Benderradji *et al.* 2006). Re-establishment programs for these species require the identification of genotypes that are salt-tolerant at the early seedling stage. This is important for minimising the use of costly fresh water for their irrigation in nurseries, since the more readily available ground water used for irrigation is highly saline.

The genus *Atriplex* (Amaranthaceae) comprises ~200 species in temperate and subtropical regions, and is associated with saline and alkaline soils in arid, desert or semidesert environments (Mulas and Mulas 2004). These shrubs constitute an important

forage reserve in times of shortage. *Atriplex halimus* (Haddioui and Baaziz 2001) is a perennial C<sub>4</sub> native shrub native to the Mediterranean Basin that shows an excellent tolerance to salinity and drought (Ortiz-Dorda *et al.* 2005). This species is genetically variable and populations from different areas of the Mediterranean Basin were clearly separated using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) markers (Ortiz-Dorda *et al.* 2005).

Plants exposed to salt stress face two key constraints: first, osmotic stress from the rise in external osmotic pressure, resulting in a rapid reduction in plant growth rate. In a second phase, toxic ions (Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>) accumulate, which can lead to premature leaf senescence and ultimately death of the whole plant (Munns and Tester 2008). Mechanisms for achieving salt tolerance vary amongst species. Some halophytes exclude salts from the leaves by accumulating them in salt glands on their leaf surface (Sangam *et al.* 2005). Others are internal accumulators, accumulating salt by sequestering it into the cell vacuole and controlling the cellular K<sup>+</sup> : Na<sup>+</sup> ratio through a family of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters

(Flowers and Colmer 2008). These are known as NHX genes, from the original yeast antiporter gene, *ScNXH1*. NHX  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter genes have been isolated from several *Atriplex* species including *A. halimus*. In *Atriplex gmelinii* C.A. Mey. at least, the antiporter localises to the tonoplast membrane (Hamada *et al.* 2001). In *A. gmelinii* the *AgNHX* transporter gene was rapidly upregulated by salt treatments of 100–400 mM NaCl in both roots and leaves, although expression was much higher in leaves (Hamada *et al.* 2001).

Another mechanism evolved by plants to combat stress is the biosynthesis and accumulation of osmolytes (that act as osmoprotectants) such as soluble sugars, proline and glycine betaine (Peel *et al.* 2010). The Chenopodiaceae and Amaranthaceae produce large amounts of this quaternary ammonium compound (Brouquisse *et al.* 1989) that stabilises the quaternary structures of complex proteins such as PSII (Papageorgiou and Murata 1995) and protects membranes from high  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$  concentrations (Rhodes and Hanson 1993). The concentration of glycine betaine accumulated usually correlates with the level of salt tolerance (Rhodes and Hanson 1993). Choline mono-oxygenase (CMO) oxidises choline to betaine aldehyde, which is then converted by BADH into glycine betaine. CMO expression increased dramatically in *Atriplex prostrata* Boucher ex DC. stems, leaves and roots following a 3-day treatment with 1–2% NaCl (Wang and Showalter 2004). The major site of synthesis of glycine betaine in plant species studied to date is in the leaves (Rhodes and Hanson 1993), with CMO being localised in the chloroplast. However, in some species such as barley (*Hordeum vulgare* L.), glycine betaine is likely to also be synthesised in roots (Fujiwara *et al.* 2008). An *Atriplex nummularia* Lindl. the CMO gene was expressed at low levels in roots and was salt-inducible (Tabuchi *et al.* 2005). Proline is also accumulated very rapidly in *A. halimus* under saline treatments (Ben Hassine *et al.* 2008) and contributes to the osmotic adjustment.

Salt stress induces increased levels of reactive oxygen species (ROS) that disrupt redox homeostasis, leading to lipid peroxidation and other cellular damage (Noctor and Foyer 1998). Salt treatment elevates ROS levels in both halophytes and glycophytes. However in halophytes, the rise can be transient, lasting only a few hours (Ellouzi *et al.* 2011) due to the activation of antioxidant mechanisms. Ascorbic acid is a key antioxidant and ROS scavenger (Smirnov 2000). Key ROS moieties include superoxide, hydroxyl radicals and singlet O and their cellular levels are regulated within narrow tolerable ranges (Foyer and Noctor 2003). Antioxidant enzymes are also central to the ROS scavenging system activated under salt stress. These include superoxide dismutase, catalase and peroxidase (Noctor and Foyer 1998). The activities of these enzymes are frequently elevated in salt-tolerant species including *A. halimus* and are induced by salt exposure (Boughalleb *et al.* 2010).

The degree of tolerance and mechanisms for resisting salt stress vary within and among plant species. For example, *A. halimus* plants originating from coastal saline sites were more tolerant of high salinity and produced higher levels of glycine betaine, whereas plants from a semiarid nonsaline site were more tolerant to water stress and produced more proline (Ben Hassine *et al.* 2008). In other *A. halimus* populations (Bouchenak *et al.* 2012), plants from a more saline origin

contained more proline as well as quaternary ammonium compounds. However, both these experiments were performed on 4- to 6-week-old plants over a relatively short 10- to 18-day treatment period and therefore effects on early plant growth were not studied. Many studies on salt stress tolerance are performed by gradually increasing the salinity over a period of time to enable the plants to adapt, study only germination or treat older plants that are already well established. For example, Boughalleb *et al.* (2009) exposed *A. halimus* to up to 800 mM NaCl but this stress was imposed in increments of 100 mM NaCl at 2-day intervals until the maximum salinity concentration tested was reached. We were therefore interested to know how very young plants respond to a sudden increase in salinity and whether the mechanisms differ between populations derived from areas differing in salinity. Using a single step-up approach, we exposed young plants directly to a range of environmentally relevant salinities and compared two Algerian *A. halimus* populations from differing environments – semiarid steppe and saline coastline – over a 6-week treatment period. We hypothesised that the populations from the more saline environment would be more tolerant to higher saline treatments and display different or more efficient mechanisms for salt tolerance.

## Materials and methods

### Plant material and growth

*Atriplex halimus* L. seeds were from wild plants growing in two distinct regions of Algeria. Population 1 (steppe) is from the Algerian steppe, a semiarid area located in Northern Algeria (Chott Zahrez in the province of Djelfa; 34°36'N, 3°03'E). The geology in this area is mainly cretaceous, with some quaternary deposits. Soil salinity is between 1.99 and 4.47 dS m<sup>-1</sup> depending on the season, at a depth of 15–20 cm (Nedjimi 2012), corresponding to the rooting zone of *A. halimus*. Soil texture encompasses silt-clays and silt-sands (Pouget 1973), and the watertable is between 1 and 3 m below the soil surface. In this region, groundwater is in the form of semicaptive and unconfined aquifers, surrounded by the presence of more or less saline and unequally deep groundwater that contributes to the formation of saline soils (Pouget 1973). Chott Zahrez is essentially Mediterranean, with wet winters and hot dry summers (the minimum average is 5°C in January and the average maximum is 26°C in July) and a mean annual precipitation of 250 mm year<sup>-1</sup> (Nedjimi *et al.* 2012). Population 2 (coastal) is from the Algerian coastline, also in Northern Algeria (in the province of Tipasa, 36°35'22"N, 2°26'50"E), in a subhumid area with an average annual rainfall of 600 mm (1978–2004) (Boudjelal 2007). Temperatures are mild with an annual average of 17–18°C (absolute minimum on record of –2°C). This area is characterised by sedimentary cliffs and rocky areas (Grimes 2010) with a salinity of 9 dS m<sup>-1</sup> (Tifour 2000). The plants are also subjected to frequent sea water spray (55.38 dS m<sup>-1</sup>) but not total submersion because of the high winds in this area, making it a highly saline environment.

Seeds (15–20 per pot, 10 pots per treatment) were sown in washed and dried medium coarse sand irrigated with distilled water, and grown in a Fitotron (Sanyo Gallekamp, model SGC066) at a constant 25°C, with 16 : 8 h light : dark at

90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  from warm white fluorescent tubes and 40% relative humidity, until cotyledons appeared. Then irrigation continued with a nutrient solution (pH 5.6; Morard 1995; Tables S1 and S2, available as Supplementary Material to this paper). Salt stress was applied just after the appearance of the first leaf pair, 10 days after sowing (NaCl concentrations: 0, 34, 85, 171 and 256 mM). Electrical conductivity was constant throughout the experiment (Table S3). Plants were grown for 6 weeks. Leaves and roots for analysis were randomly selected from more than one plant at each analysis point and the material was pooled into three biological replicates; roots were used directly, as there was no soil to wash off.

Percentage survival (for each of the 10 pots) was recorded after 6 weeks and plant height over 6 weeks (for all surviving plants, the average height per pot was calculated). The relative growth rate (RGR) relating to plant height was calculated from plant height data at 1, 2, and 6 weeks (Wang 2011). To determine the relative water content (RWC), leaf and root tissue was dried at 105°C to a constant DW. The relative water content (in percent) was determined by the relationship shown in Eqn 1:

$$RWC = \frac{FW - DW}{FW} \times 100. \quad (1)$$

#### Metabolite analyses and enzyme activity measurements

Analyses of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , proline and soluble sugars were carried out on fresh leaves and roots (in triplicate) after 1, 2, and 6 weeks of growth under salt stress. For analysis of  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$ , samples were dried at 105°C for 1 h followed by 520°C for 2 h, digested in  $\text{HNO}_3$  (0.5 N) and assayed by flame photometry using a spectrophotometer (Cecil Instruments, model 6000 series). Total chlorophyll was extracted from fresh leaves with 80% acetone and absorption was measured at 652 nm. Concentrations of chlorophyll were determined according to Plummer (1989), then converted to  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW. Proline concentration was measured spectrophotometrically at 528 nm according to Troll and Lindsley (1955) from 100 mg of leaf tissue. Soluble sugars were analysed using the anthrone method (Plummer 1989) from 100 mg of fresh plant material. Absorbance was read spectrophotometrically at 585 nm and calibrated using a standard curve. Glycine betaine was measured according to Grieve and Grattan (1983) from 150 mg of fresh plant tissue in triplicate. Absorbance was measured at 365 nm using glycine betaine (Sigma Aldrich) as a standard and expressed as  $\text{mg g}^{-1}$  DW. The concentration of total solutes in roots and leaves over time was calculated by dividing the sum of  $\text{K}^+$ , proline, soluble sugars and glycine betaine concentrations by the amount of water present in the plant tissue, based on the percentage of water content.

Ascorbic acid was extracted by a freezing procedure (Nojavan *et al.* 2008) from 100 mg of fresh tissue, in triplicate. HPLC analysis was carried out using an isocratic elution procedure with a UV detector at 240 nm (gradient pump model P4000, autosampler AS300, and photo diode array detector UB 6000 LP; Thermo Scientific). Separation was carried out on a 5  $\mu\text{m}$  RP C18 column of 250 mm  $\times$  4.6 mm (Kinetex-Phenomenex). The mobile phase consisted of 0.5%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 2.25 with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) and acetonitrile (2% of final volume). An injection volume of 20  $\mu\text{L}$  was used in quantitative analyses.

An Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Molecular Probes, Invitrogen) was used to measure  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations in fresh leaves after 6 weeks under saline conditions. The absorbance (at 560 nm) was measured using an Infinite 200 PRO microplate reader (Tecan). Catalase activity was measured by spectrophotometry at 240 nm in leaves (250 mg in triplicate) according to Aebi (1984).

#### RNA extraction and real-time PCR

RNA was extracted and purified from contaminating genomic DNA using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) from two independent biological replicates of tissue that was flash-frozen in liquid N and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use. Retrotranscription and real-time PCR were carried out essentially as in Elmaghrabi *et al.* (2013) using 2  $\mu\text{g}$  of RNA, an Ambion kit (RETROscript) and an Absolute QPCR SYBR Green Mix (Thermo Scientific) kit. Reactions were cycled in an MJ Research OPTICON 2. Relative quantification of gene expression data used the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method (Livak and Schmittgen 2001). *Mt18S* rRNA primers were used to normalise the results (mean of three technical and two biological replicates). Primers for the *Atriplex halimus* CMO gene were derived from an alignment of CMO genes from *Atriplex nummularia* Lindl. (AB112481), *Atriplex prostrata* Boucher ex DC. (AY082068) and *Atriplex hortensis* L. (AF270651). Primers for the antiporter gene were derived from alignments of sequences from *Atriplex dimorphostegia* Kar. & Kir. (AY211397) and *Atriplex gmelinii* C.A. Mey. (AB038492). The *A. halimus* PCR products were fully sequenced to verify their homology. All primers are listed in Table S4.

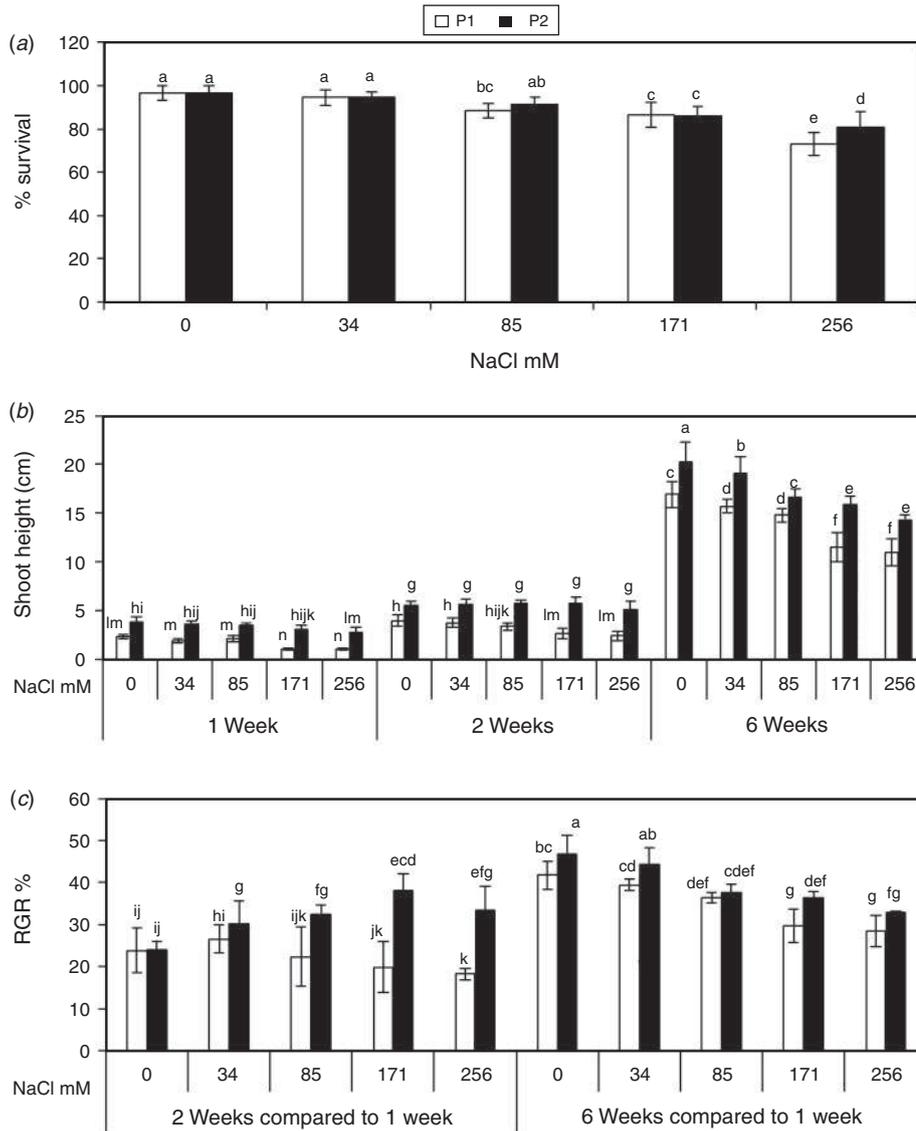
#### Statistical analyses

Data were analysed using StatBox6 and R software (R ver. 2.15.3, R Foundation for Statistical Computing). A two-way ANOVA test was performed on the percentage of survival and antioxidant data; all other data were analysed using a three-way ANOVA. Where significant ( $P < 0.05$ ) interactions or mean effects were found, comparisons were made using a Newman–Keuls test, consolidated by Tukey's test.

## Results

### Seedling survival and chlorophyll content with increasing NaCl concentration in coastal and steppe *A. halimus* seedlings

*Atriplex halimus* seedlings germinated equally in the two populations but survival fell significantly ( $P < 0.05$ ) at the highest two salt concentrations compared with the nonstressed controls in both populations, and thus a sudden step-up to 85 mM NaCl did not affect greatly seedling survival in either population. At 256 mM NaCl, coastal region (P2) seedlings survived significantly better ( $P < 0.05$ ) than steppe region (P1) seedlings (Fig. 1a). P2 seedlings were also significantly taller than P1 at all time points (Fig. 1b) and grew significantly faster in the first 2 weeks at NaCl concentrations  $>34$  mM, with an RGR that was significantly higher than the control at all salt concentrations, whereas the P1 RGR was reduced at the highest salt concentration but was unaffected at lower salinity (Fig. 1c). The RGR after 6 weeks (relative to 1 week) was reduced equally in P1 and P2 with increasing salt. P2 seedlings also retained a significantly



**Fig. 1.** (a) Mean percentage survival per pot, (b) shoot height and (c) relative growth rate of *Atriplex halimus* seedlings from steppe (P1) and coastal (P2) regions (a) after 6 weeks of salt stress, and (b, c) over time. Mean  $\pm$  s.d.; different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.05$ ) across all samples ( $n = 10$ ).

greater relative water content at all salt concentrations than P1 in both leaves and roots at all time points (Fig. 2a, b).

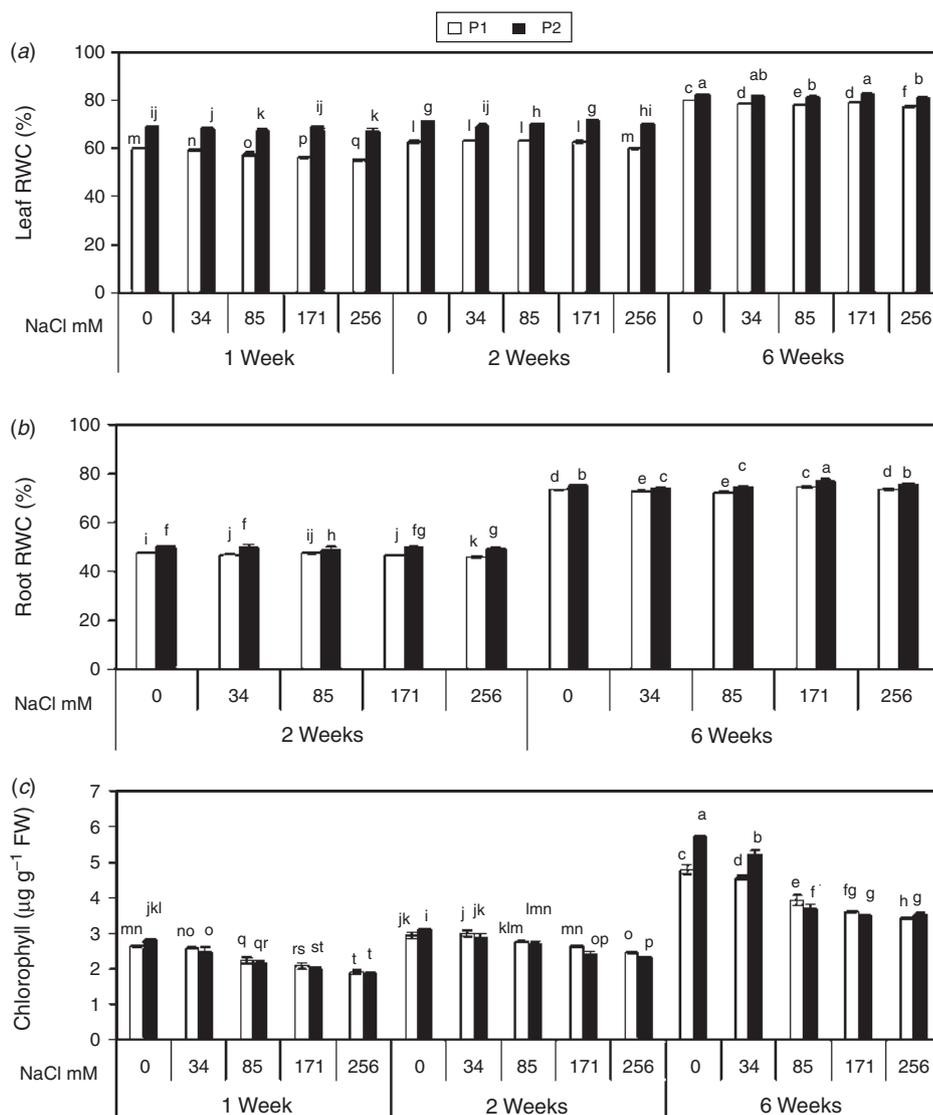
Chlorophyll concentration rose significantly between Week 1 and Week 6 at all salt concentrations ( $P < 0.05$ ), and was significantly higher in no-salt control coastal plants (P2) than in P1 controls, especially after 6 weeks (Fig. 2c). With increasing NaCl, chlorophyll concentration fell slightly at all time points, although it remained at  $>80\%$  of control even at the highest salt treatment after 6 weeks.

#### Differential ion accumulation in seedling roots and leaves with increasing salt concentration

For the first 2 weeks,  $\text{Na}^+$  concentration increases were similar between P1 and P2 leaves (Fig. 3a). However, at each salt

treatment at 34–171 mM,  $\text{Na}^+$  concentration was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in P2 leaves; at 256 mM, there was no difference between them. After 6 weeks, there was a significantly greater concentration of  $\text{Na}^+$  in all the salt-treated seedlings compared with the control, but P2 seedling leaves accumulated more  $\text{Na}^+$  at all concentrations of NaCl, reaching a maximum of  $(334.3 \pm 4.8) \mu\text{mol g}^{-1}$  FW at 171 mM NaCl, and the highest differential in  $\text{Na}^+$  between the two populations.

Changes in  $\text{Na}^+$  in roots were different to those in leaves (Fig. 3b) and concentrations were much lower, reaching only one-third those of leaves in P2 ( $71.2 \pm 2.7 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW) after 6 weeks. After 6 weeks at 34 mM NaCl, the  $\text{Na}^+$  concentration was higher in P2 roots than in P1 roots, and higher than in control roots of either population ( $P < 0.05$ ). At 85 mM, there was



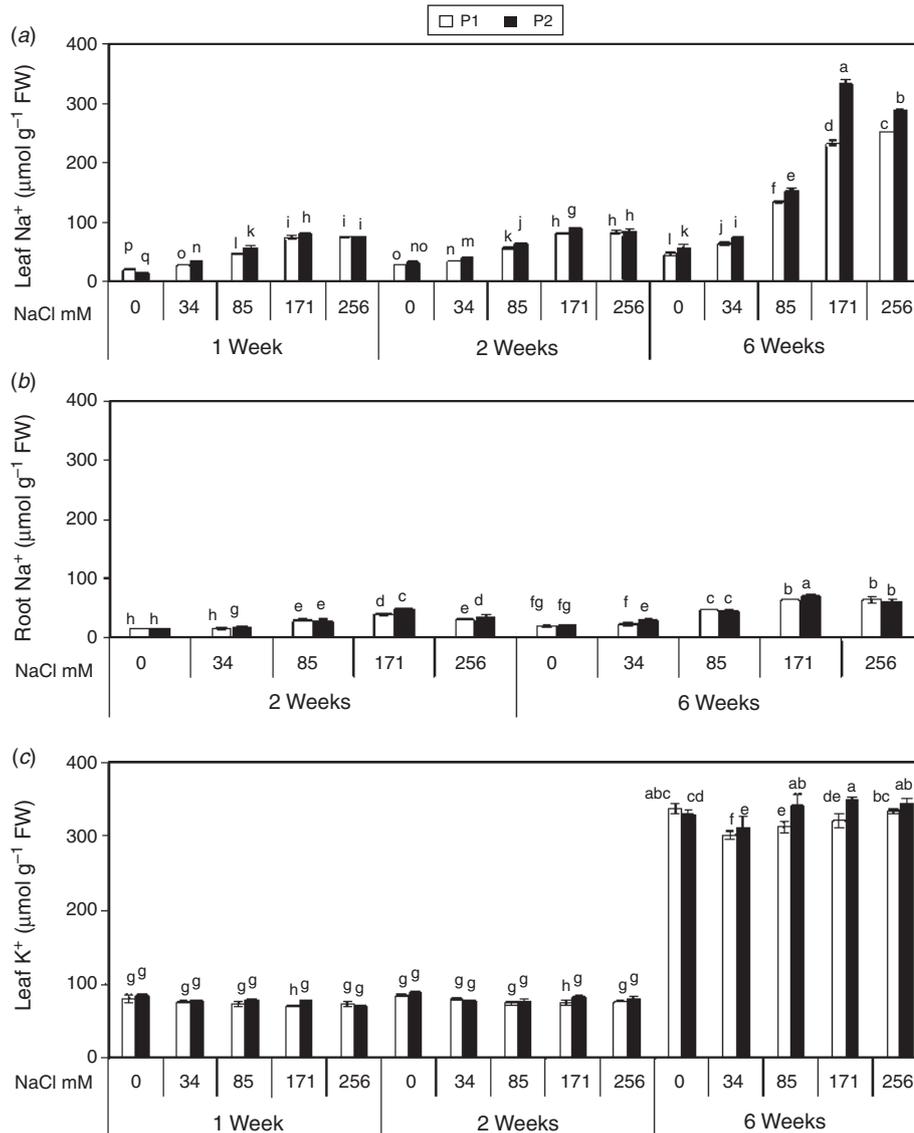
**Fig. 2.** Relative water content (RWC) in (a) leaves and (b) roots, and (c) chlorophyll concentration in leaves of *Atriplex halimus* seedlings from steppe (P1) and coastal (P2) regions over time and across salt stress treatments (mean  $\pm$  s.d.;  $n=3$ ). Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.05$ ) across all samples.

significant ( $P < 0.05$ ) NaCl accumulation in both P1 and P2 seedling roots, both after 2 weeks and 6 weeks of treatment, but no significant difference was seen between the two populations.  $\text{Na}^+$  was, however, higher in P2 seedling roots ( $P < 0.05$ ) at 171 mM NaCl after both 2 and 6 weeks of treatment compared with P1. At 256 mM NaCl,  $\text{Na}^+$  was significantly higher in P2 than P1 roots after 2 weeks ( $35.7 \pm 3.1 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW and  $31.5 \pm 1.2 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW respectively), but after 6 weeks, this difference was abolished.

Leaf  $\text{K}^+$  levels were not affected by the first 2 weeks of salt treatment (Fig. 3c). However, after 6 weeks,  $\text{K}^+$  concentration was almost fourfold higher and was significantly greater ( $P < 0.05$ ) in P2 leaves than in P1 leaves in all but the highest NaCl treatment. In roots,  $\text{K}^+$  levels showed few changes between P2 and P1 or between salt concentrations at 2 or 6 weeks (Fig. S1).

The  $\text{K}^+ : \text{Na}^+$  ratio fell with increasing NaCl at all time points in both P1 and P2 leaves (Fig. 4a). After 1 week, in the no-salt controls, the  $\text{K}^+ : \text{Na}^+$  ratio was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in P2 than in P1 leaves; however, at all other time points and salt treatments, the  $\text{K}^+ : \text{Na}^+$  ratio was the same or higher in P1 leaves. The pattern was essentially the same in roots after 6 weeks, although at 2 weeks, there were no significant differences between the two populations or among salt treatments (Fig. S2).

Changes in  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$  concentration were reflected in the induction of the *A. halimus AhNXX1*  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene expression in leaves under salt treatments (Fig. 4b). At 85–256 mM NaCl, P2  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter expression was significantly upregulated compared with the control, peaking at 171 mM NaCl. In contrast, expression in P1 leaves was only induced at 171 mM NaCl but remained high at 256 mM NaCl.



**Fig. 3.**  $\text{Na}^+$  accumulation in (a) leaves and (b) roots, and (c)  $\text{K}^+$  accumulation in leaves over time in *Atriplex halimus* seedlings from steppe (P1) and coastal (P2) regions across salt stress treatments (mean  $\pm$  s.d.;  $n = 3$ ). Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.05$ ) across all samples.

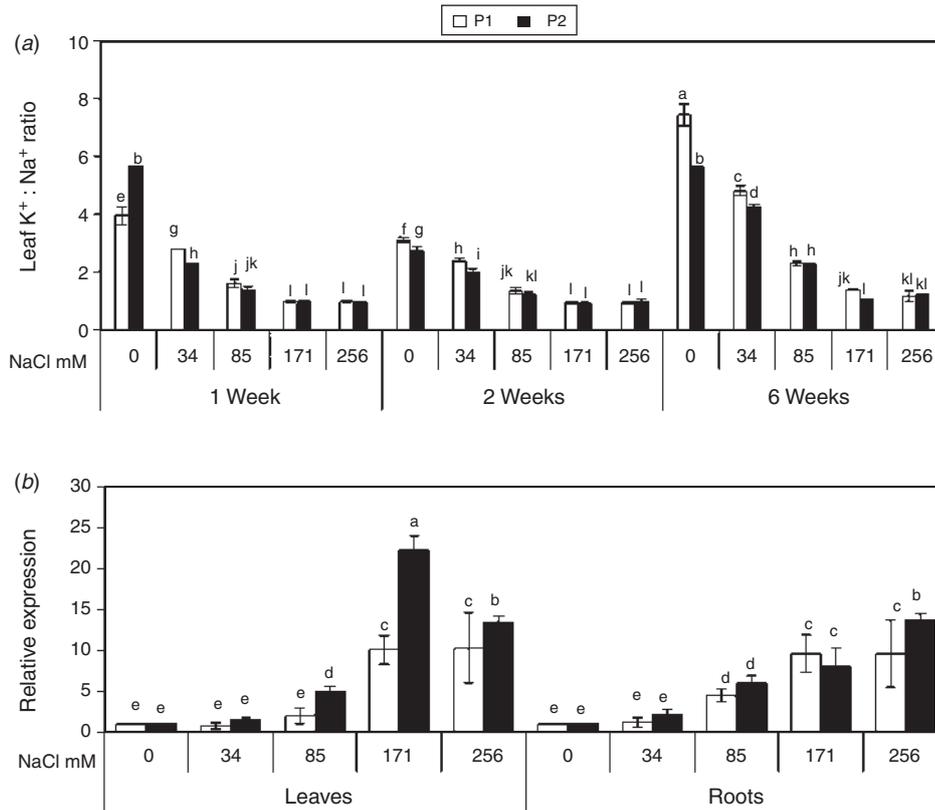
In roots, both P1 and P2 antiporter expression was above that of the control at 85–256 mM NaCl, but P2 expression was only significantly higher than P1 at 256 mM NaCl. As in leaves, expression of the antiporter in P1 roots remained constant at 171–256 mM.

*Osmolyte accumulation and expression of the glycine betaine biosynthesis-related CMO gene were induced differentially by salt treatments in P1 and P2*

Proline concentration increased slightly even in control leaves after 6 weeks, reaching  $20.9 \pm 0.01$  and  $27.8 \pm 0.02 \mu\text{mol g}^{-1}$  FW respectively for P1 and P2 (Fig. 5a). However, salt treatment induced an almost threefold increase in maximal proline

concentration. Proline rose in both P1 and P2 from 85 to 171 mM NaCl at all three time points, but fell back at 256 mM in P2; in P1, it reached a plateau at 171 mM NaCl after 2 and 6 weeks. The greatest difference in proline concentration between the two populations was at 171 mM NaCl at all time points, although after 6 weeks, proline was significantly higher ( $P < 0.05$ ) in P2 than in P1 leaves at all concentrations including the control.

The pattern was similar in roots (Fig. 5b), although proline concentration remained more similar over time, with less than a twofold difference in maximal accumulation, and was much lower than in leaves. Again, proline rose between 34 and 171 mM NaCl in both populations and at both time points compared with the control, and P2 roots accumulated



**Fig. 4.** (a) K<sup>+</sup> : Na<sup>+</sup> ratio in leaves over time and (b) relative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene expression after 6 weeks compared with the no-salt control of *Atriplex halimus* seedlings from steppe (P1) and coastal (P2) regions across salt stress treatments (mean  $\pm$  s.d.; (a)  $n=3$ ; (b)  $n=6$ ). Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.05$ ) across all samples.

significantly higher levels of proline than P1 roots at  $>34$  mM NaCl. However, P2 roots accumulated significantly less proline than P1 at 256 mM NaCl at both Week 2 and Week 6.

Soluble sugars increased with time in leaves at all salt concentrations but also increased in response to the salt (Fig. 5c). After 1 week, maximal levels were at 171 mM NaCl but at later time points, concentrations continued to rise to 256 mM NaCl. Soluble sugar levels were significantly higher in P2 than in P1 leaves at all salt concentrations after 2 weeks. In roots, the pattern was similar but there were no significant differences under any salt treatment or at any time point between the two populations, although there was a rise in soluble sugars with increasing salt concentration from 0 to 171 mM at both time points and then a fall at 256 mM NaCl (Fig. S3).

Glycine betaine concentration was significantly higher in P2 than in P1 leaves and roots at all time points and NaCl concentrations, including the control (Fig. 6). In both the P1 and P2 leaves, glycine betaine concentration increased with increasing NaCl and with time. However in roots, whereas glycine betaine rose with salt in P2 at  $>34$  mM NaCl, in P1, it remained constant up to 171 mM and only rose at 256 mM. Although the glycine betaine concentrations in roots only reached one-quarter of that in leaves at 256 mM NaCl, the fold induction at the salt concentration compared with the

nonsaline control was similar in the two tissues and for the two populations.

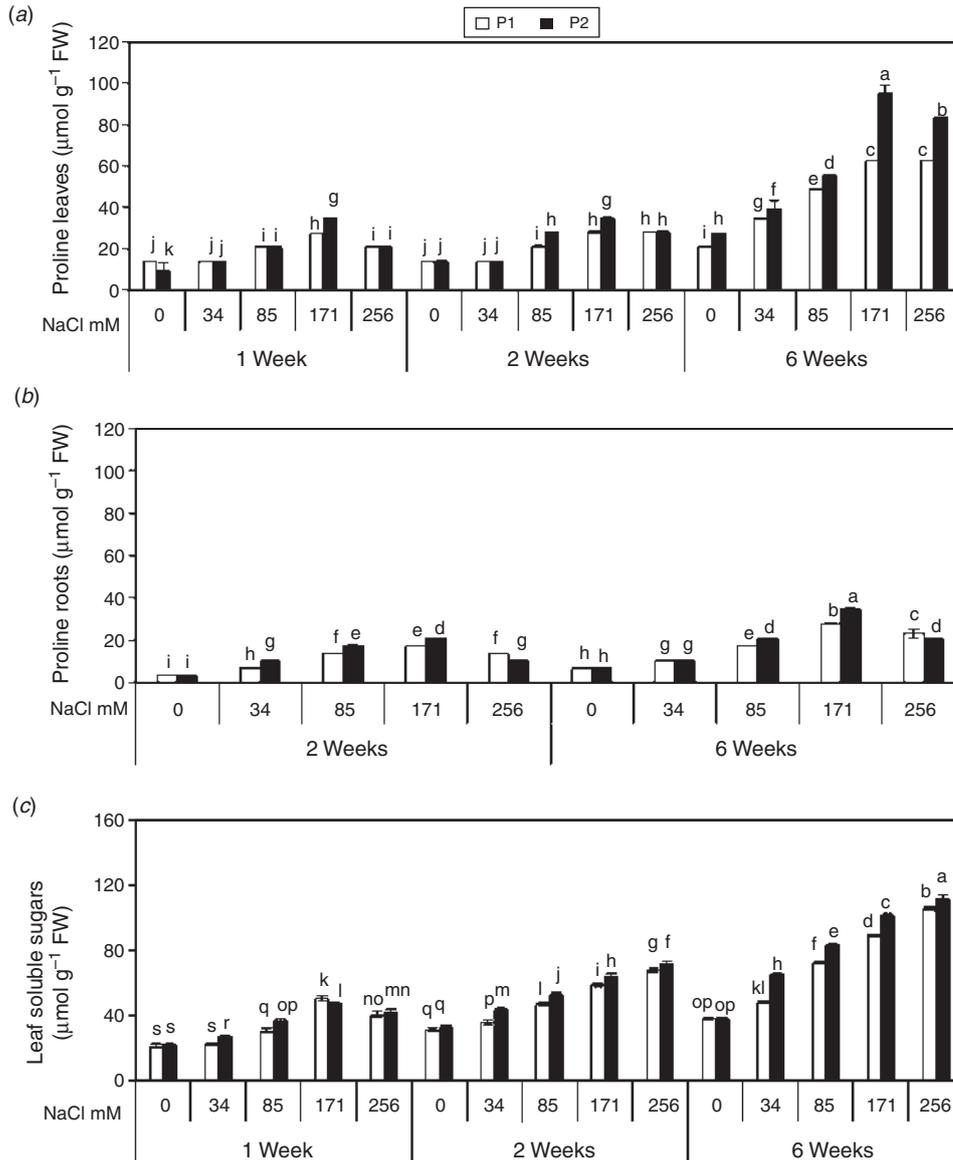
The increase of glycine betaine in leaves with salinity was, at least in part, transcriptional, since *CMO* gene expression rose with increasing salt in leaves at  $\geq 85$  mM NaCl (Fig. 6c) and was significantly higher in P2 than P1. *CMO* expression was much lower in roots and was not significantly induced by salt.

#### Antioxidant capacity

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was lower at all salt concentrations than in the control, but there was no significant difference between the two populations (Fig. S4). In leaves of both populations, ascorbic acid increased linearly with NaCl from 34–256 mM (Fig. 7a). At each salt concentration, P2 accumulated significantly more ( $P < 0.05$ ) ascorbic acid than P1 leaves and the rate of accumulation was also significantly faster. Catalase activity was also induced by salt in both P1 and P2 leaves (Fig. 7b); however, in P1, activity was only greater than in the control at  $\geq 170$  mM NaCl. In contrast, catalase increased linearly in P2 leaves from 85 to 256 mM NaCl ( $R^2 = 0.994$ ).

#### Discussion

Despite the application of NaCl in a single step-up, *A. halimus* seedlings challenged at the first leaf stage were remarkably

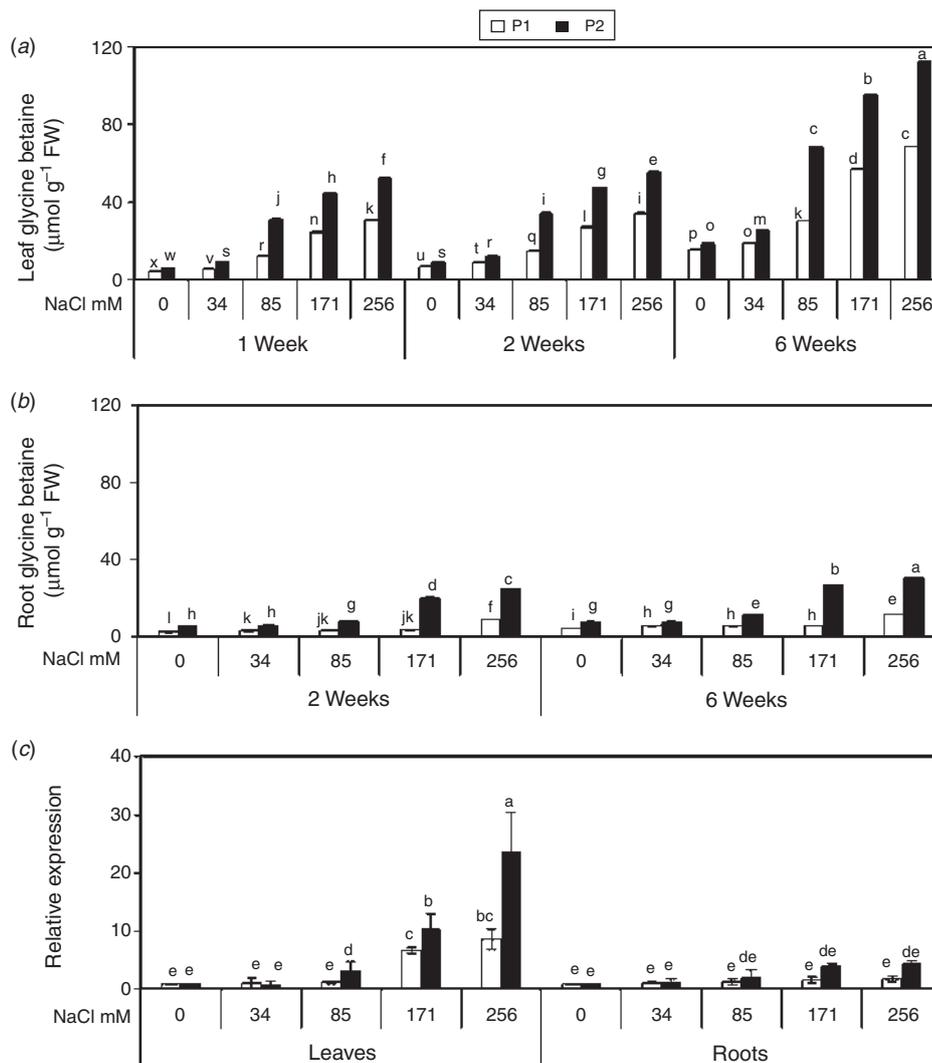


**Fig. 5.** Proline concentration in (a) leaves and (b) roots, and (c) soluble sugar concentration in leaves of *Atriplex halimus* seedlings from steppe (P1) and coastal (P2) regions over time and across salt stress treatments (mean  $\pm$  s.d.;  $n = 3$ ). Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.05$ ) across all samples.

resilient, with over 70% survival at 256 mM NaCl after 6 weeks of treatment. Much higher salt concentrations of 600 mM have been previously tested on *A. halimus* (Bouchenak et al. 2012), but only on much more mature (4-week-old) plants with 10–12 leaves and only for a much shorter period of 18 days. As noted in other species (e.g. *Tecticornia* spp.; English and Colmer 2013), young seedlings are much more sensitive to high salt than even slightly older plantlets. Given the widespread use of saline irrigation water in arid Mediterranean areas and the growth of this species very close to the sea, the data presented here are of direct relevance to the seminatural environment where salt stress is imposed early in development and over long periods, and the natural

environment where saline stress can be imposed soon after germination through sea spray.

The survival of the coastal population (P2) plants was significantly higher than that of the P1 steppe plants at 256 mM NaCl. P2 plants also grew taller than P1 plants at all salt concentrations, including the control and over time, indicating a difference between the two populations in their growth, irrespective of the salt treatment. In fact, there were significant differences between the two populations in the no-salt control for many of the characteristics including the ion ratio, glycine betaine and proline concentrations, and catalase activity, indicating differences in normal metabolism as well as salt responses. Interestingly, the RGR of the coastal population

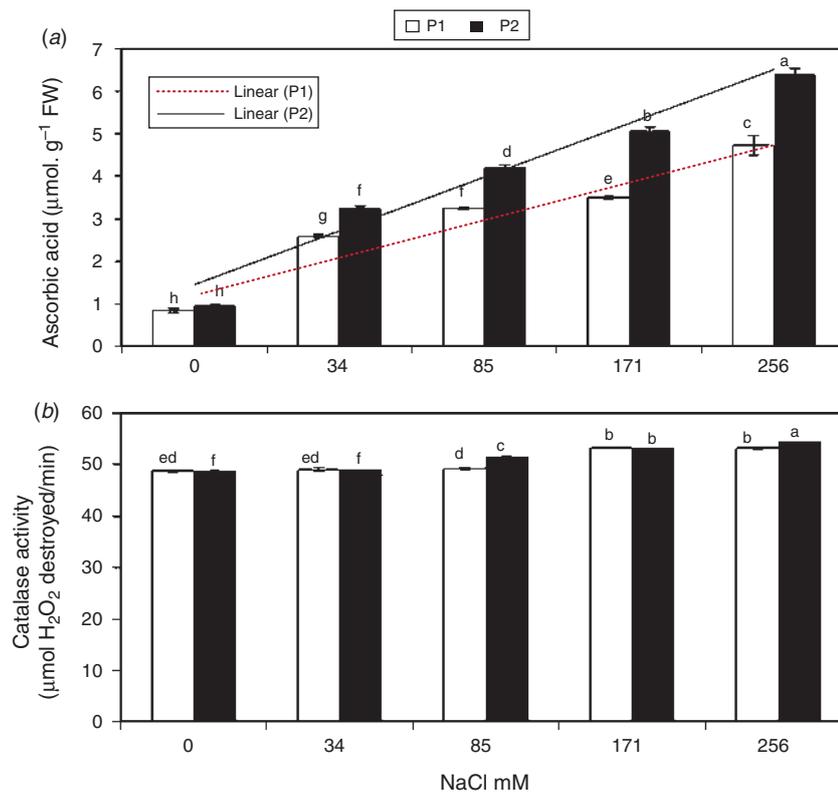


**Fig. 6.** Glycine betaine concentration in (a) leaves and (b) roots, and (c) choline mono-oxygenase gene expression relative to the no-salt control in *Atriplex halimus* seedlings from steppe (P1) and coastal (P2) regions over time and across salt stress treatments (mean  $\pm$  s.d.; (a, b)  $n=3$ ; (c)  $n=6$ ). Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.05$ ) across all samples.

between 1 and 2 weeks of salt treatment was greater at all the salt treatments than in the no-salt control, indicating that this population may grow optimally in the presence of short periods of salinity. In many *Atriplex* species, including *A. halimus*, salinity stimulates growth (Belkheiri and Mulas 2013) and a single-step salt treatment of 150 mM for 10 days increased shoot RGR in a Tunisian *A. halimus* population, although the RGR decreased progressively at higher stress intensities (300, 450 and 600 mM; Bajji *et al.* 1998). However, experiments are usually conducted with more mature plants than those used here. In contrast, the 1- to 2-week RGR of the steppe population (P1) was not stimulated by salt and was reduced at 256 mM NaCl, indicating an important difference in the early salt responses between the two populations. After 6 weeks, the RGR and shoot height were reduced by the saline treatment in both populations even at 34 mM NaCl. This suggests that prolonged salt treatments induce some stress.

It is not possible from these data to unequivocally determine whether the stress was osmotic or caused by ion toxicity, which would require more detailed measurements of leaf growth and senescence. However, the small reductions in chlorophyll at the lower salt concentrations suggest that the effects here may be primarily osmotic, whereas at higher concentrations, more significant chlorophyll reductions also suggest an ion toxicity effect.

Differences between coastal and steppe populations are in agreement with previous work using coastal and semiarid populations from Tunisia (Ben Hassine *et al.* 2008), where at 160 mM NaCl for 10 days, the DW of semiarid-derived plants was reduced but was not reduced in coastal-derived plants. However, loss of chlorophyll in the first 1–2 weeks contrasts with experiments on a coastal population of Tunisian *A. halimus* where there was no loss of chlorophyll over 10 days of treatment at 160 mM NaCl (Ben Hassine and Lutts 2010). The difference



**Fig. 7.** (a) Ascorbic acid concentration and (b) catalase activity in leaves of *Atriplex halimus* seedlings from steppe (P1) and coastal (P2) regions after 6 weeks of salt stress (mean  $\pm$  s.d.;  $n = 3$ ). Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test ( $P < 0.05$ ) across all samples.

is probably caused by the age of the plants, which were already 6 weeks old in the Ben Hassine and Lutts (2010) experiments when treated.

Both populations of *A. halimus* studied here maintained their relative water content, which increased over the 6 weeks of treatment. This may be at least partly caused by the ability of C<sub>4</sub> plants like *A. halimus* to regulate stomatal closure, which is the main cause of reduced photosynthesis and therefore reduced growth in other species under mild to moderate drought stress and high salinity (Chaves et al. 2009).

In both populations, Na<sup>+</sup> concentration increased in both leaves and roots in response to the saline treatments, but the level of Na<sup>+</sup> in the leaves was almost 10-fold higher than in roots, suggesting that in these populations, salt is being accumulated rather than excluded in the leaves, as was previously found in some *A. halimus* populations (Belkheiri and Mulas 2013). As found by Ben Hassine et al. (2008), the coastal population accumulated significantly more Na<sup>+</sup>. However after 2 weeks at 256 mM NaCl, the difference between the two populations was lost, suggesting a threshold level between 171 and 256 mM NaCl for salt accumulation in the both populations. Notably, after 6 weeks, the difference was restored, suggesting that at a later stage of development (as indicated by the increasing chlorophyll levels throughout the experiment), additional mechanisms for Na<sup>+</sup> accumulation may become available. The greater inducibility of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene at 6 weeks in the P2 leaves and

roots, which is particularly dramatic in leaves at 171 mM NaCl and in roots at 256 mM NaCl, may be a factor in the higher Na<sup>+</sup> accumulation in the coastal plants. Roots of the P2 plants were still able to upregulate the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene expression at the highest salt level, although the P1 plants were not. Bajji et al. (1998) found that roots responded less than leaves in this species to high salt concentrations but was unable to explain this effect mechanistically. Here, the results suggest that this effect might be at least partly caused by the greater inducibility of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in roots at high salt concentrations than in leaves, thus excluding salt from the cytoplasm more effectively.

The slight fall in leaf but not root K<sup>+</sup> levels in the P1 plants between 0 and 85 mM NaCl at later time points is in agreement with previous reports in *A. halimus* (Bajji et al. 1998; Boughalleb et al. 2010). The difference between the coastal and steppe populations in leaf K<sup>+</sup> accumulation after 6 weeks at most salt concentrations, however, suggests a greater ability of the P2 plants to retain K<sup>+</sup> in leaves (but not in roots) under saline conditions. The finding that the K<sup>+</sup> : Na<sup>+</sup> ratio remains >1 at all concentrations of external salt throughout the experiment in leaves fits with the requirement of balancing these two ions to protect protein synthesis (Flowers et al. 2015).

As shown by Ben Hassine et al. (2008), mechanisms other than glycine betaine accumulation are involved in salt tolerance in *A. halimus* and their relative importance varies with different populations. Induction of glycine betaine accumulation in both

leaves and roots was higher in P2 plants, indicating that this may be a more important protection mechanism in P2 than in P1 plants against long-term salt stress. The higher levels of *CMO* expression in leaves compared with roots agrees with the expression patterns in *A. nummularia* (Tabuchi *et al.* 2005), as is the salt induction in both leaves and roots. We show here that higher glycine betaine levels in both tissues of the coastal population are matched by higher *CMO* gene expression levels. Accumulation of glycine betaine in the roots of the coastal *A. halimus* plants may therefore derive from synthesis in the roots as well as more efficient phloem loading or transport from the leaves.

In the populations studied by Ben Hassine *et al.* (2008), the coastal populations preferentially accumulated glycine betaine, whereas the inland populations accumulated more proline. However, this difference in mechanisms was not supported by the study of the two Algerian populations of contrasting origins (Bouchenak *et al.* 2012) where both quaternary ammonium compounds and proline were higher in populations from saline areas when challenged with salt treatments but not with drought. Results from the two populations studied here support a role for both proline and glycine betaine in salt tolerance in *A. halimus*, and highlight a difference between leaves and roots and across time. Notably, after 6 weeks, more than twofold more proline accumulated than at earlier time points at all levels of salt treatment and in both plant populations. This agrees with Martinez *et al.* (2005), where older leaves accumulated more proline in response to salt treatment than young leaves. Even after 2 weeks, however, the coastal population leaves here accumulated significantly more proline than the steppe leaves, even at a lower salt concentration (85 mM) than that tested by Ben Hassine *et al.* (2008). At 171 and 256 mM, the enhanced proline accumulation by the P2 population after 6 weeks was striking. In roots, the pattern was different: although at 85 and 171 mM NaCl (which spans the 160 mM NaCl used by Ben Hassine *et al.* (2008)), the coastal plants accumulated significantly more proline in roots than the steppe plants, the ratio was indeed reversed at 256 mM NaCl. Thus it would seem that after 6 weeks at high salt concentrations, accumulation of both proline and glycine betaine in leaves is important for salt tolerance of coastal population plants; in roots, the glycine betaine accumulation may be more important.

A third type of osmolite, soluble sugars, also appears to be involved in the protective mechanisms of both populations. Accumulation of soluble sugars in leaves but not roots may be relevant to longer-term salt tolerance in the coastal population, since accumulation was more highly induced in this population after 6 weeks at all salt concentrations. This contrasts with a previous study on *A. halimus* where there was no difference in sugar accumulation between saline and nonsaline environment-derived populations (Bouchenak *et al.* 2012). In contrast also to Bajji *et al.* (1998) and Martinez *et al.* (2005), here, soluble sugars were induced by low salt concentrations (<50 mM) in leaves after 2 weeks as well as at higher concentrations, as reported before (Bajji *et al.* 1998; Boughalleb *et al.* 2010; Bouchenak *et al.* 2012), suggesting that soluble sugars in leaves may be more relevant as a protective mechanism at low salinity in very young leaves and the different populations studied here. In agreement with Bajji *et al.* (1998), though, soluble sugars in

roots increased with increasing external salt concentrations and then fell back or remained constant. Here, the upper limit was 171 mM NaCl, whereas for Bajji *et al.* (1998), it was 300 mM NaCl, again suggesting differences between the plants tested and growth stage. The fall in soluble sugar levels is interpreted by Bajji *et al.* (1998) as an inhibition of phloem transport, which would also inhibit transport of glycine betaine from the leaves, which is thought to take place via the phloem (Chen and Murata 2011). However, the continued increase in glycine betaine concentration even at 256 mM NaCl, together with the upregulation of the *CMO* gene expression in roots, suggests that at least some of the glycine betaine may be synthesised directly in the roots rather than translocated.

A comparison of the total concentration of internal solutes with the external solute concentration (Fig. S5) indicates that at 1–2 weeks, osmotic adjustment in leaves may not occur under 34 mM NaCl when the 32.1 mM of nutrient solutes is included in the calculation. However, after 6 weeks, leaves may be able to adjust osmotically up to the combined external solute concentration of 85 + 32.1 mM in both populations. In contrast, osmotic adjustment does not appear to occur in roots at any concentration. This difference between roots and leaves has been noted previously in *Atriplex nummularia* (Silveira *et al.* 2009). However, the calculation here needs to be interpreted with caution and may be a significant underestimate. Although the concentration of many of the major organic osmolytes normally considered to be important for osmotic adjustment (proline, soluble sugars and glycine betaine) as well as  $K^+$  (Singh *et al.* 2015) have been included, other cellular solutes such as other amino acids and ions will contribute to the internal solute concentration and hence may alter the threshold.

The very similar changes in  $H_2O_2$  concentration in the two populations under salt treatment and the reduction in  $H_2O_2$  compared with the no-salt control treatment suggests that the antioxidant mechanisms are not being compromised at the NaCl concentrations tested here, consistent with other studies (e.g. Boughalleb *et al.* 2010). The greater activation of antioxidant mechanisms may be a component of the different salt tolerance mechanisms of the two populations under the high salt treatments, since there was a significantly higher ascorbic acid concentration in coastal P2 leaves than in steppe P1 leaves at all salt concentrations. The differences in the catalase activity between the two populations were most evident at 85 mM NaCl, suggesting that at this intermediate salt concentration, catalase plays a more important differential role between the two populations. In contrast to previous work showing no increase (Boughalleb *et al.* 2010; *A. halimus*) or a reduction (Sai Kachout *et al.* 2013; *A. hortensis*) in catalase activity in response to salt, here, there was a small increase from 85 to 256 mM external NaCl. In the steppe population, catalase activity rose between 85 and 171 mM treatments but did not rise further at 256 mM, whereas in the coastal population, catalase activity rose up to 256 mM external salt. This higher catalase activity in the coastal population is in broad agreement with Bouchenak *et al.* (2012). However, here, there was a small but significant induction of the catalase activity by all salinity treatments of  $\geq 85$  mM NaCl in both populations, whereas in the populations described in Bouchenak *et al.* (2012), catalase activity dropped in the non-saline population. Differences may

also again be related to the age of the plants, indicating that in young plants, catalase plays a more important role in protection against the salt-induced ROS changes. Note also that in addition to ROS-scavenging enzymes and nonenzymatic antioxidants, soluble sugars can also play an antioxidant role against ROS under biotic and abiotic stress (Keunen *et al.* 2013), acting in concert with other protective mechanisms. Hence the increase in soluble sugars seen here in both populations and the relatively higher accumulation in the coastal population may contribute to maintain ROS homeostasis under salinity stress.

In conclusion, it emerges that young *A. halimus* seedlings are able to cope with relatively high saline environments, which may be important in their survival after germination in their natural ecosystems in seasons where rainfall is sporadic and or reduced. Furthermore, different mechanisms are invoked at different salt concentrations in different tissues of the plant and at different times during a long single-step salt treatment of young seedlings and some responses differ to those in older plants. Na<sup>+</sup>, proline and glycine betaine accumulation seem to be greater contributors at high salt concentrations, whereas soluble sugars and antioxidant mechanisms are involved throughout. In roots, glycine betaine biosynthesis and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter inducibility may also contribute to salt tolerance at 256 mM NaCl, whereas actual Na<sup>+</sup> accumulation, proline and soluble sugars may be less relevant. Differences were noted between the coastal population, where plants would naturally be exposed to higher salt concentrations, and the inland population. However, as there are also differences in the annual rainfall between the two environments, further work would be required to assess whether the mechanisms that have evolved to adapt to drought also contribute to the differences noted in the response to salt treatments. However, from a practical perspective, given the greater induction of many of the salt tolerance mechanisms and the more rapid growth of the coastal population seedlings, this population may be better suited for re-establishment of this species in areas where increased aridity is affecting its survival.

## Acknowledgements

We thank Mike O'Reilly for assistance with the metabolite analyses. The work was funded by the Algerian Government and Cardiff University, UK.

## References

- Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Bajji M, Kinet MJ, Lutts S (1998) Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science* **137**, 131–142. doi:10.1016/S0168-9452(98)00116-2
- Belkheiri O, Mulas AB (2013) The effects of salt stress on growth, water relations and ion accumulation in two halophyte *Atriplex* species. *Environmental and Experimental Botany* **86**, 17–28. doi:10.1016/j.envexpbot.2011.07.001
- Belkhdja B, Bidai Y (2004) Réponse des graines d'*Atriplex halimus* L. à la salinité au stade de la germination. *Sécheresse* **15**, 331–335.
- Ben Hassine A, Lutts S (2010) Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *Journal of Plant Physiology* **167**, 1448–1456. doi:10.1016/j.jplph.2010.05.017
- Ben Hassine A, Edmaond Ghanem M, Bouzid S, Lutts S (2008) An inland and a coastal population of the Mediterranean xero-halophyte species *Atriplex halimus* L. differ in their ability to accumulate proline and glycine betaine in response to salinity and water stress. *Journal of Experimental Botany* **59**, 1315–1326. doi:10.1093/jxb/ern040
- Benderradji MEH, Alatou DJ, Arfa AMT, Benachour KH (2006) Problèmes de dégradation de l'environnement par la désertification et la déforestation Impact du phénomène en Algérie. *New Médit* **4**, 15–22.
- Bouchenak F, Henri P, Benrebaha FZ, Rey P (2012) Differential responses to salinity of two *Atriplex halimus* populations in relation to organic solutes and antioxidant systems involving thiol reductases. *Journal of Plant Physiology* **169**, 1445–1453. doi:10.1016/j.jplph.2012.06.009
- Boudjelal AA (2007) Determination of the water needs of crops using cropwat 4.3 software in the province of Tipaza. Thesis, National Agronomy Institute, Algiers, Algeria.
- Boughalleb F, Denden M, Ben T (2009) Anatomical changes induced by increasing NaCl salinity in three fodder shrubs, *Nitraria retusa*, *Atriplex halimus* and *Medicago arborea*. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**, 947–960. doi:10.1007/s11738-009-0310-7
- Boughalleb F, Mhamdi M, Hailaoui H, Denden M (2010) Salinity effects on organic solutes and antioxidative enzymes in two halophytes, *Nitraria retusa* (Forssk) and *Atriplex halimus* (L.). *Research Journal of Biological Sciences* **5**, 773–784.
- Brouquisse R, Weigel P, Rhodes D, Yocum CF, Hanson AD (1989) Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiology* **90**, 322–329. doi:10.1104/pp.90.1.322
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **103**, 551–560. doi:10.1093/aob/mcn125
- Chen TH, Murata N (2011) Glycine betaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. *Plant, Cell & Environment* **34**, 1–20. doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x
- Ellouzi H, Ben Hamed K, Cela J, Munné-Bosch S, Abdely C (2011) Early effects of salt stress on the physiological and oxidative status of *Cakile maritima* (halophyte) and *Arabidopsis thaliana* (glycophyte). *Physiologia Plantarum* **142**, 128–143. doi:10.1111/j.1399-3054.2011.01450.x
- Elmaghrabi AM, Ochatt S, Rogers HJ, Francis D (2013) Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **114**, 61–70. doi:10.1007/s11240-013-0306-2
- English JP, Colmer TD (2013) Tolerance of extreme salinity in two stem-succulent halophytes (*Tecticornia* species). *Functional Plant Biology* **40**, 897–912.
- Flowers TJ, Colmer TD (2008) Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist* **179**, 945–963. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x
- Flowers TJ, Munns R, Colmer TD (2015) Sodium chloride toxicity and the cellular basis of salt tolerance in halophytes. *Annals of Botany* **115**, 419–431. doi:10.1093/aob/mcu217
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**, 355–364. doi:10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x
- Fujiwara T, Hori K, Ozaki K, Yokota Y, Mitsuya S, Ichiyangai T, Hattori T, Takabe T (2008) Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenases in barley. *Physiologia Plantarum* **134**, 22–30. doi:10.1111/j.1399-3054.2008.01122.x
- Grieve CM, Grattan SR (1983) Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. *Plant and Soil* **70**, 303–307. doi:10.1007/BF02374789
- Grimes S (2010) Benthic populations of the Algerian coast substrates: taxonomy, structure and ecological status. PhD thesis, Oran University, Algeria.

- Haddioui A, Baaziz M (2001) Genetic diversity of natural populations of *Atriplex halimus* L. in Morocco: an isoenzyme-based overview. *Euphytica* **121**, 99–105. doi:10.1023/A:1012051222530
- Hamada A, Shono M, Xia T, Ohta M, Hayashi Y, Tanaka A, Hayakawa T (2001) Isolation and characterization of a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter gene from the halophyte *Atriplex gmelini*. *Plant Molecular Biology* **46**, 35–42. doi:10.1023/A:1010603222673
- Keunen E, Peshev D, Vangronsveld J, Van den Ende W, Cuypers A (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment* **36**, 1242–1255. doi:10.1111/pce.12061
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Martinez JP, Kinet JM, Bajji M, Lutts S (2005) NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water stress in the halophyte species *Atriplex halimus* L. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2421–2431. doi:10.1093/jxb/eri235
- Morard P (1995) 'Les cultures végétales hors sol.' (Publications agricoles, Agen: Paris)
- Mulas M, Mulas G (2004) 'Potential of strategic use of *Atriplex* and *Opuntia* plants in the fight against desertification. Activity Report of the Desertification Research Group.' (Sassari University, Sardegna, Italy)
- Munns R, Tester M (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 651–681. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Nedjimi B (2012) Seasonal variation in productivity, water relations and ion contents of *Atriplex halimus* spp. *Schweinfurthii* grown in Chott Zehrez wetland, Algeria. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* **11**, 43–49. doi:10.1016/j.jssas.2011.08.002
- Nedjimi B, Beladel B, Guit BB (2012) Biodiversity of halophytic vegetation in Chott Zehrez lake of Djelfa (Algeria). *American Journal of Plant Sciences* **3**, 1527–1534. doi:10.4236/ajps.2012.311184
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**, 249–279. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.249
- Nojavan S, Khalilian F, Momen Kiaie F, Rahimi A, Arabanian A, Chalavi S (2008) Extraction and quantitative determination of ascorbic acid during different maturity stages of *Rosa canina* L. fruit. *Journal of Food Composition and Analysis* **21**, 300–305. doi:10.1016/j.jfca.2007.11.007
- Ortiz-Dorda J, Martinez-Mora C, Correal E, Simon B, Cenis JI (2005) Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean Basin. *Annals of Botany* **95**, 827–834. doi:10.1093/aob/mci086
- Papageorgiou GC, Murata N (1995) The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex. *Photosynthesis Research* **44**, 243–252. doi:10.1007/BF00048597
- Peel GJ, Mickelbart MV, Rhodes D (2010) Choline metabolism in glycinebetaine accumulating and non-accumulating near-isogenic lines of *Zea mays* and *Sorghum bicolor*. *Phytochemistry* **71**, 404–414. doi:10.1016/j.phytochem.2009.11.002
- Plummer DT (1989) Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill, Paris.
- Pouget M (1973) Une manifestation particulière et méconnue de la salure dans les steppes du sud-algérois : les plages de salure sur les glaciés quaternaires à croute calcaire. *Bulletin de la Société d'histoire naturelle de l'Afrique du Nord* **64**, 15–24.
- Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**, 357–384. doi:10.1146/annurev.pp.44.060193.002041
- Sai Kachout S, Hamzal KJ, Bouraoui NK, Leclerc JC, Ouerghi Z (2013) Salt-induced changes in antioxidative enzyme activities in shoot tissues of two *Atriplex* varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **41**, 115–121.
- Sangam S, Jayasree D, Reddy KJ, Chari PVB, Sreenivasulu N, Kishor PBK (2005) Salt tolerance in plants – transgenic approaches. *Journal of Plant Biotechnology* **7**, 1–15.
- Silveira JAG, Araújo SAM, Lima JPMS, Viégas RA (2009) Roots and leaves display contrasting osmotic adjustment mechanisms in response to NaCl-salinity in *Atriplex nummularia*. *Environmental and Experimental Botany* **66**, 1–8. doi:10.1016/j.envexpbot.2008.12.015
- Singh M, Kumar J, Singh S (2015) Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **14**, 407–426. doi:10.1007/s11157-015-9372-8
- Smirnoff N (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photo-protection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **355**, 1455–1464. doi:10.1098/rstb.2000.0706
- Tabuchi T, Kawaguchi Y, Azuma T, Nanmori T, Yasuda T (2005) Similar regulation patterns of choline monoxygenase, phosphoethanolamine N-methyltransferase and S-adenosyl-L-methionine synthetase in leaves of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant & Cell Physiology* **46**, 505–513. doi:10.1093/pcp/pci050
- Tifour Y (2000) Approches hydrodynamiques, exemple du champ de captage de Tipaza. Masters thesis, Blida University, Algeria.
- Troll W, Lindsley J (1955) A photometric method for the determination of proline. *The Journal of Biological Chemistry* **215**, 655–660.
- Wang Y (2011) The adaptation mechanism of *Leymus chinensis* to grazing and salt-alkali stress. MSc thesis, University of Hohenheim, Germany.
- Wang LW, Showalter AM (2004) Cloning and salt-induced, ABA independent expression of choline mono-oxygenase in *Atriplex prostrata*. *Physiologia Plantarum* **120**, 405–412. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.00247.x