

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

**Université les Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie végétale**



N° d'ordre : 37/DS/2017
N° de série :05/ECO/2017

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

**Filière : Biologie Végétale
Spécialité : Ecophysiologie et Biotechnologie Végétale**

THEME

**ETUDE DE L'EFFET DE L'INTERACTION DU MOLYBDENE AVEC
L'AZOTE CHEZ LES FABACEES CULTIVEES EN MILIEU SALIN**

Réalisée par : Mme BOUZID Salha

Devant le jury :

Présidente : Mme BOUDOUR Leila

Pr. Université Mentouri Constantine 1

Directeur de thèse : Mr RAHMOUNE Chaabane

Pr. Université Mentouri Constantine 1

Examineurs:

Mme MEKSEM Leila

Pr. Université Badji Mokhtar Annaba

Mme OUAHRANI Ghania

Pr. Université de Ferhat Abbas Sétif

Mr BRINIS Louhichi

Pr. Université Badji Mokhtar Annaba

Mr BAZRI Kamel Eddine

MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1

Soutenu le : 12/03/2017

2016 - 2017

Remerciements

A l'issue de la rédaction de cette recherche, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et l'intérêt manifestés à l'égard de ma recherche m'ont permis de progresser dans cette phase importante qu'est la préparation d'une thèse de doctorat.

En premier lieu je voudrais remercier Mr RAHMOUNE Chaabane, Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, mon directeur de thèse pour son idée originale du thème, qu'il retrouve ici le témoignage de ma profonde gratitude, ma reconnaissance et mon respect pour son encadrement indéfectible et son suivi, sans lesquels, cette thèse n'aurait pas été possible de réaliser, pour ses précieux conseils, ses encouragements et sa confiance, pour ses critiques, corrections et discussions scientifiques qui ont beaucoup apporté à ce travail.

J'aimerais adresser un remerciement particulier à Mme BOUDOUR Leila, Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, qui me fait l'honneur de présider le jury, je lui exprime mes sentiments les plus respectueux.

J'exprime mes remerciements les plus sincères, à Mme MEKSEM Leila, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, pour l'intérêt porté à ce travail, pour avoir accepté d'examiner cette thèse et de participer au jury.

Mes vives remerciements s'adressent également à Mme OUAHRANI Ghania, Professeur à l'université de Ferhat Abbas Sétif, d'avoir accepté de lire, de juger ce travail et d'apporter ces remarques constructives.

Je suis infiniment gré à Mr BRINIS Louhichi, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, d'avoir accepté de porter un regard critique et constructif à ce travail de recherche.

Il m'est agréable d'exprimer ma gratitude, ma reconnaissance et mon profond respect à Mr BAZRI Kamel Eddine, Maître de Conférence A à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, d'avoir accepté de juger ce travail et de se joindre au jury de cette thèse.

Je voudrai aussi remercier Mr Allatou Djamel, Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine 1, pour ces précieux conseils et encouragements.

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude au Pr. MENDEL R. Ralf pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire du département de biologie cellulaire et moléculaire de l'institut de biologie végétale de l'université de Braunschweig, Allemagne, afin de réaliser une partie de ce travail de thèse, et également au Pr. BITTNER Florian pour son assistance au laboratoire, ses précieux conseils, ses discussions scientifiques qui m'ont beaucoup aidé lors de mon stage à l'institut de biologie végétale de l'université de Braunschweig.

Je voudrai aussi remercier vivement Mme NIELANDER Ute pour son aide technique et son chaleureux accueil au département de biologie cellulaire et moléculaire de l'institut de biologie végétale de l'université de Braunschweig.

Je voudrai remercier également Mr BENNOUAR Farid et Mr LARABA Djamel, responsables des laboratoires de la faculté de la nature et de la vie, pour leurs aides et précieux conseils.

Je ne saurais présenter ce travail sans exprimer mes remerciements à toute ma famille.

Etude de l'effet de l'interaction du molybdène avec l'azote chez les fabacées cultivées en milieu salin

Résumé

En Algérie, les légumineuses constituent une importante composante d'aliments nutritifs, elles sont très riches en protéines. Le molybdène possède un rôle important dans plusieurs processus biologiques chez les plantes supérieures d'où l'intérêt de notre recherche sur les trois espèces de légumineuses (le haricot, le pois chiche et la lentille) en condition de stress salin et en présence du molybdène et de l'azote.

En condition de stress salin (3g/l de NaCl), la combinaison du molybdène et de l'azote conduit à une augmentation de la biomasse fraîche aérienne et le taux de la chlorophylle (a+b) chez les 3 espèces.

Le molybdène et l'azote stimule la synthèse des protéines totales chez le haricot mais dans les racines du pois chiche et la lentille, le stress salin cause leur augmentation.

Dans la partie aérienne du haricot et du pois chiche, l'activité de la xanthine déshydrogénase est stimulée par l'apport du molybdène et de l'azote.

L'activité de l'aldéhyde oxydase est stimulée dans la partie aérienne du haricot par l'apport du molybdène et de l'azote, et dans les racines de la lentille en condition de stress salin.

La sulfite oxydase possède une activité qui diminue avec le temps et est affectée par le stress salin.

L'activité de la nitrate réductase augmente avec le temps mais elle est affectée par le stress salin.

L'activité du molybdène cofacteur diminue à cause du stress salin à part pour la lentille qui augmente.

Pour le haricot, les gènes de la sulfite oxydase et la xanthine déshydrogénase possèdent un rôle dans l'adaptation au stress salin.

L'expression des gènes mARC chez le pois chiche et mARC2 chez le haricot est stimulée en condition de stress salin ce qui leur donne un rôle dans l'adaptation au stress salin.

Les mots clés : molybdène, azote, stress salin, *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., *Lens culinaris* M., molybdoenzymes, RT-PCR.

Study of molybdenum and nitrogen interaction effect on fabaceae grown in saline medium

Abstract

In Algeria grain legumes are considered as an important nourishing food, they are very rich in proteins. Molybdenum has an important role in several biological processes in plants, that is why our research focuses on three legumes species (bean, chickpea and lens) submitted to salt stress and in presence of molybdenum and nitrogen.

Combination of molybdenum and nitrogen in salt stress (3g/l of NaCl) condition, leads to an increase in fresh shoot biomass and chlorophyll (a+b).

Molybdenum and nitrogen stimulate synthesis of total proteins in bean but in roots of chickpea and lens, salt stress causes their increase.

In bean and chickpea shoots, xanthine dehydrogenase activity is stimulated by both molybdenum and nitrogen.

Aldehyde oxidase activity is stimulated in bean shoots by adding molybdenum and nitrogen, and in lens roots in salt stress condition.

Sulfite oxidase has a decreasing activity which decreases with time and is affected by salt stress. Nitrate reductase activity increases in time and is affected by salt stress.

The activity of the molybdenum cofactor decreases because of salt stress except for lens which increases. For bean, sulphite oxidase and xanthine dehydrogenase genes have a role in adaptation to salt stress condition.

The expression of mARC chickpea gene and mARC2 bean gene is stimulated in condition of salt stress which gives them a role to salt stress adaptation.

Key words : molybdenum, nitrogen, salt stress, *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., *Lens culinaris* M., molybdoenzymes, RT-PCR.

دراسة تأثير تفاعل الموليبدنوم مع النيتروجين عند الباقوليات المزروعة في وسط ملحي

الملخص

في الجزائر تعد الباقوليات من أهم المصادر الغذائية لإحتوائها على نسبة عالية من البروتينات. الموليبدنوم عنصر كيميائي مهم، لديه دور هام في العديد من العمليات البيولوجية عند النباتات و لقد قدنا دراستنا في هذا السياق حيث أن هذا البحث يتمحور حول ثلاث أنواع من الباقوليات (الفاصولياء، الحمص و العدس) في حالة إجهاد ملحي مع وجود الموليبدنوم و النتروجين.

في وجود صوديوم الكلورايد (3 غ/ل)، الدمج بين الموليبدنوم و النتروجين يعطي زيادة في وزن الساق و الأوراق و نسبة الكلوروفيل عند الثلاث أنواع.

الموليبدنوم و النتروجين يحفزان تركيب البروتينات عند الفاصولياء لكن في جذور الحمص و العدس، الإجهاد الملحي يؤدي إلى زيادة هذا التركيب.

في ساق و أوراق نباتي الفاصولياء و الحمص نشاط الانزيم xanthine déshydrogénase يحفز إضافة الموليبدنوم و النتروجين.

يحفز نشاط أنزيم aldéhyde oxydase في ساق و أوراق الفاصولياء وجود الموليبدنوم و النتروجين أما بالنسبة لجذور نبات العدس فإن الإجهاد الملحي هو الذي يحفزه.

نشاط أنزيم sulfite oxydase ينقص مع الوقت ونشاط الأنزيم nitrate réductase يزيد مع الوقت و هما الاثنان متأثران بالإجهاد الملحي.

نشاط molybdène cofacteur ينقص بسبب الإجهاد الملحي ما عدا نبات العدس.

جين sulfite oxydase و xanthine déshydrogénase لديهما دور التكيف في حالة الإجهاد الملحي في نبات الفاصولياء.

تعبير الجينات mARC عند الحمص و mARC2 عند الفاصولياء محفز في حالة الإجهاد الملحي مما يمنح لهما دور في التكيف في حالة هذا الإجهاد.

الكلمات المفتاحية

الموليبدنوم، النتروجين، الإجهاد الملحي، الفاصولياء، الحمص، العدس، الأنزيمات الموليبدينية.

Liste des abréviations

ABA: acide abscissique
ABA3 : la protéine de la sulfurase du molybdène cofacteur
ABA3/LOS5 : le gène de la sulfurase du molybdène cofacteur
AO: l'aldéhyde oxydase (la protéine)
AAO3 : l'aldéhyde oxydase (le gène)
APS: persulfate d'ammonium
ANR : l'activité de la nitrate réductase
bp: (**bp**): paire de bases
BSA : bovine serum albumin
DEPC : diéthyl pyrocarbonate
DTT : dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
FAD : flavine adénine dinucléotide
g: l'unité de mesure de centrifugation qui exprime l'accélération relative
GHS : forme réduite du glutathion
HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
LB : milieu de culture liquide LB
M: marqueur
mARC: mitochondrial amidoxime reducing component
MoCo : molybdène cofacteur
MTT : 3-(4,5 diméthylethiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazoliumbromide
NR: la nitrate reductase (la protéine)
NIA1 : la nitrate reductase (le gène)
PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PMS : phenazine methosulfate
PMSF: Le fluorure de phénylméthylsulfonyl
PVPP : polyvinylpolypyrrolidone
rpm : l'unité de mesure de centrifugation qui exprime la rotation par minute
RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS : sodium dodecyl sulfate
SO: la sulfite oxydase
TAE: tris Acétate EDTA
TBS : concentrated Tris-buffered saline
TBST: Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20
TBST X: Tris-buffered saline, 0.1% Triton X-100)
XDH: la xanthine déshydrogénase (la protéine)
XDH1 : la xanthine déshydrogénase (le gène)

Glossaire

Apoptérine ; apopterin ; La ptérine est un composé hétérocyclique constitué d'un noyau de pyrazine fusionné avec un noyau de pyrimidine (une ptéridine donc), avec sur le carbone 4 de la pyrimidine, un groupe carbonyle, et sur le carbone 2 un groupe amine.

DEPC H₂O: diéthyl pyrocarbonate, on l'ajoute pour obtenir une eau sans ribonucléase

Gel de concentration ; stacking gel

Gel de séparation ; resolving gel

Gènes orthologues; orthologs: des gènes qui ont la même fonction mais qui se trouvent dans de différentes espèces qui proviennent d'un même gène ancêtre.

Gènes Paralogues; Paralogs; des gènes reliés par duplication mais qui possèdent des fonctions différentes

Gène de référence ; housekeeping genes

Groupement prosthétique ; prosthetic groups ; Les groupements prosthétiques appartiennent à plusieurs catégories moléculaires, le plus connu -l'hème- intervient dans la plupart des réactions d'oxydo-réduction comme le FAD

Hème ; heme ; L'hème est un cofacteur contenant un atome de métal

Homodimère ; homodimer ; Protéine composée de deux chaînes peptidiques identiques.

Monomère ; monomer ; un monomère (ou sous-unité) est l'élément constitutif des protéines multimériques

Phytoalexine ; phytoalexin ; sont des composés phytochimiques accumulés par certains tissus végétaux en réponse à une attaque par des micro-organismes

Zymogramme ; Zymogram ; Détection d'une enzyme en visualisant son activité par fluorescence. Ensemble des différentes bandes obtenues sur papier par électrophorèse de solutions d'enzyme.

Liste des figures

Figure 01 : l'accumulation sélective.....	9
Figure 02: Synthèse des principaux mécanismes cellulaires de perception, signalisation et réponse au stress salin (NaCl) chez la plante.....	17
Figure 03 : Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae.....	20
Figure 04 (a) : L'espèce <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	22
Figure 04 (b) : L'espèce <i>Cicer arietinum</i> L.....	28
Figure 04 (c) : <i>Lens culinaris</i>	33
Figure 05 : la structure du ligand du molybdène.....	41
Figure 06 : Le métabolisme du molybdène.....	42
Figure 07 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. soumises aux différents traitements.....	58
Figure 08 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de <i>Cicer arietinum</i> L. soumises aux différents traitements.....	59
Figure 09 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de <i>Lens culinaris</i> M. soumises aux différents traitements.....	60
Figure 10 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i> soumises aux différents traitements	61
Figure 11: les plantes de haricots <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivées dans les différents traitements.....	62
Figure 12 : les plantes de pois chiche <i>Cicer arietinum</i> cultivées dans les différents traitements.....	63
Figure 13 : les plantes de la lentille <i>Lens culinaris</i> cultivées dans les différents traitements.....	64
Figure 14 : La chlorophylle des plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. soumises aux différents traitements	66
Figure 15 : La chlorophylle des plantes de <i>Cicer arietinum</i> L soumises aux différents traitements.....	67
Figure 16 : La chlorophylle des plantes de <i>Lens culinaris</i> M. soumises aux différents traitements.....	68
Figure 17 : Comparaison de la chlorophylle des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i> soumises aux différents traitements.....	69

Figure 18 : Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de <i>P. vulgaris</i> soumises aux différents traitements.....	71
Figure 19 : Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de <i>C.arietinum</i> soumises aux différents traitements.....	72
Figure 20 : Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de <i>L.culinaris</i> soumises aux différents traitements.....	73
Figure 21 : Comparaison du ratio de la chlorophylle a/b des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i> soumises aux différents traitements.....	74
Figure 22 : L'activité de la nitrate réductase des plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. soumises aux différents traitements.....	76
Figure 23 : L'activité de la nitrate réductase des plantes de <i>Cicer arietinum</i> L. soumises aux différents traitements.....	77
Figure 24 : L'activité de la nitrate réductase des plantes de <i>Lens culinaris</i> M. soumises aux différents traitements.....	78
Figure 25: Comparaison de l'activité de la nitrate réductase des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i> soumises aux différents traitements.....	78
Figure 26 : La concentration des protéines totales des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	93
Figure 27: Le zymogramme de la xanthine déshydrogénase, sur gel de polyacrylamide des 3 espèces	96
Figure 28 : L'activité de la xanthine déshydrogénase des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	97
Figure 29: Le zymogramme de l'aldéhyde oxydase, sur un gel de polyacrylamide des 3 espèces	100
Figure 30 : L'activité de l'aldéhyde oxydase des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	101
Figure 31 : L'activité de la sulfite oxydase des plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i>	104
Figure 32 : L'activité de la sulfite oxydase des plantes de <i>Cicer arietinum</i>	105
Figure 33 : L'activité de la sulfite oxydase des plantes de <i>Lens culinaris</i>	106
Figure 34 : L'activité de la nitrate réductase de la partie aérienne des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	108
Figure 35 : L'activité du molybdène cofacteur de la partie aérienne des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	111

Figure 36: Les membranes du western blot chez le haricot.....	120
Figure 37 : les membranes du western blot chez le pois chiche sur gel natif.....	121
Figure 38 : les membranes du western blot chez la lentille sur gel natif.....	121
Figure 39: Le profil d'électrophorèse de rt-PCR de l'expression des gènes sur gel d'agarose chez le haricot (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	134
Figure 40: profil d'électrophorèse de rt-PCR de l'expression des gènes sur un gel d'agarose chez le pois chiche (<i>Cicer arietinum</i>)	136
Figure 41: profil d'électrophorèse de rt-PCR de l'expression des gènes sur un gel d'agarose chez la lentille (<i>Lens culinaris</i>) en utilisant les amorces du haricot.....	137
Figure 42: profil d'électrophorèse de rt-PCR de l'expression des gènes sur un gel d'agarose chez la lentille (<i>Lens culinaris</i>) en utilisant les amorces du pois chiche.....	138

Liste des tableaux

Tableau 01 : La classification de la salinité de l'eau.....	5
Tableau 02. La production nationale du haricot	26
Tableau 03 : Production du pois chiche en Algérie.....	31
Tableau 04 : La valeur nutritive du haricot, du pois chiche et de la lentille.....	36
Tableau 05: la biomasse fraîche aérienne (BFA) de <i>Phaseolus vulgaris</i> (P.v), <i>Cicer arietinum</i> (C.a) et <i>Lens culinaris</i> (L.c).....	65
Tableau 06: Le taux de la chlorophylle (a+b) (Chl) de <i>Phaseolus vulgaris</i> (P.v), <i>Cicer arietinum</i> (C.a) et <i>Lens culinaris</i> (L.c).....	70
Tableau 07: Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (P.v), <i>Cicer arietinum</i> (C.a) et <i>Lens culinaris</i> (L.c).....	75
Tableau 08: L'activité de la Nitrate reductase (ANR) des plantes de <i>Phaseolus vulgaris</i> (P.v), <i>Cicer arietinum</i> (C.a) et <i>Lens culinaris</i> (L.c)	79
Tableau 09 : La concentration des protéines totales des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	94
Tableau 10 : L'activité de la xanthine déshydrogénase des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	98
Tableau 11 : L'activité de l'aldéhyde oxydase des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	102
Tableau 12 : L'activité de la sulfite oxydase de la partie aérienne et racinaire des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	107
Tableau 13 : L'activité de la nitrate réductase de la partie aérienne des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	109
Tableau 14 : L'activité du molybdène cofacteur de la partie aérienne des plantes de <i>P. vulgaris</i> , <i>C. arietinum</i> et <i>L. culinaris</i>	112
Tableau 15: Les séquences des amorces utilisées chez <i>Phaseolus vulgaris</i> et <i>Lens culinaris</i>	132
Tableau 16: Les séquences des amorces utilisées chez <i>Cicer arietinum</i> et <i>Lens culinaris</i>	133
Tableau 17: L'intensité des bandes d'expression des gènes chez <i>Phaseolus vulgaris</i>	135
Tableau 18: L'intensité des bandes d'expression des gènes chez <i>Cicer arietinum</i>	135

Sommaire

Remerciements

Les Résumés

Liste des abréviations

Glossaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre1 : Synthèse bibliographique

1. La salinité	5
1.1. Introduction	6
1.2. Les contraintes abiotiques	6
1.3. La perception et la réponse au stress	8
1.4. Le stress salin.....	9
1.5. Les approches « omiques » dans l'Ère Moderne.....	13
1.6. Quelques techniques.....	18
2. Les légumineuses	19
2.1. Introduction.....	19
2.2. <i>Paseolus vulgaris</i> L.....	21
2.3. <i>Cicer arietinum</i> L.....	27
2.4. <i>Lens culinaris</i> M.....	32
2.5. Valeur nutritive des légumineuses.....	36
3. Les molybdoenzymes	37
3.1. Introduction.....	37
3.2. La nutrition minérale en molybdène et azote.....	37
3.3. La géochimie du molybdène	39
3.4. Le molybdène cofacteur.....	40
3.5. Les molybdoenzymes	41

3.5.1. La xanthine déshydrogénase.....	43
3.5.2. L'Aldéhyde oxydase.....	44
3.5.3. La Sulfite oxydase	45
3.5.4. La nitrate réductase	46
3.5.5. Le complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes	47
3.5.6. La sulfurase du molybdène cofacteur.....	48

**Chapitre 2 : L'effet du molybdène, de l'azote et de chlorure de sodium sur la
biomasse fraîche, la chlorophylle et la nitrate réductase**

2.1. Introduction	51
2.2. Matériel et méthode	
2.2.1. Préparation des plantes.....	53
2.2.2. Biomasse fraîche aérienne.....	54
2.2.3. La Chlorophylle	54
2.2.4. Activité de la nitrate réductase in vivo.....	55
2.3. Résultats et discussion	
2.3.1. Biomasse fraîche aérienne	58
2.3.2. Chlorophylle.....	66
2.3.3. Activité de la nitrate réductase in vivo.....	76
2.4. Conclusion	81

**Chapitre 3 : L'effet du molybdène, de l'azote et du chlorure de sodium sur l'activité
de quelques molybdoenzymes de trois espèces de légumineuses**

3.1. Introduction	83
3.2. Matériel et méthode	
3.2.1 Préparation des plantes.....	84
3.2.2. L'activité de la xanthine déshydrogénase et de l'aldéhyde oxydase.....	85
3.2.3. L'activité de la sulfite oxydase.....	87

3.2.4. L'activité de la nitrate réductase	
Protocole 1.....	88
Protocole2.....	89
3.2.5. L'activité du molybdène cofacteur	91
3.3. Résultats et discussion	
3.3.1. La concentration des protéines totales.....	93
3.3.2. L'activité de la xanthine déshydrogénase.....	96
3.3.3. L'activité de l'aldéhyde oxydase.....	100
3.3.4. L'activité de la sulfite oxydase.....	104
3.3.5. L'activité a nitrate réductase	108
3.3.6. L'activité du molybdène cofacteur	111
Conclusion.	113

Chapitre 4 : Mise en évidence des molybdoenzymes par technique de western blot

4.1. Introduction	116
4.2. Matériel et méthode.....	116
4.3. Résultats et discussion	120
4.4. Conclusion.....	122

Chapitre 5 : L'effet du molybdène, de l'azote et du chlorure du sodium sur l'expression des gènes de molybdoenzymes de trois espèces de légumineuses

5.1. Introduction	123
5.2. Matériel et méthode	
5.2.1. Condition de développement des plantes.....	125
5.2.2. Isolement et purification des ARN.....	126
5.2.3. Préparation de la réaction de la transcriptase inverse.....	127
5.2.4. La PCR reverse transcriptase.....	127
5.2.5. La purification.....	128

5.2.6. La ligation.....	129
5.2.7. La transformation.....	130
5.2.8. Isolement du plasmide	130
5.2.9. La digestion.....	131
5.3. Résultats et discussion	
5.3.1. L'expression des gènes chez <i>Phaseolus vulgaris</i>	134
5.3.2. L'expression des gènes chez <i>Cicer arietinum</i>	135
5.3.3. L'expression des gènes chez <i>Lens culinaris</i>	137
5.3.4. La discussion	139
5.3.5. Le séquençage du gène mARC	144
5.3.6. Le séquençage du gène XDH1	146
5.4. Conclusion.....	148
Conclusion générale et perspectives.....	149
Les références bibliographiques	153
Les annexes	

Introduction

Introduction

Aujourd'hui l'agriculture fait face à une tâche difficile d'assurer la sécurité alimentaire à la population humaine croissante de cette planète (FAO, 2009).

En Algérie, la culture des légumineuses alimentaires fait partie du paysage agricole depuis des millénaires, et sont utilisées dans la rotation avec les céréales car elles enrichissent le sol en azote. Les légumes secs ont une importance stratégique dans l'alimentation parce qu'ils constituent une importante source protéique, mais seul 1/3 de la consommation est couverte par la production nationale. (FAOSTAT, 2011).

La salinisation est un des facteurs sévères de dégradation des sols. Approximativement 6.5% de la surface totale du monde et environ 20% de la surface cultivée sont déjà touchées par la salinité du sol (Hakim *et al.*, 2014)

Au Maghreb, plus de 30 % d'eau d'irrigation est chargée de sels, et conduit avec le temps à une accumulation des toxines aussi bien dans la rhizosphère que dans les différentes parties des plantes (Rahmoune *et al.*, 2008)

En Algérie, 3,2 million hectares de terres sont affectés par le processus de la salinisation (Benmahioul *et al.*, 2009).

La tolérance à la salinité est un caractère multigénique qui implique un complexe de réponses au niveau métabolique, cellulaire, moléculaire, physiologique et au niveau de la plante entière (Das *et al.*, 2015). La salinité ainsi que le déficit en éléments minéraux constitue un facteur limitant pour la croissance des plantes (Maathuis *et al.*, 2003; Tester et Davenport, 2003).

Les légumineuses constituent une importante composante d'aliments nutritifs, (Hassan, 2006), elles sont très riches en protéines et complètent les céréales dans la qualité nutritive et sont relativement adaptées au climat méditerranéen. (Abdelaguerfi et Ramdane, 2003).

Les graines de pois chiche sont riches en protéines et sels minéraux (Jain, 1977), le haricot est une bonne source d'énergie avec un taux élevée de protéines, fibres et glucides ainsi que l'acide folique (Edje *et al.*, 1980) et la lentille est une légumineuse très importante et largement distribuée et développée sous un large spectre de climat différents dans plusieurs pays en voie de développement (Turk *et al.*, 2004)

La valeur nutritive des légumineuses est de plus en plus importante en pays en voie de développement à cause de la demande accrue de nourriture saine et de leurs richesse en protéines et éléments nutritifs (Tharanathan et Mahadevamma, 2003 et Gupta *et al.*, 2006).

Le molybdène possède un rôle important dans plusieurs processus biologiques aussi bien chez les microorganismes que chez les plantes supérieures, et son déficit peut montrer une réduction générale dans la croissance des plantes (Graham et Stangoulis, 2005), et même s'il est disponible pour la cellule, il est inactif jusqu'à ce qu'il soit lié au molybdène cofacteur pour acquérir l'activité biologique (Mendel and Bittner, 2006).

Chez les Eucaryotes, les molybdoenzymes les plus importantes sont ; 1) la sulfite oxydase qui catalyse la dernière étape de la dégradation des acides aminés contenant du soufre et aussi impliquée dans la détoxification de l'excès de sulfite, 2) la xanthine déshydrogénase qui est impliquée dans le métabolisme de la purine et la production d'espèce réactives d'oxygène, 3) l'aldéhyde oxydase, qui catalyse plusieurs aldéhydes et essentielle dans la biosynthèse de l'acide abscissique, 4) la nitrate réductase qui catalyse l'assimilation de l'azote. (Mendel and Bittner 2006), 5) le mARC (the mitochondrial amidoxime reducing component) catalyse la réduction des substances *N*-hydroxylées (Havemeyer *et al.*, 2011) et enfin la sulfurase du molybdène cofacteur qui catalyse la moco-sulfuration et activation des deux molybdoenzymes la xanthine déshydrogénase et l'aldéhyde oxydase (Bittner, 2014).

Dans la littérature scientifique, il y a un manque dans les études menées sur le comportement des molybdoenzymes chez les légumineuses en conditions de stress salin, ce qui nous a poussé à orienter notre recherche dans ce sens.

Notre objectif est d'évaluer le comportement de trois espèces de légumineuses en condition de stress salin causé par le NaCl, et la présence du molybdène et de l'azote et d'étudier les changements qui affectent leurs molybdoenzymes sur le plan biochimique et moléculaire.

Les espèces légumineuses sont ; le haricot; *Phaseolus vulgaris* L., le pois chiche; *Cicer arietinum* L., et la lentille; *Lens culinaris* M., ce sont les espèces les plus cultivées en Algérie (Abdelaguerfi et Ramdane, 2003).

Cette thèse de doctorat est rédigée en 5 chapitres ;

Chapitre 1 : Une synthèse bibliographique

Chapitre 2 : L'effet du molybdène, de l'azote et de différentes concentrations de chlorure de sodium sur la biomasse fraîche, la chlorophylle et la nitrate réductase chez les 3 espèces.

Chapitre 3 : L'effet du molybdène, de l'azote et du chlorure de sodium sur l'activité de quelques molybdoenzymes chez les 3 espèces.

Chapitre 4 : Mise en évidence des molybdoenzymes par technique de western blot.

Chapitre 5 : L'effet du molybdène, de l'azote et du chlorure de sodium sur l'expression des gènes de molybdoenzymes chez les 3 espèces.

Conclusion générale et Perspectives

Le travail du chapitre 2 a été réalisé au laboratoire d'écotoxicologie et stress abiotiques, développement et valorisation des ressources phytogénétiques, université des frères Mentouri, Constantine1, Algérie. Le travail du 3^{ème}, 4^{ème} et 5^{ème} chapitre, a été réalisé dans le laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire, institut de biologie végétale de l'université technique de Braunschweig, Allemagne, un laboratoire pionnier dans les molybdoenzymes depuis plus de 25 ans.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1.1. La salinité

1.2. Les légumineuses

1.3. Les molybdoenzymes

1. La salinité

1.1. Introduction

Environ 40 % de la surface terrestre du monde est confrontée à des problèmes de salinité et la plupart de ces zones se trouvent dans les zones tropiques et régions méditerranéennes (Zahran 1999; Bouhmouch *et al.*, 2005).

La présence de sels et d'ions dans l'eau d'irrigation peut avoir un effet négatif sur la croissance et le développement, la salinité de l'eau autour de la zone racinaire induit des changements osmotiques et affecte directement l'absorption de certains éléments nutritifs comme le potassium K⁺ (Cornillon et Palloix 1997, Halperin *et al.*, 2003).

L'accroissement de la surface saline est due aux divers facteurs, aussi bien des raisons naturelles que des activités humaines, selon Reynolds *et al.*, (2001), l'augmentation de sels dans la surface du sol est causée par différents facteurs dans différentes régions. La salinité est fréquemment accompagnée par la saturation du sol en eau et son alcalinité, ce qui a un effet négatif sur le développement des plantes (Yeo, 1999)

Tableau 01 : La classification de la salinité de l'eau (Maillard, 2001)

Classe	EC en dS/m	Concentration en sels totale en mg/l	Type d'eau
Non saline	< 0.7	< 500	Eau potable et irrigable
Légèrement saline	0.7 – 2	500 – 1500	Eau d'irrigation
Modérément saline	2 – 10	1500 - 7000	Première eau de drainage et eau souterraine
Très saline	10 – 25	7000 – 15 000	Seconde eau de drainage et eau souterraine
Très fortement saline	25 – 45	15 000 – 35 000	Eau souterraine très salée
Saumure	>45	>45 000	Eau de mer

1.2. Les contraintes abiotiques

Le terme « stress abiotiques » est un terme général qui comprend de multiples contraintes telles que la chaleur, le froid, la sécheresse, l'excès de lumière, le rayonnement UV-B (rayonnement Ultra-violet de longueur d'onde moyenne entre 315 et 280 nm), l'excès d'eau, la salinité, les blessures occasionnées par les ravageurs et les pratiques culturales, l'exposition à l'ozone, et le choc osmotique ; on estime que 90% des terres arables sont soumises aux stress abiotiques. Certaines de ces contraintes, telles que la sécheresse, les températures extrêmes et la haute salinité limiteraient fortement la productivité des cultures (Dita et *al.*, 2006).

Un stress peut l'être pour une plante sans l'être pour une autre. Des facteurs comme l'âge sont importants.

Afin de contrer ces stress, la plante aura deux mécanismes possibles :

- Evitement du stress : il s'agit d'échapper au stress, phénomène assez rare.
- Tolérance au stress : il s'agit d'éviter la contrainte, auquel cas la réponse va permettre d'éviter une perte d'homéostasie, ou de tolérer celle-ci, auquel cas la réponse va permettre d'éviter les déformations élastiques ou plastiques (Monneveux, 1989 et McLaughlin, 2003).

Ces phénomènes de tolérance au stress sont à différencier des phénomènes d'acclimatation (caractère qui va s'exprimer en fonction de l'environnement afin de mettre en œuvre des modifications physiologique faisant face au stress, on hérite de cette capacité au niveau individuel et non par héritage génétique) et d'adaptation (héritage d'une capacité au niveau évolutif). La tolérance ne consiste qu'en une simple modification de voie (Flower, 2004).

1.3. La perception et la réponse au stress

Il y a une réponse générique par laquelle la plante perçoit et répond à un stress abiotique, elle se déroule en 4 étapes (Wohlbach et *al.*, 2008):

1.3.1. Perception du signal stress (ou des contraintes) conduisant à la synthèse d'acide abscissique. Comme chez les bactéries, ce sont des systèmes à deux composantes à chaque fois (histidine kinase) : ce sont des osmosenseurs.

1.3.2. Signalisation hormonale. Une hormone est un médiateur qui agit à très faible concentration et à distance de son lieu de synthèse pour contrôler une réponse physiologique déterminée. Toutes les cellules peuvent en synthétiser. En l'occurrence ici l'hormone de signalisation de stress est l'acide abscissique, qui module le degré d'ouverture des stomates. Par exemple, dans la racine, il y a perception de la modification du potentiel hydrique, induisant la synthèse d'ABA. Celui-ci est transporté par le xylème jusqu'aux parties aériennes, où il agira sur les stomates. Le récepteur de cet ABA, les récepteurs de types GTG (récepteurs de protéines G).

1.3.3. Transduction du signal par une voie donc dépendante de l'ABA qui passe par des Protéines G, Kinases/Phosphatases, Messagers secondaires, Cascades MAP Kinases... Il existe également d'autres systèmes de transduction du signal ABA.

1.3.4. Réponses aux stress

a. Précoces : activités enzymatiques, activation de transporteurs et canaux. La plante peut aussi modifier sa balance ionique en détournant son métabolisme. Ces osmolytes, de faibles masses moléculaires, n'interfèrent pas avec les réactions biochimiques du cytosol (utilisation de choline pour donner de la glycine bêtaïne, un osmoprotectant), et facilitent la rétention d'eau dans le cytosol pour protéger les macromolécules, et favorisent la séquestration dans la vacuole ou l'apoplasme (Reddy et *al.*, 2011).

b. Tardives : induction de gènes codant permettant d'exprimer des protéines qui vont agir dans la protection directe ou indirecte qui vont agir en synergie pour avoir la réponse la plus adaptée possible.

Un autre mécanisme qui intervient dans la régulation post-transcriptionnelle peut agir en tant que réponse au stress. Les micro ARN (miRNA) découverts pour la première fois chez les pétunias ou les silencing RNA (siRNA) permettant la synthèse de petits ARN qui vont interférer avec la séquence, conduisant soit à son inactivation, soit à sa dégradation pure et simple (Kosovà *et al.* 2011)

1.4. Le stress salin

1.4.1. Définitions

On parle de stress salin dans le cas de concentrations en sel supérieur à 100 mM dans le milieu extérieur. Bien entendu, la concentration réelle du sol dépend des conditions environnementales (évaporation, précipitation). Le stress salin altère le statut hydrique et l'homéostasie de la plante, perturbant des processus majeurs comme la croissance, la photosynthèse, ou bien encore la synthèse de protéines (Parida et Das, 2005).

Les plantes possédant des stratégies de tolérances, plus ou moins efficaces, contre le stress salin, sont dites glycophytes.

Les glycophytes vont alors adopter une ou plusieurs des quatre stratégies de réponse :

1. L'accumulation sélective : Accumuler le sel de façon sélective (sélectivité) passant par des transports passifs exergoniques (diffusion simple, canaux, transporteurs) mais aussi actifs endergoniques (transporteurs secondaires ou pompes ATPases). Il y a donc une régulation de ce qui entre et sort pour chaque élément minéral essentiel à l'aide de systèmes de transports dédiés à chacun d'eux.

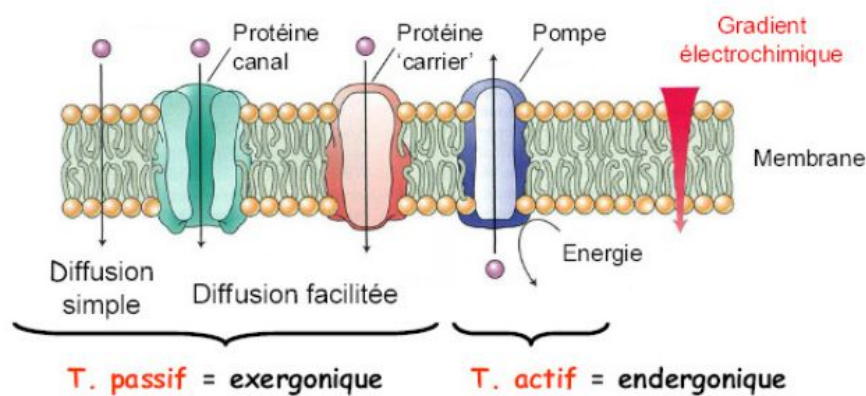


Figure 01 : L'accumulation sélective (Parida et Das, 2004)

2. L'exclusion des excès de manière à limiter la concentration en sodium dans la cellule et la plante entière en maintenant le niveau du potassium élevé et le sodium bas dans le cytosol. Les phénomènes d'exclusions passent par des modifications de la paroi (Levigneron et *al.*, 1995).

3. La compartimentation de manière à utiliser la paroi, le cytosol et les organites le mieux possible pour stocker ou ajuster l'osmolarité (Munns, 1993).

4. La recirculation ; Créer une recirculation du sel afin de ne jamais avoir d'excès et de pouvoir utiliser ce système tout le temps.

1.4.2. L'effet de la salinité

La salinité du sol peut inhiber la croissance et le rendement du haricot à cause du déséquilibre ioniques, et de la réduction du potentiel hydrique de la plante (Ashraf, 1997).

Le haricot commun est extrêmement sensible à la salinité et on estime qu'environ 5 à 30% des zones de production du haricot sont affectées par la salinité du sol (CIAT, 1992).

Les plantes cultivées montrent une variété de réactions envers la salinité comme la réduction de la croissance et du rendement. Pour la majorité des plantes, les dégâts causés par la salinité sont l'inhibition de la croissance, la sénescence et la mort au long terme. La salinité provoque la synthèse de l'acide abscissique qui mène à la fermeture des stomates et réduit la photosynthèse.

Un taux élevé des ions sodium autour de la racine perturbe l'assimilation du potassium. À cause des propriétés chimiques identiques de Na^+ et K^+ , Na^+ a un effet négatif sur l'assimilation du K^+ . Le manque de potassium à l'intérieur de la cellule mène inévitablement à la diminution de la croissance des plantes, puisque K^+ est le cation cellulaire le plus abondant qui joue un rôle important dans la préservation du potentiel de la membrane cellulaire ainsi que le maintien des activités enzymatiques et la turgescence cellulaire (Xiong et Zhu, 2002).

Après qu'il passe dans le cytosol, Na^+ inhibe l'activité de plusieurs enzymes et protéines, cette inhibition est dépendante de K^+ dans la cellule: un haut ratio Na^+/K^+ peut endommager la cellule. L'augmentation de Na^+ dans l'apoplasme augmente doucement le gradient osmotique connectant le passage de la cellule et vers la cellule. (Xiong et Zhu, 2002).

Les stress abiotiques conduisent à des changements aux niveaux morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires, ce qui affecte négativement la croissance et la production des plantes. (Rahmoune et *al*, 2000 et Rahmoune et *al*, 2001)

L'effet de salinité du sol sur le processus de la photosynthèse dans le stade végétatif aussi bien que reproductif a été étudié par plusieurs chercheurs (Yeo et al., 1985; Dionisio-Sese et Tobita, 2000; Senguttuvel et al., 2014), il a été établi que la photosynthèse et la concentration de la chlorophylle sont inversement corrélés avec le niveau de stress salin (Senguttuvel et al., 2014).

La salinité n'a pas un effet sur le taux de la chlorophylle des cultivars tolérants parce qu'ils contiennent un index de stabilité de chlorophylle élevé (Mohan et al., 2000; Sikuku et al., 2010). De même le ratio de chlorophylle a/b des plantes diminue aussi en raison du stress salin (Senguttuvel et al., 2014).

Contrairement aux variétés sensibles au stress, les variétés tolérantes maintiennent toujours le ratio chlorophylle a/b dans des conditions de stress salin. Il y a deux facteurs importants (le seuil et la pente) pour déterminer la tolérance à la salinité. Le seuil indique la concentration la plus élevée du sel à laquelle il n'y a pas de réduction de rendement et la pente indique le pourcentage de réduction du rendement par hausse d'unité du taux de sel avant d'atteindre le seuil. Certains rapports ont montré que la limitation de l'augmentation de Na^+ dans la partie aérienne sous le stress salin est liée à la tolérance à la salinité chez l'orge et le blé (Munns et James, 2003).

1.4.3. La perméabilité et la sélectivité des racines

Les ions qui peuvent causer le stress entrent dans la racine avec l'eau qui passe du sol à la partie vasculaire de la racine par deux voies, la voie symplasmique et la voie apoplasmique, dans cette dernière qui est une voie passive, l'eau passe dans l'espace intercellulaire pour délivrer le sel dans le xylème. Dans la voie symplasmique l'eau entre dans les racines par les membranes des cellules épidermiques et passe ensuite d'une cellule à une autre par les plasmodesmes jusqu'à la décharge du sel dans le xylème. Bien que l'eau puisse passivement se déplacer à travers l'espace intercellulaire, mais la présence des bandes de Caspari dans l'endoderme de la racine, restreint la voie apoplasmique (Enstone et al., 2003)

La nature chimique de la barrière apoplasmique de la racine est cruciale pour leur performance (Schreiber et al., 1999). Il a été observé que dans des racines, la subérisation des voies apoplasmiques était un caractère commun chez les plantes tolérantes, qui ont aussi une concentration basse de Na^+ dans les feuilles (Krishnamurthy et al., 2009; Cai et al., 2011).

1.4.4. La compartimentation intracellulaire

En se basant sur le potentiel osmotique de la plante, l'homoéostasie ionique cellulaire est maintenue par les pompes d'ions. Chez les céréales, les systèmes d'exclusion de Na^+ peuvent être composés de plusieurs pompes présentes sur la membrane cellulaire comme les pompes H^+ ATPase et les antiports N^+/H^+ (Jeschke, 1984).

Quand l'accumulation de Na^+ dans le cytosol devient élevée, il sera séquestré dans la vacuole avant qu'il n'arrive à un point toxique pour des réactions enzymatiques. Cette action de pompage est réglée par l'antiport Na^+/H^+ de la vacuole (Blumwald, 2000), elle est plus importante dans les espèces tolérantes que les espèces sensibles (Staal et al., 1991).

1.4.5. Les osmoprotecteurs

La majeure partie des organismes comme les plantes et les bactéries accumulent certains solutés organiques (comme les sucres, la proline... etc) en raison du stress osmotique. Ces composés sont appelés les osmoprotecteurs parce que même quand ils sont présents dans des concentrations élevées ils ne perturbent pas les réactions enzymatiques cellulaires (Johnson et al., 1968).

Ceux-ci sont trouvés dans le cytoplasme cellulaire ainsi que les ions inorganiques comme le Cl^- et Na^+ sont de préférence stockés dans la vacuole, menant par conséquent à la conservation de la turgescence cellulaire sous la pression osmotique (Bohnert et al., 1995).

1.5. Les approches « omiques » dans l'Ère Moderne

La biologie moléculaire végétale cherche à étudier des processus biologiques et cellulaires comme le développement des plantes, l'organisation de leur génome et les relations avec leur environnement. Ces études détaillées multidimensionnelles exigent l'expérimentation à grande échelle liant tous les composants génétiques, fonctionnels et structurels.

Ces expérimentations à grande échelle sont connues sous le nom de ‘’omique’’. Les partenaires de ces omiques incluent la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique et la phénoomique. Les approches 'omiques' sont régulièrement utilisées dans les disciplines de recherche sur les diverses plantes cultivées, ces approches se sont développées rapidement durant la dernière décennie. (Das et *al.*, 2015)

1.5.1. L'approche génomique

Les outils génomiques comme les marqueurs de séquences exprimées (ESTs), le profil de l'expression par puces à ADN, la sélection par la mutation ciblée ou aléatoire et l'approche de CPTA « complementation and promoter trapping approach » sont devenues disponibles et offrent l'occasion de différencier le réseau des gènes liés à la tolérance à la salinité de façon plus approfondie (Bohnert et *al.*, 2001; Kumari et *al.*, 2009; Soda et *al.*, 2013).

Bien que les efforts pour promouvoir la tolérance des plantes au stress salin par manipulation génétique a abouti à un certain accomplissement, les techniques de sélection par mutation sont utilisées comme une stratégie principale pour obtenir des variétés tolérantes au stress aussi bien que des variétés avec d'autres caractères désirés (Wang et *al.*, 2003; Flower, 2004).

1.5.2. L'approche de la transcriptomique

La transcriptomique, aussi appelé profil d'expression nécessite généralement une étude systématique et entière de tous les transcrits d'ARN ce que signifie l'expression génique spatiale et temporelle de la cellule ou le tissu d'un organisme dans une certaine condition biologique (Thompson et Goggin, 2006). Cette technique mène à l'identification d'un grand nombre de transcrits régulés sous un stress particulier ou des conditions environnementales (Sahi et *al.*, 2006; Walia et *al.*, 2007).

Les puces à ADN sont devenues un outil standard dans la biologie moléculaire et ont pris comme approche principale l'analyse de toute la réponse transcriptionnelle du génome en étudiant l'expression de tous les gènes exprimés en une seule expérience.

Le transcriptome complet à un moment donné nous permet de détecter des gènes inductibles au stress qui peuvent suggérer le processus biologiques spécifique et/ou la régulation des machineries transcriptionnelles et traductionnelle qui sont induites (Gracey et Cossins, 2003).

Les mécanismes impliqués dans la tolérance à salinité sont complexes et polygéniques (Munns and Tester, 2008).

Le plus gros défi est que le point concernant les gènes que nous avons besoin d'étudier et de manipuler n'est pas encore clair. La capacité d'évaluer les niveaux d'expression du génome entier dans une seule expérience par la technique de puce à ADN permet aux biologistes de voir quels sont les gènes exprimés ou réprimés sous des conditions extrêmes environnementales. À côté du défi de reconnaître les gènes cibles, l'approche de la transcriptomique offre un outil efficace pour identifier le ou les gène(s) impliqué(s) dans le mécanisme spécifique de la tolérance au stress (Cuartero et Bolarin, 2010).

1.5.3. L'approche de la protéomique

L'étude d'une protéine est la façon la plus courte et directe de décrire le rôle du gène lié à une protéine particulière. Néanmoins, il faut savoir que le protéome et le génome d'un organisme ne communiquent pas toujours de façon directe (Komatsu et *al.*, 2009).

Ainsi, l'investigation faite au niveau du métabolome et du protéome est aussi importante que l'étude de la génomique. L'étude de la protéomique donne une plate-forme pour analyser les fonctions biologiques complexes d'un grand nombre de protéines ainsi que le réseau interactif de diverses protéines. (Das et *al.*, 2015)

La protéomique peut servir comme technique principale pour exposer les machineries moléculaires qui sont concernées dans des interactions entre les plantes et les stress comme le stress salin. Le stress provoqué par la salinité induit l'expression des gènes divers qui sont éventuellement traduits en protéines (Liu et Bennett, 2011).

1.5.4. L'approche de la métabolomique

La métabolomique est apparu comme un outil important pour l'étude de réponses environnementales des plantes (Bundy et *al.*, 2009).

Les métabolites sont le produit final des réactions cellulaires qui reflètent la réaction des systèmes biologiques aux fluctuations environnementales (Royuela et *al.*, 2000)

L'analyse métabolomique doit décrire la position cellulaire à un stade spécifique par l'étude de tous les métabolites de la cellule (Hollywood et *al.*, 2006).

Les techniques de la métabolomique complètent les techniques de la protéomique et de la transcriptomique et montrent exactement l'état de la cellule. Un ensemble de méthodes d'investigation est accessible pour l'étude du métabolome de la plante (Okazaki et Saito, 2012), avec l'application de méthodes modernes comme « Fourier transform infrared » (FT-IR) (Johnson et *al.*, 2003), « ultra high-resolution fourier transformion cyclotron MS » (Hirai et *al.*, 2004), « gas chromatography-MS » (Kaplan et *al.*, 2004), et la résonance magnétique nucléaire (Kim et *al.*, 2010)

Les plantes réagissent aux conditions défavorables par des modifications de leur métabolisme de façon précoce ou tardive. Par exemple, la proline et le raffinose augmentent à des niveaux élevés après une exposition de plusieurs jours à la salinité, le froid, ou la sécheresse, tandis que le métabolisme glucidique central change rapidement d'une façon complexe et dépendante du temps (Urano et *al.*, 2009).

Certains changements métaboliques sont communs à tous les types de stress abiotiques, mais d'autres sont particuliers. Par exemple, le taux de sucres, de polyalcool glucidique et des acides aminés amplifient d'habitude avec la réponse aux différents stress. La proline s'accumule dans des conditions de salinité, de sécheresse et de froid, mais pas en condition de stress thermique (Kaplan et *al.*, 2004; Urano et *al.*, 2009; Lugan et *al.*, 2010).

1.5.5. L'approche de la Phénomique

La phénomique végétale est une méthode de screening avancée qui inclut l'étude du phénotype de la plante, la croissance et la performance de la plante ainsi que l'identification des caractères. Certaines méthodes de screening des caractères morpho-physiologiques divers ont été utilisées pour mesurer la tolérance à la salinité chez le riz, y compris la biomasse des plantes, la concentration de Na^+ , le ratio de Na^+/K^+ dans la partie aérienne, la surface foliaire (Zeng et *al.*, 2003). Cependant, la plupart des protocoles qui mesurent la biomasse des plantes sont destructifs ce qui rend difficile de mesurer les réponses actives de la croissance des plantes en réponse à une application d'un sel et de récolter les grains des individus mesurés. (Das et *al.*, 2015). Le progrès actuel dans le phénotypage à base d'imagerie a permis l'évaluation non destructive de réponses des plantes à la salinité et permet la détermination de la biomasse mesurée sans devoir récolter la plante entière (Berger et *al.*, 2012; Hairmansis et *al.*, 2014).

1.5.6. L'intégration des approche 'Omiques'

Les approches 'omiques' semblent être liées et dépendantes les unes des autres et l'intégration de toutes les approches 'omiques' est nécessaire pour atteindre l'objectif de développer des variétés cultivées tolérantes à la salinité.

Les études protéomiques montrent un lien important dans le métabolisme vital, par exemple, la relation du cycle de Calvin et le métabolisme glucidique sous le stress salin. Cependant, il se trouve que différentes voies métaboliques contrôlent et règlent au niveau métabolomique, la biosynthèse d'acides aminés, la photorespiration et la voie d'acide citrique (Ma et *al.*, 2013).

L'approche protéomique présume que l'augmentation de la quantité de protéines est toujours accompagnée par des composés biologiquement actifs, mais en fait cette augmentation peut inclure les facteurs induits par des changements post-traductionnelles, qui peuvent changer les caractéristiques des protéines. Ainsi, la fonction du métabolite changeant qui se passe au niveau métabolomique n'est pas très claire. D'où l'importance de la bioinformatique, dans la jonction à la réponse des changements au niveau de la transcription métabolomique ou protéomiques (Jansen, 2014).

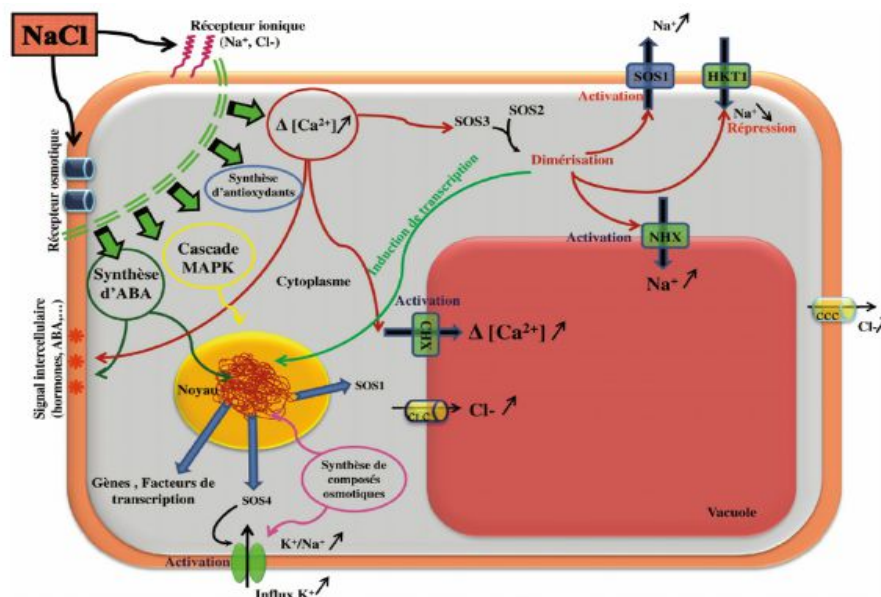


Figure 02 : Synthèse des principaux mécanismes cellulaires de perception, signalisation et réponse au stress salin (NaCl) chez la plante.

1.6. Quelques techniques

1.6.1. La PCR inverse

L'acronyme RT-PCR signifie *Reverse Transcriptase PCR*, soit une PCR après transcription inverse d'un acide ribonucléique (ARN) en ADN complémentaire (ADNc) obtenue par une transcription inverse.

La RT-PCR a été mise au point pour utiliser les ARN comme matrice d'amplification de la PCR. Elle est certainement la méthode la plus sensible pour détecter (et éventuellement quantifier), les ARN messagers au niveau d'un organe, d'un tissu ou d'une cellule. Dans ce but elle est souvent réalisée *in situ* (cf. PCR *in situ*) c'est à dire sur du matériel biologique fixé. Elle est également utilisée pour la construction de banques d'ADNc, le tri d'ARNm (*Differential Display* RT-PCR) ainsi que la construction de sondes d'ADN. (Anonyme 2)

1.6.2. Le western blot

Le western blot permet de doser les protéines spécifiques issues de cellules ou d'un tissu.

Cette technique se déroule en cinq étapes :

- a) Extraction des protéines totales à partir de cellules lysées.
- b) Séparation des protéines totales grâce à une électrophorèse native ou dénaturante. La migration des protéines dans un gel de polyacrylamide est proportionnelle à leur masse moléculaire.
- c) Transfert des protéines passant du gel à une membrane de nitrocellulose ou PVDC grâce à un système de transfert liquide. (Lebas, 2012)

Le « sandwich » de transfert se compose de papiers Wattman, du gel et de la membrane, il faut mettre, de la cathode vers l'anode, 3 papiers Wattman (buvards) imbibés de tampon de transfert, le gel, la membrane et enfin 3 papiers Wattman imbibés de tampon de transfert. Le « sandwich » ainsi réalisé est introduit dans le système de transfert.

- d) Mise en évidence des protéines recherchées grâce à un immunomarquage indirect qui se fait à l'aide d'anticorps primaire spécifiquement dirigé contre cette protéine .
- e) Révélation de l'interaction de l'anticorps avec la protéine recherchée grâce à une technique de chimiluminescence. (Kadi, 2008)

2. Les légumineuses

2.1. Introduction

Les légumineuses représentent la famille des *Leguminosae* (ou *Fabaceae*), de l'ordre des Fabales, la sous classe des *Rosidae*, et la classe des *Eudicots*. Elles forment une famille importante et variée des Angiospermes, la troisième après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae* (Doyle et Luckow, 2003).

La famille des légumineuses comprend plus de 700 genres et près de 20000 espèces (Lewis et al., 2005) répartis en trois sous-familles : les *Caesalpinoideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae*, divisées elles-mêmes en groupes de genres communément appelés tribus (Doyle, 2011).

Malgré le grand nombre d'espèces de légumineuses, seules 12000 espèces ont un intérêt économique (Aykroyd et Doughty, 1964). La famille des Papilionacées est la plus représentée (environ 10000 espèces) et exploitée par l'homme. Les légumineuses sont largement utilisées pour l'alimentation humaine et animale, en plus elles répondent aux demandes croissantes pour le développement d'une agriculture durable grâce à leur capacité de fixer l'azote atmosphérique.

D'un point de vue alimentaire, il est d'usage de distinguer les légumineuses fourragères cultivées essentiellement pour leur production de matières vertes (Luzerne, trèfle) et leur production alimentaires exploitées principalement pour leurs graines riches en protéines (fèves, féverole, pois, haricot, lentille et pois chiche) (Abdelguefi et Ramdane, 2003)

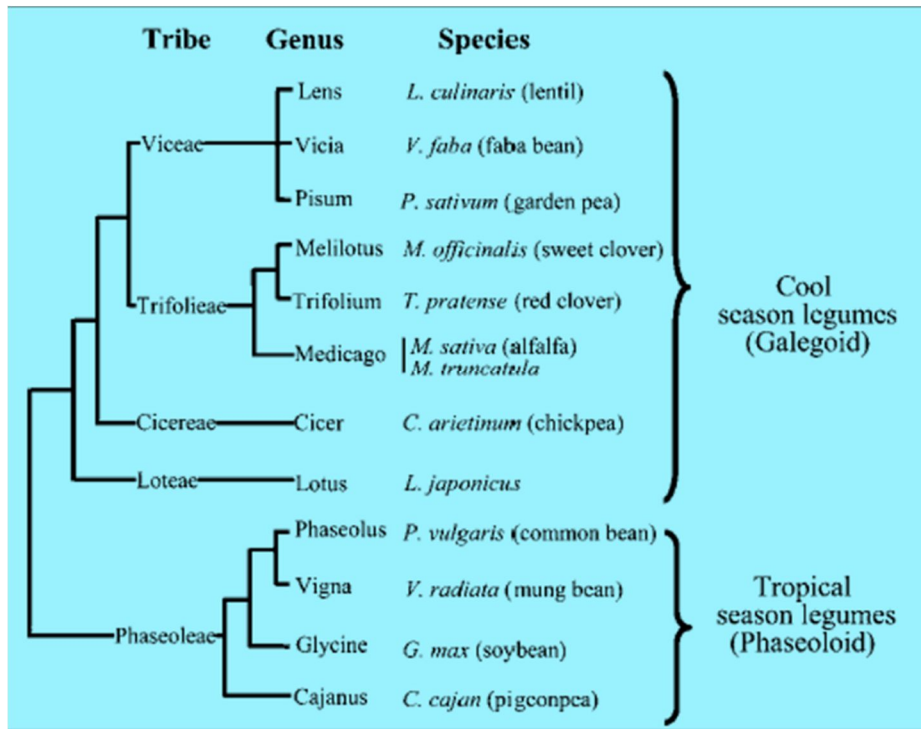


Figure 03: Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae (Zhu et al. 2005)

En Algérie, les légumineuses alimentaires (légumes secs), font partie du paysage agricole depuis des millénaires. Ces cultures sont utilisées dans la rotation avec les céréales car elles enrichissent le sol en azote. Les légumes secs sont aussi cultivés parce qu'ils constituent une importante source protéique susceptible de remplacer les protéines animales. Ils sont aussi calorifiques et riches en glucides que le blé (M .A, 2002).

Leur consommation et production est étendue au monde entier. Les grains secs comme le haricot (*Phaseolus vulgaris*), la lentille (*Lens culinaris*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), et la fève (*Vicia faba*,) sont les légumineuses les plus consommées à travers la région méditerranée (Bouchnak et Benlamri, 2013).

2.2. Phaseolus vulgaris L.

Dans le genre *Phaseolus*, le haricot commun (*Phaseolus vulgaris* L.) est l'espèce économiquement la plus importante avec plus de 90 % de la production mondiale de haricot. (Broughton *et al.*, 2003).

2.2.1. Caractéristiques botaniques

Le haricot est une plante herbacée annuelle (Laumonier, 1979). A la germination, la plante est généralement à racines pivotantes mais peu après des racines secondaires longues de 10 à 15 cm se développent sur toute la racine principale. Les fleurs sont portées en grappes axillaires et terminales. Elles sont zygomorphes composées de deux pétales en carène, deux pétales latéraux ailés et un pétale étandard disposé extérieurement. La couleur de la fleur est généralement indépendante de celle des graines (Diaw, 2002).

Le haricot a une racine principale non dominante qui est très rapidement complétée de racines latérales. Les racines peuvent atteindre un mètre de profondeur, elles sont le siège du phénomène de nodulation.

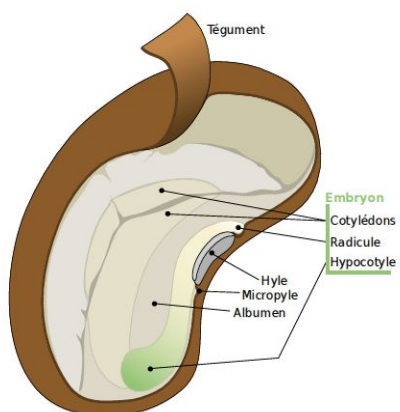
Les feuilles adultes sont pétiolées, alternes et composées trifoliées, de couleur verte, les folioles ont une forme ovale-acuminée, presque losangée et ont de 6 à 15 cm de long sur 3 à 11 cm de large. Les fruits sont des gousses déhiscentes, appelées également « cosses », de forme et de longueur variable. En particulier leur section peut être cylindrique, ovale ou aplatie. (Chaux et Foury, 1994)



Les deux première feuilles



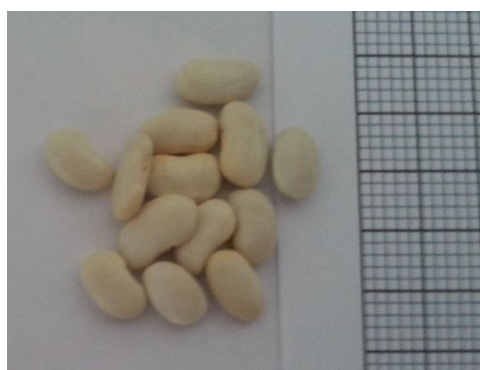
La fleur



La graine



La plantes entière et le fruit



Les graines utilisées dans ce travail

Figure 04 (a): L'espèce *Phaseolus vulgaris* L.

2.2.2. Cycle végétatif

Chez le haricot, la durée des stades de développement varie considérablement en fonction de la variété et des conditions environnementales (Adams et al., 1985).

Le cycle de végétation se déroule pendant les périodes les plus chaudes de l'année. La durée des stades de développement varie considérablement selon les variétés. En climat méditerranéen le semis s'effectue à partir de la fin avril allant jusqu'à fin mai. Le haricot est une plante très sensible au froid. Les fortes chaleurs de plus de 32 °C sont préjudiciables, faisant avorter les fleurs (Diouf., 1997).

Les graines semées germent au bout de 5 à 7 jours alors que la floraison s'effectue entre 24 et 42 jours après le semis selon les conditions climatiques, sa durée est de 5 à 30 jours. Le remplissage des graines dure de 23 à 50 jours, la maturation des graines dure de 60 à 130 jours et qui varie considérablement selon les variétés. La nodulation apparaît 15 à 30 jours après le semis (Diaw, 2002).

2.2.3. La classification du haricot

Le genre *Phaseolus* se classe dans la sous-tribu des *Phaseolinae*, tribu des *Phaseoleae*, famille des *Fabaceae* et ordre des Fabales. Selon l'APG (2003) on attribue au haricot la classification phylognétique suivante:

Sous Embreusement : Angiospermes.

Clade: Eudicots.

Clade: Rosidées.

Clade : Fabidées.

Clade: Fabale.

Clade: Fabaceae.

Genre : *Phaseolus*.

Espèce : *Phaseolus vulgaris*.

2.2.4. Origine de la culture du haricot

Les haricots du genre *Phaseolus* sont originaires d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud. Le haricot commun a été domestiqué indépendamment en Amérique centrale (Mexique et Guatemala) et dans les Andes d'Amérique du Sud (principalement le Pérou) pendant plus de 5000 ans et ensuite transporté vers d'autres continents depuis le 16^{ème} siècle (Bernal et Graham, 2001).

De nos jours, il a une importance considérable, en particulier en Amérique du Sud et en Afrique. L'espèce est bien établie dans de nombreux pays africains où elle a été introduite par les Portugais au 20^{ème} siècle, et c'est dans la région des grands lacs d'Afrique centrale que sa culture est la plus intensive (Wortmann et *al.*, 1998; Nyabyenda, 2005).

2.2.5. Importance de la culture du haricot

La culture du haricot est destinée à la consommation humaine (les gousses ou graines sont consommées à l'état frais ou les graines à l'état sec) et à l'alimentation des animaux (les résidus de cultures : tiges et gousses). En effet, le haricot constitue un aliment de base pour près de 500 millions d'êtres humains de par sa richesse en protéines (25% environ) (Pujola et *al.*, 2007).

Sur le plan agronomique et en tant que légumineuse, le haricot peut s'intégrer dans les systèmes de production biologique qui utilisent la bio-fertilisation. A cet effet, il est utilisé avec d'autres légumineuses dans les systèmes des rotations et d'associations culturales avec d'autres cultures notamment les céréales dans le but d'assurer la meilleure efficacité d'utilisation des ressources en azote (Canado et *al.*, 2003).

Le haricot et d'autres légumineuses sont considérés comme des cultures appropriées pour le perfectionnement de la bioproduktivité et la récupération des terres marginales, parce qu'elles ne sont pas seulement source de fourrage, les fruits et les graines riches en protéines, mais également connues pour l'enrichissement du sol en azote par l'association symbiotique avec le rhizobium (Gama et *al.*, 2007).

Le haricot en tant que légumineuse:

- Possède un système de fixation symbiotique de l'azote plus performant, du fait qu'il associe cette fixation à la photosynthèse (Pochon, 1981);
- Constitue un bon précédent cultural dans la rotation, comme il peut bien s'installer après les Solanacées, les Cucurbitacées et les Brassicacées et il donne un meilleur rendement s'il est cultivé après l'orge, le blé ou le maïs (Canado et *al.*, 2003);
- Apporte des masses importantes de résidus fermentescibles pouvant activer la vie microbienne du sol (Abdenour, 1982).

Le rendement moyen en Amérique du Nord et dans l'Union Européenne est de 1,63 t/ha et pour l'Afrique il n'est que de 0,59 t/ha (Anonyme 1). Ce faible rendement dans les pays en développement est dû d'une part, aux contraintes biotiques et abiotiques de production auxquelles le haricot est très sensible, et d'autre part à l'absence de variétés résistantes ou tolérantes à ces contraintes au sein du pool génique primaire du haricot. En effet, plus de 200 agents pathogènes (fongiques, bactériens et viraux) sont connus chez le haricot et certains d'entre eux causent des pertes économiques considérables (Silué, 2009).

Les facteurs abiotiques tels que les hautes températures, la sécheresse contribuent aussi à réduire les rendements du haricot, ainsi la salinité réduit la croissance des plantes de *Phaseolus vulgaris* de 25 %. (Khadri et *al.*, 2001)

2.2.6. Culture et production du haricot en Algérie

Le tableau 02 montre qu'il y a une augmentation remarquable des superficies destinées à la culture du haricot vert. La production varie indépendamment de 255230 quintaux à 450964 quintaux. Cette variation est accompagnée par des fluctuations imprévisibles des rendements de 42,60 q/ha en 2000 à 50,6 q/ha en 2009, avec un pic enregistré en 2003 de 60,44 q/ha.

La zone de production se trouve dans le littoral et le sublittoral : Alger, Jijel, Blida, Tlemcen, Tizi ouzou, Bejaia, Oran, Mostaganem. (ITCMI 2010)

Tableau 02. La production nationale du haricot (FAOSTAT, 2011)

Année	Haricot vert			Haricot sec		
	Superficie (ha)	Production (qx)	Rendement (qx/ha)	Superficie (ha)	Production (qx)	Rendement (qx/ha)
2000	5990	255230	42,6	1280	4190	3,27
2001	6000	295270	49,21	1180	7340	6,22
2002	6400	29700	46,48	1190	8640	7,26
2003	6730	406810	60,44	1560	10960	7,02
2004	7530	411000	54,55	1992	15810	7,93
2005	6928	332650	48,1	9240	6660	5,52
2006	7766	355076	45,72	1496	9145	6,11
2007	8532	413220	48,4	1394	9170	6,6
2008	8622	401208	46,5	1040	5441	5,2
2009	8918	450964	50,6	1616	11588	7,2

2.3. *Cicer arietinum* L.

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est une légumineuse, majeure et importante source de protéines dans plusieurs pays. Il est largement utilisé comme fourrage et engrais vert. Les graines de pois chiche contiennent 20,6% de protéines, 2,2% matière grasse et 61,2% glucides (Gupta, 1987). Cependant, le pois chiche, comme d'autres légumineuses cultivées, est sensible à la salinité (Ashraf et Waheed, 1993, Lauter et Munns, 1986).

2.3.1. Caractéristiques botaniques

Le pois chiche est une plante herbacée annuelle, dressée ou rampante couverte de poils glanduleux. Sa germination est du type hypogé (les cotylédons restent souterrains). Ses racines peuvent atteindre un mètre de profondeur, mais la plupart se trouvent dans les premiers centimètres (Duke , 1981).

La tige anguleuse a une hauteur de 0,20 à 1 mètre de haut. Ses feuilles se composent de 7 à 17 folioles ovales et dentées. Les fleurs peuvent être blanches ou violettes; solitaires et pédonculées. Les gousses sont renflées à 1 - 2 graines presque rondes. Le poids de 1000 grains varie de 200 à 600 grammes (Van der Maessen , 1972).



La plante entière



La fleur



Les graines utilisées dans ce travail



le fruit et la graine



La tige et les feuilles

Figure 04 (b): *Cicer arietinum*

2.3.2. Cycle végétatif

Il est considéré comme étant une plante de jours long (Summerfield et *al.*, 1979). L'intensité de la lumière et de la durée d'éclairement sont des facteurs importants pour la nodulation et la fixation d'azote (Beddar, 1990).

La température exerce une forte influence sur les phases végétatives et reproductrices de pois chiche (Summerfield et *al.*, 1979). La température optimale exigée par le pois chiche d'hiver varié entre 18°C et 29°C le jour et 20°C la nuit (Verret, 1982 et Girrard, 1985).

Il a été établi aussi que le pois chiche consomme la majeure partie de son eau dans les soixante premiers centimètres (Keating et Cooper, 1983). Sa grande capacité d'absorption de l'eau dans le sol s'effectue grâce à son système racinaire très développé à cette profondeur (Duke, 1981).

Le pois chiche résiste relativement bien à la sécheresse en raison de ses longues racines pivotantes. Il n'est pas bien adapté aux zones de grande humidité, aux sols salins lents à se réchauffer au printemps ainsi qu'aux sols engorgés d'eau. Le semis du pois chiche n'est pas préférable en terres basses, à proximité de marécages ou dans des sols à forte teneur en matières organiques, afin de prévenir une maturation inégale ou tardive (Skrypetz, 2006).

2.3.3. La classification du pois chiche

Sur le plan taxonomique, le pois chiche fait partie à la famille des : *Papilionacées*, genre *Cicer* et espèce *Cicer arietinum* L (Saxena et Singh, 1987).

Sous Embreuchement : Angiospermes.

Clade : Eudicots.

Clade: Rosidées.

Clade : Fabale.

Clade: Fabaceae.

Genre : *Cicer*

Espèce : *Cicer arietinum* (USDA, 2008)

2.3.4. Origine du pois chiche

Le pois chiche est probablement originaire du Moyen-Orient, plus précisément du Sud-Est de la Turquie et de la Syrie (Saxena, 1984 ; Singh, 1997). Des restes carbonisés découverts au Proche-Orient indiquent que cette espèce était cultivée au VII^{ème} millénaire avant notre ère avec les céréales, le petit pois et la lentille (Vanier, 2005 ; Redden et Berger, 2007).

L'expansion de cette culture a été rapide dans les régions méditerranéennes et on a indiqué que *Cicer reticulatum* Ladiz., a 2n chromosomes (2n = 16 chromosomes) et a identifié par des analyses protéiques et enzymatiques, comme étant l'ancêtre spontané du pois chiche. (Ladizinsky (1989)

2.3.4. La culture du pois chiche

Le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) est la troisième légumineuse alimentaire cultivée dans le monde, après le haricot et le petit pois. Avec une production mondiale moyenne de 9 millions de tonnes sur 11 millions d'hectares (Goodwin, 2005 ; Saxena, 1990).

Le pois chiche est cultivé dans plus de 45 pays dans le monde : en Asie et en Orient mais plus particulièrement en Inde où la production couvre près 70% des besoins à l'échelle mondiale (Skrypetz, 2004).

En Afrique et en Amérique, la production ne couvre que respectivement 4% et 3% des besoins mondiaux en pois chiche (Singh, 1990). Cette culture représente une source de protéines de qualité pour les pays en voie de développement, en effet, les protéines et les glucides représentent ensemble plus de 80% de la matière sèche des grains de pois chiche. Les protéines de pois chiche sont riches en acides aminés essentielles pour l'alimentation humaine (Goodwin, 2005).

En Algérie, le pois chiche représente la deuxième culture de légumineuses alimentaires après la fève avec une production de 17842 tonnes sur une superficie de 22274 hectares en 2009 (Faostat, 2011) (Tableau 03).

Tableau 03 : Production du pois chiche en Algérie

Cultures	Superficies (Ha)	Productions (Tonne)	Rendement (qx / ha)
Fève /Féverole	32278	36495	5.13
Pois chiche	22274	17842	5.30
Pois – sec	8487	5969	3.45
Lentilles	2588	2693	3.95
Haricot sec	1616	1159	5.22

2.4. *Lens culinaris* M.

La lentille (*Lens Culinaris*) Medik est le nom donné par le botaniste allemand Medikus en 1778 (Cubero, 1981). Les graines de lentille ont une valeur importante dans l'alimentation humaine et contiennent une grande quantité de protéines (22.0-34.5%), de glucides (65%) ainsi que des éléments minéraux et des vitamines (yadav et *al.*,2007)

2.4.1. Caractères botaniques

Toutes les espèces du genre *Lens* sont des plantes herbacées annuelles diploïdes ($2n = 14$). La tige de la lentille est mince, elle atteint rarement plus de 45 cm de hauteur et a une croissance indéfinie. Les deux premiers nœuds de la tige se situent au niveau du sol ou sous la surface. Les feuilles sont pennées et comportent jusqu'à 10 paires de folioles.

La première fleur de la tige principale est située à l'aisselle du 11e, 12e ou 13e nœud. Les gousses, aplaties, sont isolées ou disposées en paires et apparaissent à l'aisselle du 11e, 12e ou 13e nœud et des nœuds suivants. La couleur du tégument séminal est variable, allant du blanc (absence de tannins) au vert pâle, au gris, au brun et au noir (Vandenberg et Slinkard, 1990).

La lentille cultivée est classée en deux groupes selon la taille de la graine. Le groupe macrosperma prédominant principalement en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique (diamètre supérieur à 6 mm), tandis que Le groupe microsperma (diamètre inférieur à 6 mm) domine en Asie, en Egypte, et en Ethiopie (Brink et Belay, 2006).



La plante entière



Les feuilles



Les graines utilisées dans ce travail



Les graines



La fleur

Figure 04 (c): *Lens culinaris*

2.4.2. Cycle végétatif

La lentille est une culture de saison fraîche avec une résistance modérée à la sécheresse et haute température, et généralement elle a besoin de jours longs pour fleurir. Elle peut se cultiver sur de nombreux types de sols, depuis les sols sableux à argileux assez lourds, la plante ne supporte pas les sols gorgés d'eau, et elle ne tolère ni l'inondation, ni la salinité. Un pH avoisinant 7 convient le mieux à la lentille (Saskatchewan Pulse Growers, 2000 ; Brink et Belay, 2006).

La lentille pousse à des températures moyennes de 12-27°C, mais elle ne convient pas aux régions tropicales chaudes et humides. Elle nécessite une pluviométrie annuelle d'environ 750 mm et un temps sec au moment de la récolte.

Le cycle de croissance est 110 à 130 jours (Brink et Belay, 2006). La couleur des graines varie selon les variétés des plus pâles (vert pâle, blond, rose) au plus foncé (vert foncé, brun, violacé...) (Vandenberg et Slinkard, 1990).

2.4.3. La classification de la lentille

Le genre *Lens* appartient à la famille des légumineuses, ou Fabacées, et à la tribu des Viciées. Il comprend les espèces suivantes : *Lens culinaris* Medikus, *L. orientalis* (Boiss.), *L. nigricans*, *L. ervoides*, *L. odemensis* Ladiz., *L. lamottei*, et *L. tomentosus*. (Ladizinsky *et al.*, 1989; van Oss *et al.*, 1997).

Sous Embranchement : Angiospermes.

Clade: Eudicots.

Clade: Rosidae

Clade: Fabales

Clade : Fabaceae/Leguminosae

Genre : *Lens*

Espèce : *Lens culinaris* Medik. (USDA, 2008)

2.4.4. Origine de la lentille

Le centre d'origine de la lentille cultivée se situe au Proche-Orient (Zohary, 1972), d'où elle s'est diffusée vers la Méditerranée, en Asie, en Afrique et en Europe, c'est un des plus anciens légumes secs cultivés (Brink et Belay, 2006). La lentille est maintenant cultivée partout dans le monde : sous-continent indien, Moyen-Orient, Afrique du Nord, Europe du Sud, le Nord et le Sud d'Amérique et en Australie (Chahota et *al.*, 2007).

2.4.5. Importance de la lentille

La lentille est une légumineuse importante et populaire utilisée principalement pour l'alimentation humaine, la paille peut également être utilisée comme aliment pour le bétail ou en tant que source de matières organiques pour l'amélioration des sols (Saskatchewan Pulse Growers, 2000).

Les jeunes gousses, les graines germées et les feuilles se consomment comme légume. Les graines de lentille peuvent servir de nourriture parfois aux animaux, en particulier les volailles pour leur procurer des protéines. La lentille se cultive parfois pour le fourrage ou comme engrais vert (Brink et Belay, 2006).

2.4.6. Culture de la lentille

La production mondiale de lentilles est estimée à 2,8 millions de tonnes (MT), loin derrière le haricot, le pois et le pois chiche. Les principales zones de productions sont le sous-continent indien, le Proche-Orient et l'Amérique du Nord.

L'Inde (1,1 MT), Le Canada (0.58 MT), la Turquie (0,38 MT), le Bangladesh (0.13 MT), les États-Unis (0.13 MT), le Népal (0.13 MT) et la Chine (0.12 MT) produisaient à eux seuls au-delà de 75% de la production mondiale. (Anonyme 3)

Une récolte de 37.627 quintaux de lentilles, a été engrangée dans la wilaya de Constantine, au titre de la saison agricole 2010-2011, (Anonyme 4)

2.5. Valeur nutritive des légumineuses

Une consommation régulière de légumineuses réduit la survenue de maladies cardiovasculaires ; chez les végétariens, les légumes secs associés aux céréales, aux œufs et aux produits laitiers sont essentiels à l'équilibre protéique grâce à leurs richesses en protéines et vitamines comme il est illustré dans le tableau 04. (Anonymes 5)

Tableau 04 : La valeur nutritive du haricot, du pois chiche et de la lentille

	Haricot	Pois chiche	lentille
Eau (g)	66	60.2	70
Protéine (g)	7	8.9	8.2
Lipides (g)	0.5	2.5	0.5
Glucides (g)	16.9	18.7	12.6
Amidon (g)	16	17.6	12.3
Fibres (g)	8	8.6	7.8
Valeurs énergétiques Kcal	103	136	90
Calcium (mg)	60	56	19
Fer (mg)	2.6	2.8	3.3
Magnésium (mg)	50	53	32
Vitamine K (mg)	460	335	275
Vitamine B1 (mg)	0.13	0.13	0.13
Vitamine B2 (mg)	0.05	0.06	0.07
Vitamine B3 (mg)	0.5	0.6	0.6
Vitamine B6 (mg)	0.13	0.14	0.16

3. Les molybdoenzymes

3.1. Introduction

Pour une bonne croissance et un développement optimal des plantes, 17 éléments essentiels sont exigés chez les plantes cultivées. Quand ces éléments minéraux sont utilisés en grande quantité, on les nomme les macroéléments, et s'ils sont utilisés en petites quantités, ils sont nommés microéléments mais tout aussi importants que les macroéléments. Si l'un de ces éléments manque dans le sol ou ne se trouve pas en bon équilibre avec les autres éléments, une croissance réduite ou arrêtée pourrait en découler (Mengel *et al.*, 2001).

Les microéléments peuvent agir comme cofacteurs dans certains systèmes d'enzymes et participent à des réactions redox et leur déficience peut entraver des processus physiologiques et donc limiter le rendement. (Mengel *et al.*, 2001)

3.2. La nutrition minérale en molybdène et azote

Bien que les éléments mineurs ou oligo-éléments soient utilisés en faible quantité par les plantes, ils ne sont pas moins indispensables que les macroéléments.

En effet, ils sont nécessaires à un métabolisme normal pour assurer une bonne croissance. Plus précisément, les éléments mineurs contribuent à différentes fonctions physiologiques des plantes à des concentrations faibles (Esteves, 2006).

Les deux formes majeures dont l'azote est absorbé par les racines des plantes sont les ions NO_3^- et NH_4^+ , chaque ion influence la croissance et le développement de façon différentes (Pilbeam et Kirkby, 1992)

Alors que le nitrate (NO_3^-) est transporté et assimilé dans la partie aérienne par la majorité des plantes annuelles, l'ammonium (NH_4^+) doit être assimilé dans les racines et le produit de cette assimilation est transporté vers les feuilles. (Lips *et al.*, 1990)

En matière de fertilisation, on distingue trois types d'éléments nutritifs. (Tableau 05)

Tableau 05. Les types d'éléments nutritifs pour les végétaux. (Esteves, 2006)

Eléments majeurs	Eléments secondaires	Eléments mineurs	Indésirables
N (Azote) P (Phosphore) K (Potassium)	Ca (Calcium) Mg (Magnésium) S (Soufre)	Zn (Zinc) Cu (Cuivre) Mn (Manganèse) Fe (Fer) B (Bore) Mo (Molybdène)	As (Arsenic) Cd (Cadmium) Hg (Mercure)

- **Rôle de l'azote dans la plante**

Généralement, l'azote représente en moyenne 1 à 5% de la matière sèche végétale, les fabacées présentent les teneurs les plus élevées (5%). Bien que ces teneurs soient faibles, l'azote entre dans la fabrication des acides nucléiques ou aminés, des protéines, de la chlorophylle et de molécules indispensables à la croissance et au développement des plantes. (Arkoun, 2012)

Dans les tissus, les composés protéiques sont majoritaires, expliquant que de nombreuses plantes agricoles sont essentiellement cultivées pour la production de protéines végétales. Le nitrate et l'ammonium sont les principales sources d'azote pour la croissance des plantes dans la plupart des environnements naturels et agricoles (Raven et *al.*, 1992).

L'ammonium, le nitrate et l'urée, constituent donc les trois principales formes minérales d'engrais azotés. L'efficacité des engrais minéraux est influencée par le principe des échanges d'ions. En raison de sa charge positive, l'ammonium est adsorbé par les colloïdes du sol chargés négativement (argile et matière organique). Le NH_4^+ est ensuite, soit absorbé par les plantes, soit oxydé en nitrate par les bactéries du sol via le processus de nitrification. En outre, l'ammonium apporté par fertilisation peut aussi être perdu par volatilisation dans l'atmosphère. (Arkoun, 2012)

Le nitrate est considéré comme la source d'azote majoritaire (Marschner, 1995), avec des concentrations plus élevées que celles de l'ammonium, notamment dans les sols bien aérés.

3.3. La géochimie du molybdène

Le molybdène (Mo) est un métal rare (0.001% de l'écorce terrestre). Ses principaux minerais sont la molybdénite (MoS_2), la wulfénite (PbMoO_4), la molybdite ($\text{MoO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$), la powellite $\text{Ca}(\text{MoW})\text{O}_4$. Actuellement, seule la molybdénite est exploitée. (Calmon et Métivier, 2003)

Le molybdène est présent dans la lithosphère à des niveaux moyens jusqu'à 2.3 mg/kg. Les sols acides peuvent être caractérisés par un niveau toxique de manganèse et de non disponibilité de molybdène. (Subba Rao *et al.*, 1993)

Le molybdène est important dans la nitrate reductase et est nécessaire à l'assimilation des nitrates du sol (Bishop and Premakumar, 1992)

3.4. Le molybdène cofacteur

Plus de 50 enzymes sont connues pour contenir le Mo dont la plupart d'eux appartiennent aux bactéries, alors que chez les plantes leur nombre est bien plus réduit. (Mendel, 2007)

Le molybdène cofacteur (Moco) est une partie des sites actifs de toutes les molybdoenzymes, sauf la nitrogénase. Le molybdène cofacteur consiste en une molybdoptérine, une pyranoptérine phosphorylée avec un ene-dithiolate qui contient du molybdène. Le molybdène cofacteur (Moco) en tant qu'un centre catalytique joue un rôle important dans les cycles de carbone, soufre et l'azote. (Mendel, 2007). Le molybdène cofacteur est synthétisé par une voie de biosynthèse hautement conservatrice. (Kuper et *al.*, 2004)

Le ligand dithiolène est spécifique aux enzymes mononucléaires à molybdène. La figure 05 montre la structure du ligand du molybdène. C'est une molécule tricyclique, comportant un motif ptérine, auquel est accolé un cycle pyrane qui porte la fonction dithiolène et un groupement phosphate.

Un nucléotide peut être lié au pyrane via une liaison pyrophosphate. Il s'agit le plus souvent de la guanosine phosphate ou de la cytidine phosphate. Chez les eucaryotes on retrouve uniquement la forme mononucléotidique (molybdoptérine, MPT). Les formes dinucléotides (PGD, PCD) sont retrouvées chez les procaryotes seulement (figure 05). Cette molécule est fixée dans la protéine grâce à de nombreuses liaisons faibles de type liaison hydrogène ou π -stacking.

La nomenclature de ces composés n'est pas consensuelle. Les termes pyranoptérine, molybdoptérine, ou encore tétrahydropyranoptérine sont les plus employés (Jacques, 2014)

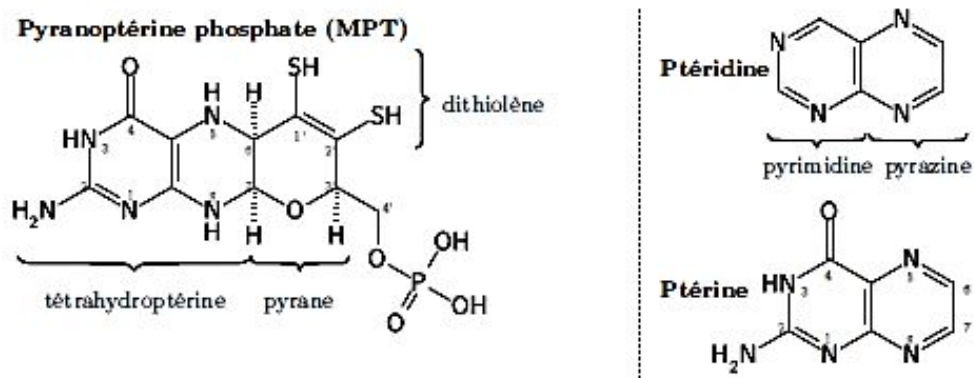


Figure 05 : la structure du ligand du molybdène

Pour décrire de façon schématique la fonction catalytique des enzymes à molybdène, nous pouvons dire qu'elles catalysent des réactions de transfert d'atome d'oxygène (OAT), mais là-aussi, de nombreuses exceptions sont connues, et la diversité des substrats est très large (Grimaldi et *al.*, 2008).

La plupart des réaction catalysées par les enzymes à molybdène sont des oxydations ou des réductions, avec transfert d'un atome d'oxygène entre le substrat et le molybdène. Cet atome est échangé avec une molécule d'eau (du solvant) pendant le cycle catalytique. (Jacques, 2014)

3.5. Les molybdoenzymes

Les molybdoenzymes sont requises dans de diverses réactions clés dans le métabolisme du carbone, du soufre et de l'azote et bien que jusqu'ici plus de 50 molybdoenzymes ont été trouvées dans la nature, leur nombre ne cesse d'augmenter . Tandis que la majeure partie des molybdoenzymes est d'origine bactérienne, seulement un nombre limité est présents chez les eucaryotes, où on peut les subdiviser en deux familles:

La famille de la xanthine oxydase (XO), représentée par la xanthine déshydrogénase (XDH), l'aldéhyde oxydase (AO), la pyridoxale oxydase et lanicotinate hydroxylase et la famille de la sulfite oxydase, représentée par la sulfite oxydase (SO), la nitrate réductase (NR) et le complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes (mARC), qui a été identifié récemment dans les mitochondries du foie de porc (Havemeyer et *al.* 2006).

La xanthine désydrégénase (XDH), l'aldéhyde oxydase (AO) et le complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes (mARC) se trouvent typiquement chez les eucaryotes. Comme la nitratre réductase (NR) est exigée pour l'assimilation de nitratre, cette enzyme est présente seulement chez les organismes autotrophes comme les plantes. En général, toutes ces molybdoenzymes catalysent le transfert d'un atome d'oxygène, dérivé de ou incorporé à l'eau, ou à un substrat (Kisker et *al.* 1997; Hille, 2002).

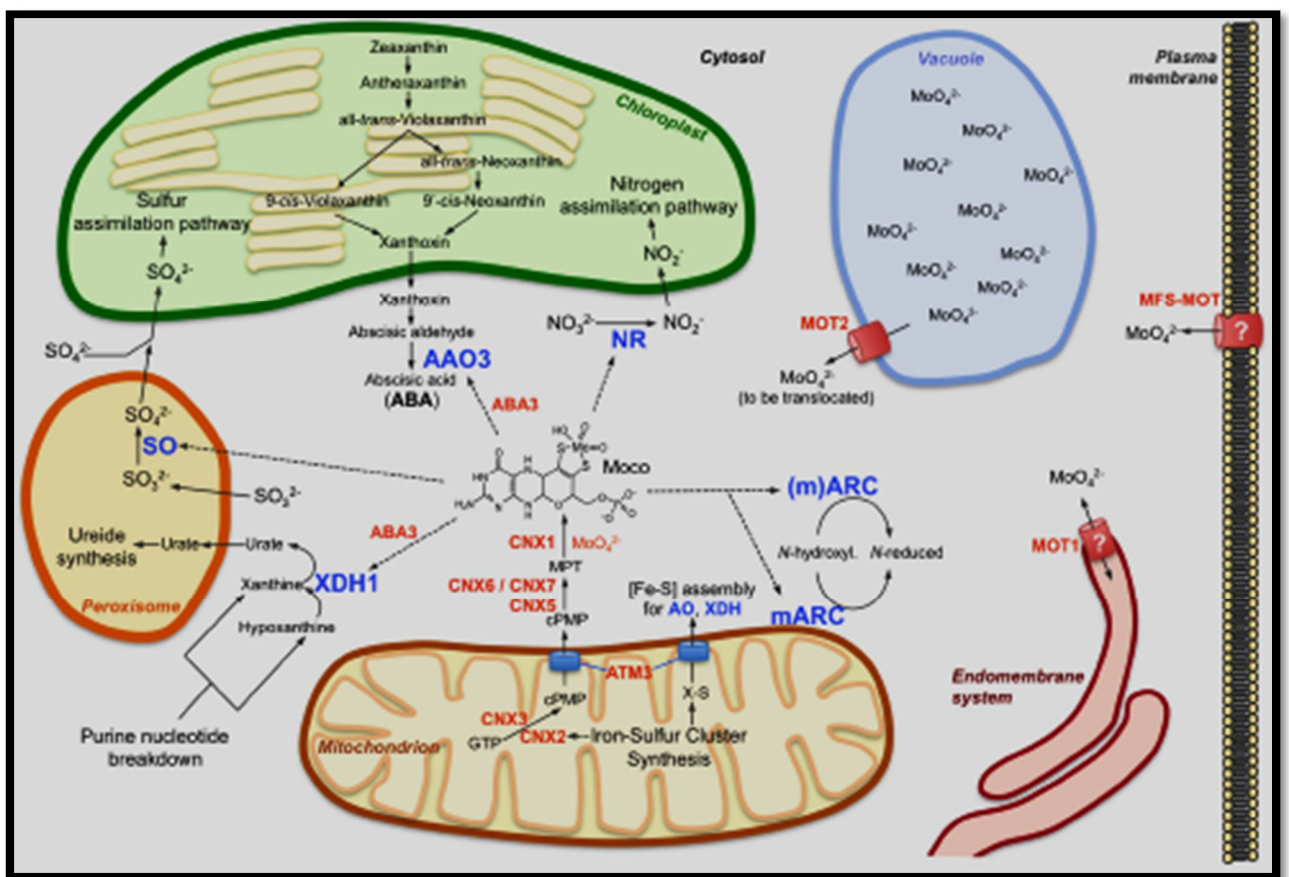


Figure 06 : Le métabolisme du molybdène (Bittner, 2014)

3.5.1. La xanthine déshydrogénase

La XDH végétale (CE 1.17.1.4., autrefois CE 1.1.1.204) a été purifiée de plusieurs sources comme les nodules de haricot (Boland and Schubert, 1982), des algues vertes (Perez-Vicente et *al.*, 1992), des feuilles de blé (Montalbini, 1998), de *Arabidopsis* (Hesberg et *al.* 2004), des feuilles de légumineuses (Montalbini, 2000) et des plantules de pois (Sauer et *al.*, 2002).

L'enzyme catalyse essentiellement l'hydroxylation oxydative d'une vaste gamme d'aldéhydes et hétérocycles aromatiques, mais est mieux connue comme une enzyme clé dans la voie de dégradation de la purine où elle oxyde l'hypoxanthine en xanthine et la xanthine en acide urique.

L'enzyme est active comme un homodimère composé de deux sous-unités identiques d'environ 145 kDa, chacune étant subdivisée en trois domaines distincts: un domaine N-terminal de 20 kDa, un domaine de 40 kDa hébergeant un site de liaison de FAD et un domaine de C-terminal de 80 kDa nécessaire à la liaison Moco et à la dimérisation. En plus de la production l'hypoxanthine/xanthine dépendante d'espèce réactive d'oxygène (ROS), l'activité d'oxydase du NADH avec la production simultanée de superoxyde a aussi été montrée pour la XDH végétale (Yesbergenova et *al.* 2005).

Donc, XDH ne décompose pas seulement les purines, mais aussi a des fonctions physiologiques supplémentaires dans le métabolisme des espèces réactives d'oxygène (ROS). En plus, les activités de la XDH et la production de ROS simultanée ont été observés dans des interactions pathogènes-plantes (Montalbini, 1992, Montalbini and Della Torre, 1996), le stress hydrique (Yesbergenova et *al.*, 2005) et la sénescence (Del Rio et *al.*, 1998). Que cette coïncidence puisse directement être relatée seulement à XDH ou est une conséquence indirecte des différentes voies enzymatiques impliquant la XDH, cela doit être démontrée.

Une localisation cytosolique a été rapportée par (Datta et *al.*, 1991) et une localisation peroxysomale a été décrite par (Sandaglio et *al.* 1988). Cependant, un article rapporte que la XDH est localisée tant au cytosol qu'au peroxysomes (Corpas et *al.*, 2008).

3.5.2. L'Aldéhyde oxydase

Comme la XDH, l'aldéhyde oxydase (AO) est une molybdo-flavoenzyme ferrique qui catalyse l'oxydation d'une variété d'aldéhydes aromatiques et non-aromatiques à leur acide carboxylique correspondant. Comme les protéines AO partagent beaucoup de substrats aussi bien qu'un degré d'homologie avec la XDH, il est présumé que pendant l'évolution AO est dérivée de XDH par la duplication des gènes et par néo-fonctionalisation (Terao et al., 2001; Rodriguez-Trelles et al., 2003).

Les caractéristiques qui distinguent les enzymes AO de XDH concernent le substrat et la liaison de l'accepteur physiologique d'électrons (Hille, 2005). Les enzymes AO sont des oxydases strictes qui ne peuvent pas lier NAD^+ et utilisent exclusivement l'oxygène moléculaire comme l'accepteur d'électrons. En plus du transfert des électrons dérivés du substrat à l'oxygène moléculaire, AO végétale produit le peroxyde d'hydrogène (Yesbergenova et al., 2005), tandis que AO animale, en plus, elle produit des anions superoxydes (Badwey et al., 1981).

Le génome de *Arabidopsis* héberge quatre gènes AO, AAO1 - AAO4, dont les produits forment des homodimères aussi bien que des hétérodimères, menant ainsi aux spécificités changées de substrat des isoenzymes respectives. (Bittner and Mendel, 2010)

L'homodimère AAO3, aussi nommée comme AOD, est caractérisé par la haute préférence pour l'aldéhyde abscissique comme substrat (Seo et al., 2000), qui est le précurseur de l'acide abscissique (ABA) qui est impliqué dans beaucoup d'aspects de croissance et de développement végétale, y compris la maturation de la graine, la dormance, la sénescence des feuilles, aussi bien que l'adaptation à une variété de stress environnementaux (Seo et Koshiba, 2002; Verslues et Zhu, 2005; Mauch-Mani et Mauch, 2005).

Les mutants d'*Arabidopsis* avec une mutation en AAO3 sont donc caractérisés par des niveaux ABA réduits accompagnés par la perte excessive d'eau et un phénotype flétri et aussi par la croissance végétative tardive et la tolérance réduite au stress (Seo et al., 2000; Gonzalez-Guzman et al., 2004).

3.5.3. La Sulfite oxydase

La sulfite oxydase (SO) (CE 1.8.3.1), l'enzyme qui donne son nom à la 2^{ème} famille des molybdoenzymes, catalyse l'oxydation du sulfite en sulfate, l'étape finale dans la dégradation d'acides aminés soufrés. Tandis que l'enzyme animale consiste essentiellement en un domaine N-terminal cytochrome b5 et un domaine C-terminal responsable de la liaison de Moco et de la dimerisation (Kisker et al. 1997), la SO végétale ne possède pas un domaine cytochrome b5 (Eilers et *al.*, 2001; Schrader et *al.*, 2004).

La sulfate oxydase est la molybdoenzyme la plus simple trouvée chez les eucaryotes avec son centre redox intramoléculaire. Comme XDH et AO, la SO végétale libère des électrons pendant l'oxydation du substrat et les transfère par la suite à l'oxygène moléculaire avec la formation simultanée de peroxyde d'hydrogène (Hansch et *al.*, 2006), par contre, chez l'enzyme animale, c'est le cytochrome qui sert d'accepteur final d'électrons.

Tandis que la SO animale est située dans l'espace intermembranaire des mitochondries (Kisker et *al.*, 1997), la SO végétale se trouve dans la matrice du peroxysome (Nowak et *al.*, 2004).

Comme le sulfite est un important nucléophile qui peut réagir avec une large variété de composants cellulaires, il a été présumé que la SO est requise pour éliminer l'excès du sulfite de la cellule. Dans des conditions normales cependant, le manque de l'activité de la SO chez les plantes n'est pas relaté à un phénotype précis, suggérant que la SO est une enzyme de récupération plutôt qu'une enzyme de maintien métabolique. (Bittner and Mendel, 2010)

Comme XDH et AO, la SO végétale libère des électrons durant l'oxydation de son substrat et par conséquent la formation du peroxyde d'hydrogène (Hansch et *al.*, 2006).

Une déficience génétique en sulfite oxydase est létale au bout de quelques semaines de la vie du nouveau-né.(Jacques, 2014)

3.5.4. La nitrate réductase

La nitrate réductase NR (CE 1.7.1.1., autrefois CE 1.6.6.1) est une enzyme clé dans l'assimilation du nitrate qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite dans le cytosol. Puisque la NR fournit des métabolites d'azote essentiels à la plante, il est évident que les plantes avec un manque dans la NR ne sont plus autotrophes par rapport à l'azote et dépendent de sources alternatives d'azote comme l'ammonium. (Bittner and Mendel, 2010)

Comme AO et XDH, la NR consiste aussi en trois domaines distincts, mais en ordre et composition différente. Le domaine N-terminal de la NR monomère est responsable de lier le Moco et est suivi par un domaine cytochrome b5 liant un hème et un domaine C-terminal liant un FAD. Comme pour XDH, AO et SO, la NR active est formée par dimérisation de deux monomères de NR. (Bittner and Mendel, 2010)

Contrairement aux réactions catalysées par XDH, AO et SO, le processus de réduction du nitrate consomme plutôt que produit des électrons qui dérivent soit de NADH ou NADPH. Tandis que les formes spécifiques NADH de NR sont les plus abondantes chez les plantes supérieures et des algues, les formes spécifiques NADPH ont été exclusivement trouvées chez les champignons. Le transfert des électrons intramoléculaire commence par la réduction du FAD par NAD(P)H, les électrons sont alors transférés via le domaine hème-cytochrome b5 au Centre à Molybdène, où ils sont requis pour réduire le nitrate en nitrite avec une libération concomitante d'hydroxyde (Skipper et *al.*, 2001).

La nitrate réductase végétale est fortement régulée aussi bien au niveau d'expression qu'au niveau post-traductionnel. Dans l'assimilation de l'azote, le nitrite est réduit à l'ammonium par la nitrite réductase dans les chloroplastes, il peut aussi être réduit au monoxyde d'azote (NO) par la NR elle-même (Yamasaki et Sakihama, 2000).

La signalisation de la molécule NO générée par NR pourrait bien contribuer au développement et croissance des végétaux et à la protection contre la cytotoxicité des ROS (Beligni et Lamattina, 2000) et à l'accumulation des phytoalexine (Noritake et *al.* 1996), et aussi la résistance des plantes aux pathogènes (Durner et Klessig, 1999) en augmentant le niveau de l'acide salicylique.

3.5.5. Le complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes

Récemment a été identifié chez l'homme une enzyme appelée complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes (mARC) (Wahl et *al.*, 2010). Le rôle de cette protéine semble être de réduire les bases nucléiques N-hydroxylées, potentiellement mutagènes, mais elle semble également réguler la production de NO, par réduction de la N ω -hydroxy-l-arginine, qui est un intermédiaire de la biosynthèse du NO. L'activité de cette enzyme a aussi un impact pharmacologique, car certains médicaments portent une fonction amidoxime (Mendel et Bittner, 2006).

Le mARC (Mitochondrial Amidoxime Reducting Component) catalyse la réduction d'une variété de composés N-hydroxylés, dont certains sont largement utilisés en tant que médicaments et sont donc d'intérêt pharmaceutique (Havemeyer et *al.*, 2006; Gruenewald et *al.*, 2008).

Tous les génomes eucaryotes connus pour coder pour des protéines pour la biosynthèse du Moco et des molybdoenzymes, codent également deux protéines mARC, suggérant que les protéines mARC forment leur propre petite famille de protéines. Tandis que l'enzyme du foie de porc a été identifiée dans la membrane externe des mitochondries (Havemeyer et *al.*, 2006), des travaux antérieurs ont montré que les protéines mARC représentent une fraction de protéine abondante dans la membrane interne des mitochondries de souris (appelés protéines MOSC, Da Cruz et *al.*, 2003).

Avec une masse moléculaire moyenne de ~35 kDa et en raison du fait qu'ils se lient au Moco comme le seul groupement prosthétique, les protéines mARC sont les plus petites molybdoenzymes identifiées jusque-là. Bien que les substrats spécifiques d'enzymes mARC ne sont pas encore connus, on a démontré que les orthologues bactériens de mARC, (YcbX et YiiM), protègent la cellule contre les dommages de l'ADN par détoxification des bases N-hydroxylés mutagènes tels que 6-N-hydroxylaminopurine (Kozmin et *al.*, 2008), qui peut essentiellement servir aussi de substrats pour les enzymes eucaryotes (Bittner and Mendel, 2010).

3.5.6. La sulfurase du molybdène cofacteur

Les molybdoenzymes végétale peuvent être subdivisés en deux familles. Alors que les enzymes de la famille sulfite oxydase, les SO et NR, sont activés lors de l'insertion du Moco, les membres de la famille de la xanthine oxydase, les XDH et AO, nécessitent une étape finale de maturation pendant ou après l'insertion du Moco. En plus des soufres dithiolène du fragment ptérine et deux oxo-groupes, l'atome Mo du Moco a besoin de l'addition d'un atome de soufre inorganique terminal afin de fournir une activité enzymatique à l'enzyme respective. (Bittner and Mendel, 2010)

In vitro, ce soufre peut être éliminé des protéines XDH / AO actives par traitement au cyanure, générant ainsi une enzyme désulfuré inactive (Massey et Edmonson 1970).

La réaction est cependant réversible, et l'enzyme peut être réactivée par un traitement de soufre dans des conditions réductrices. In vivo, ce soufre est ajouté au Moco de XDH et AO par une réaction enzymatique spécifique, catalysée par la protéine la sulfurase du Moco. L'enzyme a été cloné à partir de *Arabidopsis* (Bittner et al., 2001; Xiong et al., 2001) et la tomate (Sagi et al., 2002).

D'après son mutant correspondant, qui est caractérisé par la perte simultanée d'activités de XDH et AO et par une déficience de l'ABA, l'enzyme provenant de *Arabidopsis* est appelée ABA3 (Leon-Kloosterziel et al., 1996).

ABA3 est une protéine formé d'un homodimère à deux domaines. Son domaine N-terminal partage des homologues structurelles et fonctionnelles avec la cystéine désulfurases bactériennes (Bittner et al., 2001; Heidenreich et al., 2005).

Le domaine C-terminal de ABA3 partage un degré important de similitude avec des protéines mARC. (Woller et al., 2008, Lehrke et al., 2012 et Mendel, 2013).

En fait, une induction rapide du gène *aba3* a été remarqué en condition de stress salin et hydrique chez *Arabidopsis* (Bittner *et al.*, 2001)

L'aldéhyde oxydase est une enzyme à Moco qui nécessite une sulfuration pour être activée. Cette étape est catalysée par une Moco sulfurase qui code le gène *ABA3/LOS5* chez *Arabidopsis*. (Xiong *et al.*, 2002)

Chapitre 2

L'effet du molybdène, l'azote et de différentes concentrations de chlorure de sodium sur la biomasse fraîche, la chlorophylle et la nitrate réductase

2.1. Introduction

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Préparation des plantes

2.2.2. La biomasse fraîche aérienne

2.2.3. Dosage de la chlorophylle

2.2.4. Dosage de l'activité de la nitrate réductase in vivo

2.3. Résultats et Discussion

2.3.1. La biomasse fraîche aérienne

2.3.2. Dosage de la chlorophylle

2.3.3. L'activité de la nitrate réductase in vivo

2.4. Conclusion

2.1. Introduction

Les légumineuses alimentaires constituent une très grande importante source de protéines végétales qui peut corriger le déficit en protéines animales. En plus, elles sont riches en minéraux essentiels et en lysine, de ce fait, elles sont complémentaires des profils nutritionnels des céréales (Duranti et Gius, 1997). En outre, elles ont un usage médicinal non négligeable.

En plus de leur importance dans le régime alimentaire humaine et animale, elles ont un intérêt particulier dans le concept de l'agriculture durable. Leur introduction dans l'assolement instaure la rotation des cultures, la diversification des productions et la protection du sol contre l'érosion. L'introduction de ces espèces dans un système de culture est, impérativement, tributaire de l'amélioration de leurs performances agronomiques (Ben Mbarek, 2011).

La moitié des superficies occupées par la culture des légumineuses alimentaires dans le monde est le continent asiatique, avec une superficie de 49%. Alors que le quart des superficies cultivées se localise en Afrique, mais la production est jugée faible avec 21,68%, suivie par le continent américain avec 18.97%. (FAO, Stat, 2013).

Les légumineuses alimentaires en Algérie ont toujours occupé, sur le plan de la superficie, le troisième rang après les céréales et les fourrages. Leur superficie soit de l'ordre de 90 mille ha représentant 0,21 % de la superficie agricole totale en 2014. Les espèces les plus cultivées sont dans l'ordre : la fève, la fêverole, le pois chiche, le pois sec, les lentilles et le haricot sec (MADR, 2014)

L'objectif de cette 2^{ème} partie est d'évaluer le comportement écophysiological des trois espèces de la famille des fabacées ; *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., et *Lens culinaris* M. face au stress salin et à la présence du molybdène et de l'azote. Pour provoquer le stress salin, nous avons ajouté le chlorure de sodium (NaCl) à l'eau d'irrigation. Nous avons choisi 3 concentrations ; 3, 6 et 9g/l, et pour le molybdène nous avons pris la concentration de 2ppm qui est une concentration optimale (Bouزيد et Rahmoune, 2012). En ce qui concerne l'azote, il a été ajouté à une concentration de 0,2g/l. (Anonyme 6)

Pour réaliser cet objectif nous avons étudié certains paramètres ; la biomasse fraîche aérienne, le taux de la chlorophylle et l'activité in vivo de la nitrate réductase qui est une enzyme à molybdène cofacteur (Moco) qui catalyse la réduction du nitrate en nitrite (Eckardt, 2005).

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Préparation des plantes

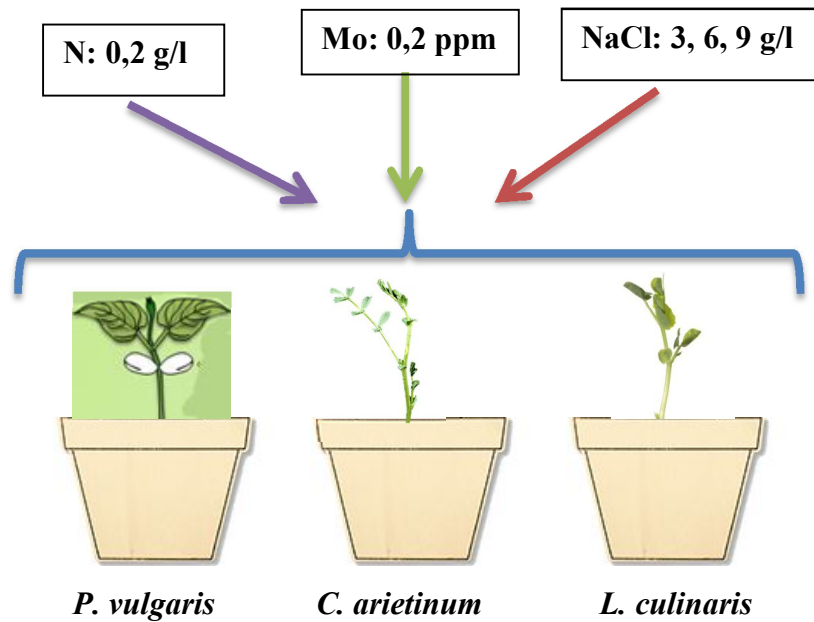
Les graines utilisées appartiennent aux espèces suivantes: *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., and *Lens culinaris* M., ont été récupérées auprès du CCLS (coopérative des céréales et des légumes secs, El Khroub). Elles ont été semées sous une serre dans des pots en plastiques de 35 cm de hauteur et 20 cm de diamètre, irrigués en raison de 250 ml pour maintenir les pots à leur capacité au champ. Une température moyenne de 23°C et une photopériode jour/nuit de 14h/10h.

A partir de 2 semaines de leur semis, les plantules sont soumises aux différents traitements pendant un mois, puis on procède aux différentes analyses des paramètres. Les concentrations de NaCl sont (S0:0 g/l, S1:3 g/l, S2:6 g/l, S3:9 g/l), le molybdène (M+: 0,2 ppm, M-: 0 ppm) ajouté sous forme de molybdate d'ammonium (NH₄)₆Mo₇O₂₄ et l'azote sous forme de nitrate potassium (KNO₃) (N+: 0,02 g/l, N-: 0 g/l).

La texture du sol limono-argileuse et la granulométrie : sable grossiers (diamètre entre 0.2 et 2 mm) :12.8%, sables fins (20 microns et 0.2 mm) : 8.4%, limons grossiers (2 et 20 microns) : 19.1%, limons fins (20 et 50 microns) : 22.9%, argiles (inférieur à 2 microns) : 36.8%, Matière organique : 1.67%, le pH analysé varie de 7.74 et 7.54 avec une moyenne de 7.64, et avec une conductivité électrique de 166µs/cm.

Dispositif expérimental : Le plan de l'expérimentation pour chaque espèce est le suivant (3 répétitions pour chaque pot) :

M-N-S0 Eau d'irrigation sans aucun traitement	M-N+S0 Mo:0 ppm, N:0,2g/l, NaCl:0g/l	M+N-S0 Mo:0,2ppm,N:0 g/l, NaCl:0g/l	M+N+S0 Mo:0,2 ppm, N:0,2g/l, NaCl:0g/l
M-N-S3 Mo:0 ppm, N:0g/l, NaCl:3g/l	M-N+S3 Mo:0ppm, N:0,2g/l, NaCl:3g/l	M+N-S3 Mo:0,2 ppm, N:0g/l, NaCl:3g/l	M+N+S3 Mo:0,2 ppm, N:0,2g/l, NaCl:3g/l
M-N-S6 Mo:0 ppm, N:0g/l, NaCl:6g/l	M-N+S6 Mo:0 ppm, N:0,2g/l, NaCl:6g/l	M+N-S6 Mo:0,2 ppm, N:0g/l, NaCl:6g/l	M+N+S6 Mo:0,2 ppm, N:0,2g/l, NaCl:6g/l
M-N-S9 Mo:0 ppm, N:0g/l, NaCl:9g/l	M-N+S9 Mo:0 ppm, N:0,2g/l, NaCl:9g/l	M+N-S9 Mo:0,2 ppm, N:0g/l, NaCl:9g/l	M+N+S9 Mo:0,2 ppm, N:0,2g/l, NaCl:9g/l



2.2.2. La biomasse fraîche aérienne

Le poids de la partie aérienne fraîche après avoir été lavée et essuyée est réalisée par une balance.

2.2.3. Dosage de la chlorophylle

L'extraction de la chlorophylle a et b est réalisée selon la méthode de McKinney, (1941), qui consiste en une macération des feuilles (0.1g) dans 10 ml d'un mélange de l'acétone et de l'éthanol (75 % et 25%) de volume et de (80% et 40%) de concentration ; les feuilles sont coupées en petits morceaux et mises dans des boites noires (pour éviter l'oxydations de la chlorophylle par la lumière), 48h plutard, on procède à la lecture des densités optiques des solutions avec un spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes : (645 et 663 nm).

La détermination des teneurs réalisée selon les formules

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/g MF}) = 12,7 \times \text{DO}_{(663)} - 2,59 \times \text{DO}_{(645)} \times V / (1000 \times W) .$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/g MF}) = 22,9 \times \text{DO}_{(645)} - 4,68 \times \text{DO}_{(663)} \times V / (1000 \times W) .$$

$$\text{Chl(a+b)} (\mu\text{g/g MF}) = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

$$\text{Chl a/b} = \text{Chl a} / \text{Chl b}$$

V : volume solution extraite et W le poids de matière fraîche de l'échantillon

2.2.4. L'activité de la Nitrate réductase in vivo

L'estimation de l'activité in vivo de la nitrate reductase est réalisée selon la méthode modifiée de Ferrari and Varner (1981) et Jaworski (1971) in Naman *et al.*, (1997), l'unité est $\mu\text{mol/h/g}$. cette méthode a pour but de doser les nitrites présents dans les feuilles (d'après une courbe étalon réalisée avec des concentrations connues de NO_2^-) après pénétration dans les tissus foliaires de nitrates d'un milieu d'incubation et l'efflux total des nitrites produits par ces tissus.

Des disques de 8 -10 mm de diamètre sont découpés à l'emporte-pièce dans les limbes des feuilles de nos plantes. Ces disques, au nombre de 90, sont pesés avec précision puis placé dans une fiole à vide de 25 ml renfermant 5 ml de milieu d'incubation de composition suivante : nitrate de potassium (KNO_3)150 mM dans propanol-1 3% (v/v) tampon phosphate 100 mM, pH 7,5.

Le passage du nitrate du milieu d'incubation dans les tissus foliaires et l'efflux de nitrite produit par ces tissus sont assurés par la combinaison d'une infiltration sous vide et d'un traitement chimique au propanol-1.

Ces conditions expérimentales conduisent à un efflux total du nitrite, la perméabilité membranaire au mouvement du nitrate et du nitrite étant accrue. L'infiltration est réalisée en utilisant une trompe à vide branchée sur le tube latéral de la fiole à vide. Elle est réalisée 3 fois 30 secondes pour chaque échantillon.

Après la dernière infiltration, les disques foliaires reposent sur le fond de l'erlenmeyer. Une incubation de 30 minutes, au bain-marie 30°C, à l'obscurité, est réalisée, puis aussitôt après l'incubation, la réaction enzymatique est bloquée par addition de 5 ml d'eau bouillante. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2 minutes sur une plaque chauffante

Après refroidissement, une fraction aliquote de 2 ml sera prélevée de chaque fiole à vide dans des tubes à hémolyse, puis ajouter dans l'ordre et avec une pipette automatique 1 ml de GRIESS I et 1ml de GRIESS II. Chaque tube est ensuite bouché avec du "parafilm" puis agité par renversement. Attendre 15 minutes, à température ambiante, l'apparition de la coloration rosée due à la formation d'un complexe azoïque. Un tube témoin, sans NO₂⁻, est préparé de la même façon, mais en remplaçant la solution à doser par 2 ml du mélange propanol-1 3% (v/v) - tampon phosphate.

La coloration ne reste stable qu'entre 15 et 30 minutes d'où l'importance de respecter les 15 minutes de révélation.

Les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à 520 nm, en utilisant des cuves dont le trajet optique est de 1 cm et en réglant le zéro de l'appareil sur la solution témoin (propanol-tampon phosphate).

2.2.5. L'analyse statistique

Les données obtenues sont soumises à une analyse de la variance à un, deux et trois facteurs fixes de classification; les moyennes sont comparées selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1999), basée sur la plus petite valeur significative, réalisée par le logiciel Minitab version 13.31.

On considère que les résultats sont significatifs quand $P \leq 0,05$. Les tableaux des groupements des moyennes sont réalisés par le logiciel Excelstat 2014, se (erreur standard)

2.3. Résultats et Discussion

Plusieurs processus biochimiques sont affectés par la salinité, en particulier l'assimilation de l'azote. Le nitrate est la source la plus importante d'azote pour les plantes et réduit fréquemment leur croissance (Meloni *et al.*, 2004) , l'importante molybdoenzyme, la nitrate reductase catalyse l'étape initiale de la réduction assimilative du nitrate (Zimmer and Mendel, 1999).

Parmi les éléments nutritifs fournis aux plantes, l'azote est l'élément majeur et essentiel pour une croissance et un rendement meilleurs. Il est considéré comme l'élément nutritif le plus important pour activer le métabolisme, la transformation de l'énergie pour la chlorophylle, la synthèse de protéine et peut constituer 40-50% du protoplasme de la cellule végétale. (Kanez *et al.*, 2013)

2.3.1. La biomasse fraîche aérienne

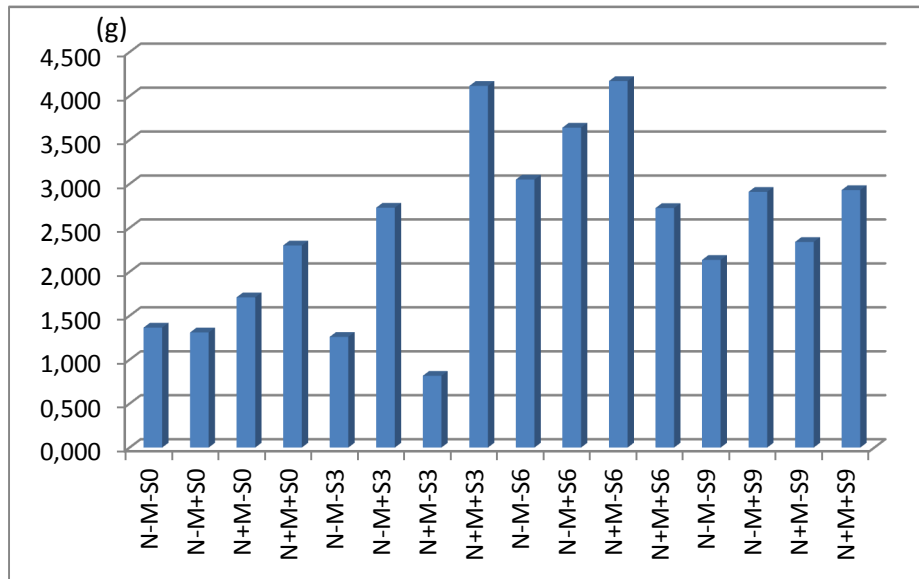


Figure 07 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de *Phaseolus vulgaris L.* soumises aux différents traitements

Pour les plantes de haricot, les résultats montrent une différence significative entre les valeurs de la biomasse fraîche aérienne, les plus élevées sont 4.170 g et 4.115 g, supérieures 3 fois plus que pour les plantes témoins (N-M-S0), ces plantes ont été soumises à ces traitements N+M-S6 et N+M+S3 respectivement et qui représentent le même groupe statistique (a), et qui ont été irriguées par une eau contenant de l'azote, 3 g/l et 6 g/l de NaCl. (fig.07)

Une étude sur le pois chiche montre que le rendement augmente de 27% si on imprègne les graines de molybdène par rapport à son application dans le sol. (Farooq et *al.*, 2012)

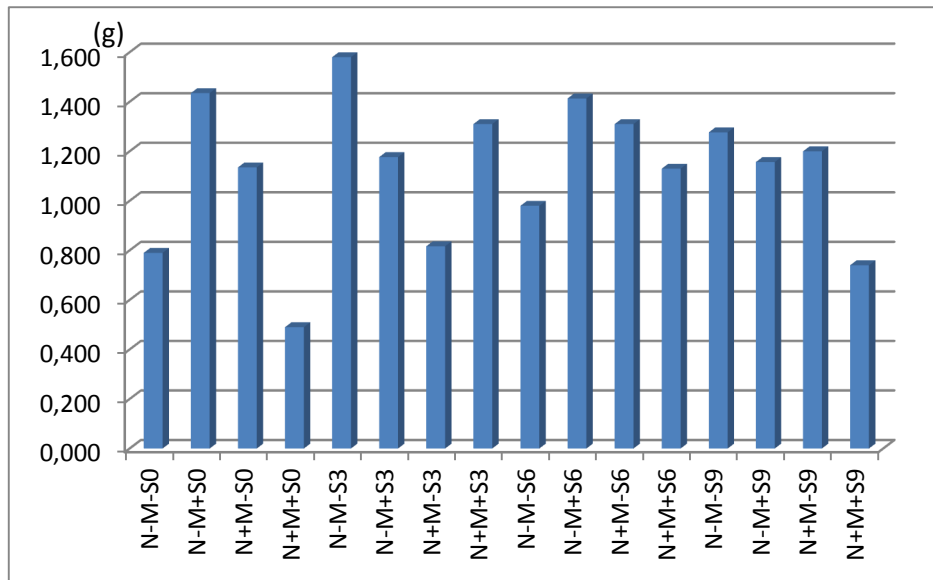


Figure 08 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de *Cicer arietinum L.* soumises aux différents traitements

Les résultats statistiques de l'anova pour le pois chiche ont montré que la différence entre les valeurs de la biomasse est non significative mais comme même on peut remarquer (fig.08) qu'en condition de stress de 3g/l on enregistre la valeur la plus importante (tableau 05).

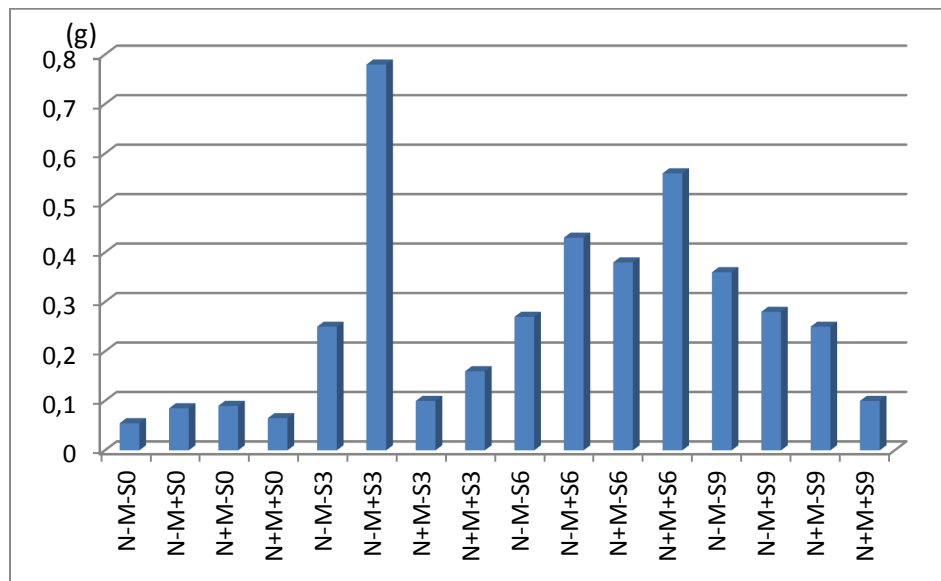


Figure 09 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de *Lens culinaris M.* soumises aux différents traitements

La valeur la plus importante de biomasse fraîche aérienne pour la lentille est 0.78 g correspondent aux traitements N-M+S3; avec l'ajout du molybdène, cette valeur est 10 fois plus élevée que les plantes témoins qui représentent la valeur la plus basse. (fig.09)

Puisque ces trois espèces ont une valeur de biomasse plus importante en présence de sel de chlorure de sodium dans l'eau d'irrigation, cela nous pousse à présumer que ces légumineuses ne sont pas très sensibles au stress salin mais elles se comportent différemment ; pour le haricot, c'était la combinaison entre le molybdène et l'azote qui a donné d'importantes valeurs de biomasse, mais pour la lentille ajoutant seulement le molybdène améliore le poids frais.

Chez les cultivars tolérants à la salinité, l'augmentation de la fertilisation en azote est un outil efficace pour restaurer la croissance réduite par la salinité élevée (Bybordi, 2010).

Pour la biomasse du haricot, ajoutant l'azote seul n'a aucun effet significatif, mais il semble que la combinaison de l'azote et le molybdène a l'effet plus positif et peut corriger les dégâts causés par une eau d'irrigation modérément saline. Les stress abiotiques sont responsables de la perte de rendement évaluées à 50 % pour la plupart des récoltes (Vincent, 2006).

Ces stress provoquent des changements au niveau morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire qui affecte négativement la croissance des plantes et la productivité (Ben Naceur *et al.*, 1998), mais l'application d'engrais azotés aux plantules en conditions de salinité de sol peut augmenter leur tolérance (Cordovilla *et al.*, 1994; Van Hoorn *et al.*, 2000).

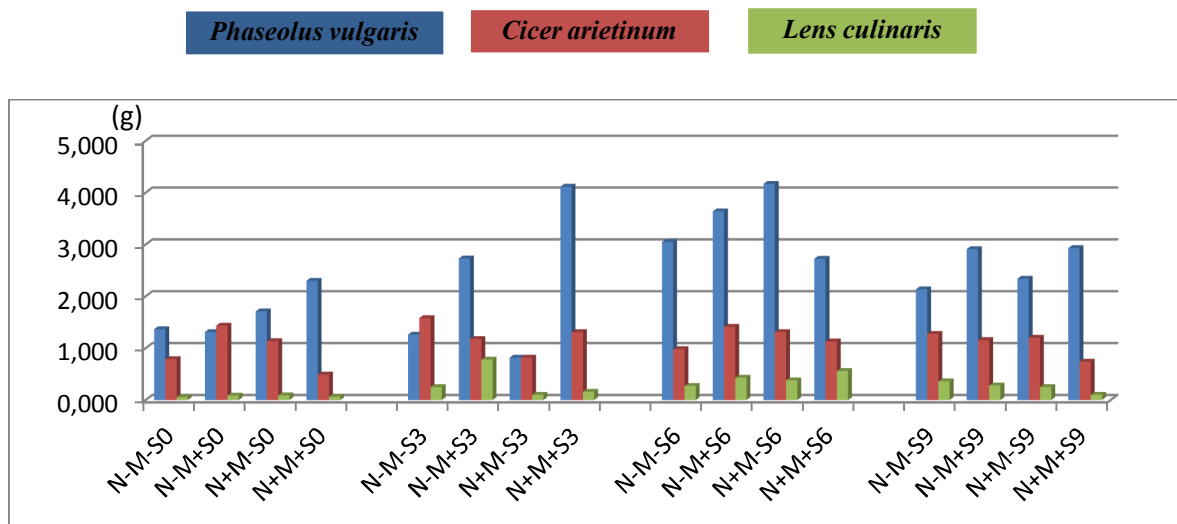


Figure 10 : La biomasse fraîche aérienne des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris* soumises aux différents traitements

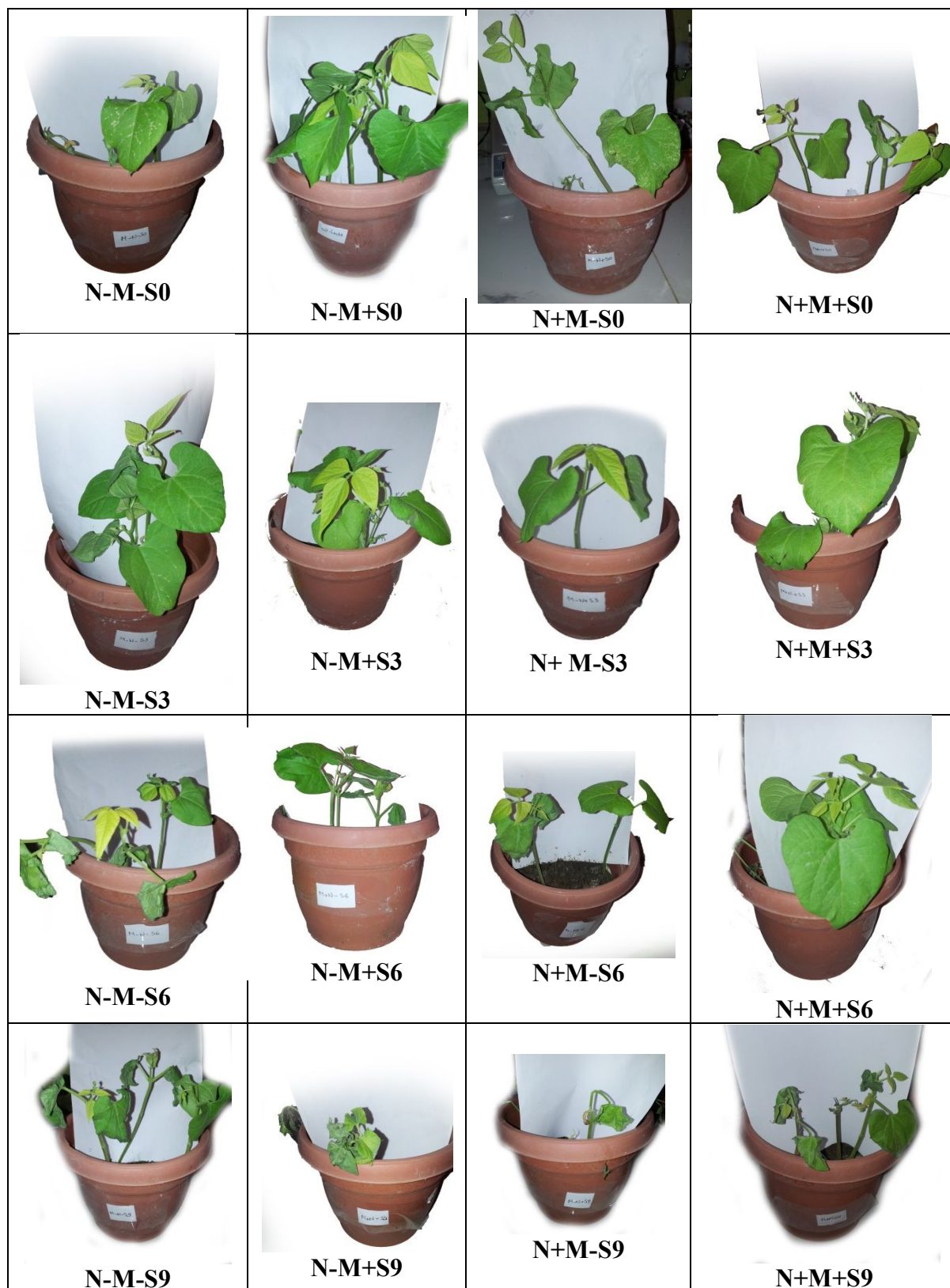


Figure 11: Les plantes de haricots *Phaseolus vulgaris* cultivées dans les différents traitements

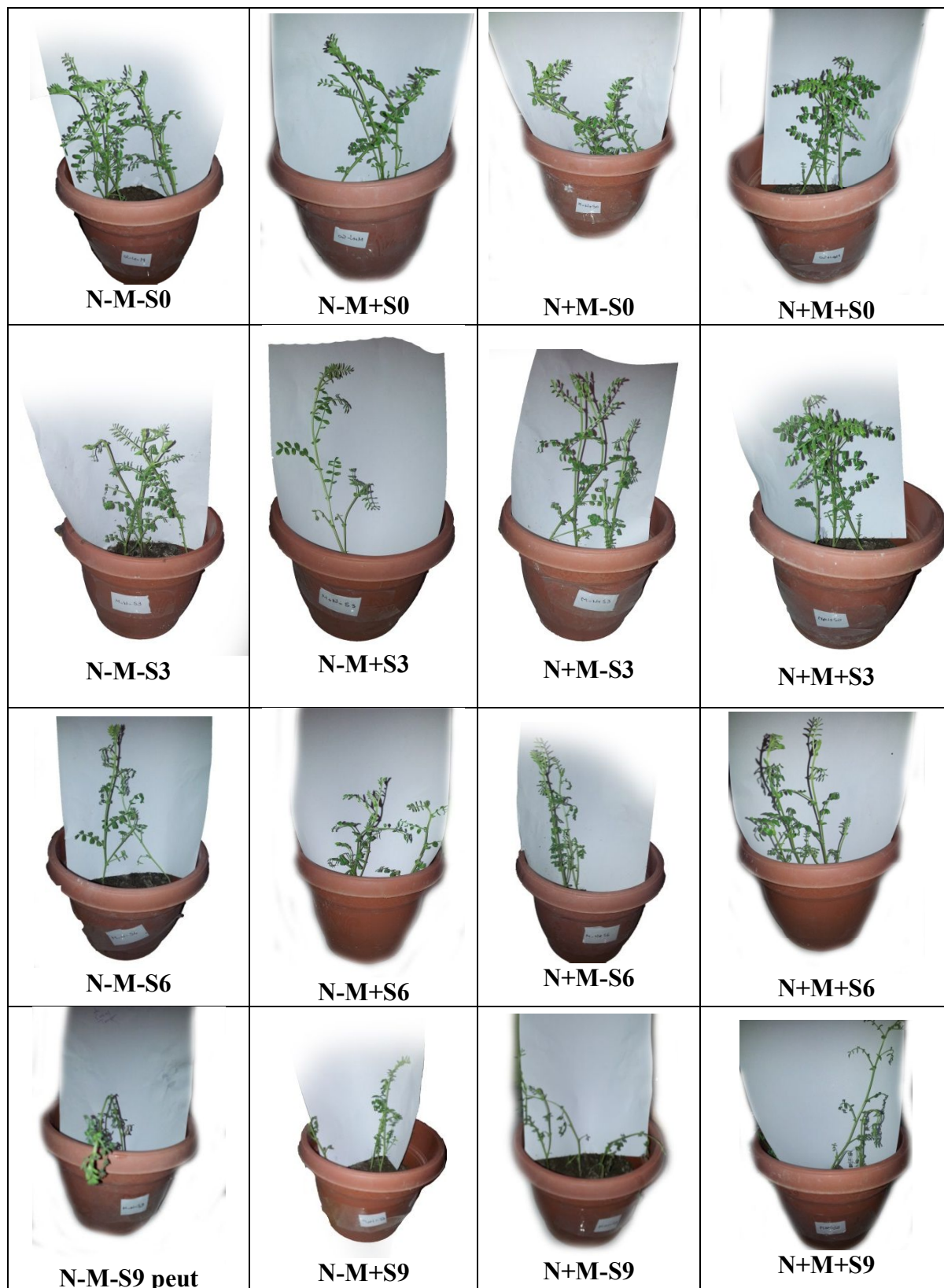


Figure 12 : Les plantes de pois chiche *Cicer arietinum* cultivées dans les différents traitements

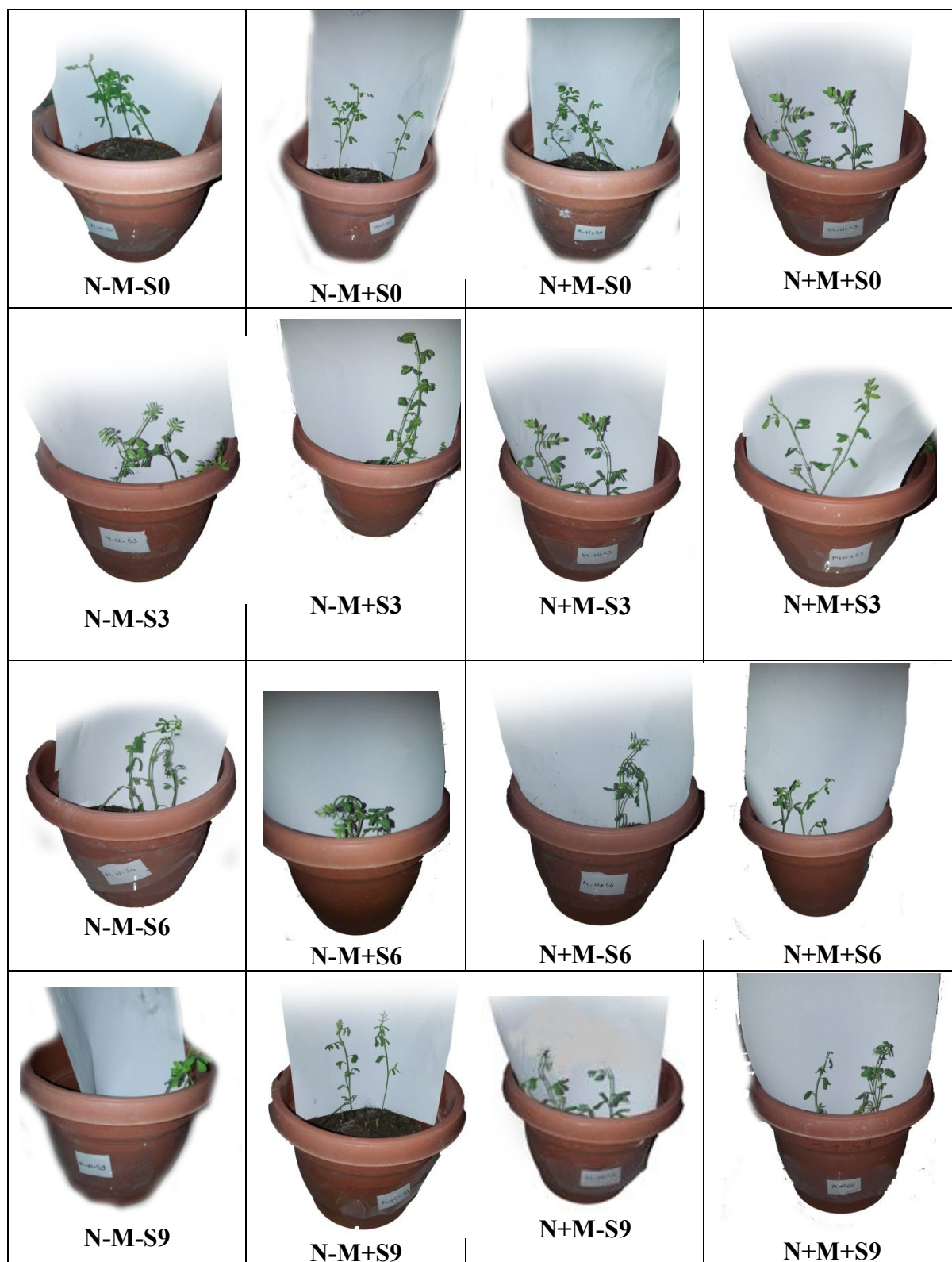


Figure 13 : Les plantes de la lentille *Lens culinaris* cultivées dans les différents traitements

Sidari *et al.*, (2007) ont rapporté que quatre génotypes de lentille (*lens culinaris* M.) ont été traités avec le stress salin (0, 50, 100, 150 ou 200 mM NaCl), la concentration accrue de NaCl avait réduit le pourcentage de germination, les paramètres de croissance et la teneur relative en eau.

Les légumineuses particulièrement la lentille, sont sensibles au stress salin, les fermiers n'envisagent pas de les cultiver dans un environnement salin, quoiqu'il y a une différence considérable à la tolérance au sel entre les accessions (Ahmed, 2009), mais pour notre lentille nous avons observé qu'elle peut garder un niveau plus élevée de biomasse fraîche à 3 g/l de chlorure de sodium, mais en présence de molybdène.

Tableau 05: La biomasse fraîche aérienne (BFA) de *Phaseolus vulgaris* (P.v), *Cicer arietinum* (C.a) et *Lens culinaris* (L.c)

BFA (g)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lens culinaris</i>
N-M-S0	1.365 ± 0.02 gh	0.79 ± 0.05 de	0.055 ± 0.04 j
N-M-S3	1.26 ± 0.03 gh	1.58 ± 0.15 a	0.25 ± 0.07 f
N-M-S6	3.05 ± 0.01 bc	0.98 ± 0.07 bcde	0.27 ± 0.06 ef
N-M-S9	2.135 ± 0.19 ef	1.277 ± 0.22 abcd	0.36 ± 0.04 d
N-M+S0	1.31 ± 0.31 gh	1.435 ± 0.08 ab	0.085 ± 0.01 hi
N-M+S3	2.73 ± 0.51 cde	1.177 ± 0.24 abcd	0.78 ± 0.08 a
N-M+S6	3.64 ± 0.16 ab	1.413 ± 0.02 abc	0.43 ± 0.04 c
N-M+S9	2.91 ± 0.23 bcd	1.157 ± 0.07 abcd	0.28 ± 0.04 e
N+M-S0	1.71 ± 0.34 fg	1.135 ± 0.035 abcd	0.09 ± 0.01 hi
N+M-S3	0.817 ± 0.06 h	0.817 ± 0.03 cde	0.11 ± 0.02 h
N+M-S6	4.17 ± 0.32 a	1.31 ± 0.04 abcd	0.38 ± 0.02 d
N+M-S9	2.34 ± 0.21 cdef	1.2 ± 0.07 abcd	0.25 ± 0.03 f
N+M+S0	2.3 ± 0.45 def	0.49 ± 0.88 e	0.065 ± 0.02 ij
N+M+S3	4.115 ± 0.45 a	1.31 ± 0.07 abvd	0.16 ± 0.01 g
N+M+S6	2.725 ± 0.75 cde	1.13 ± 0.12 abcd	0.56 ± 0.06 b
N+M+S9	2.93 ± 0.96 bcd	0.74 ± 0.07 de	0.1 ± 0.02 h

2.3.2. Le taux de la chlorophylle (a+b)

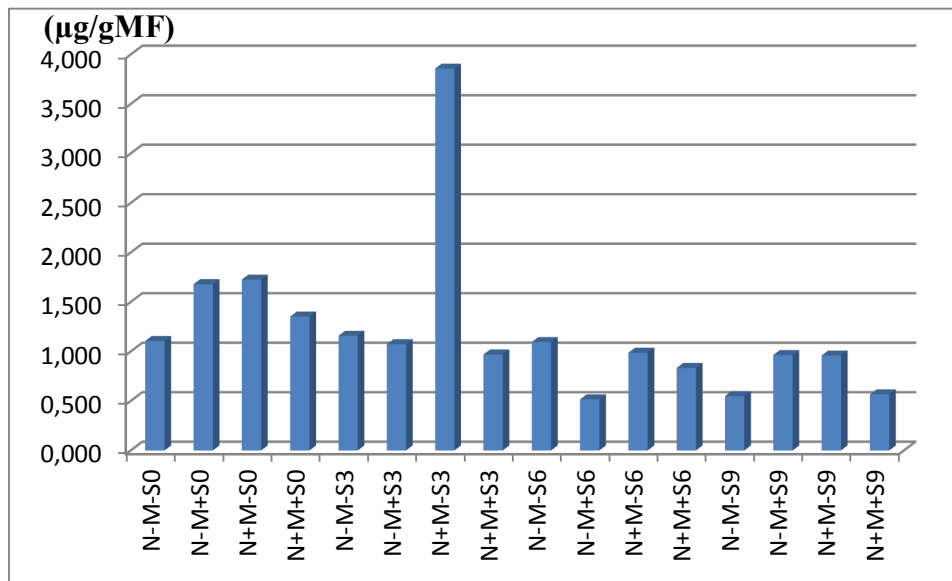


Figure 14 : La chlorophylle des plantes de *Phaseolus vulgaris L.* soumises aux différents traitements

On observe que le chlorure de sodium et le molybdène stimulent le taux de la chlorophylle chez les trois espèces, pour le haricot, la valeur la plus importante est 3,857 µg/g MF (Tableau 06) enregistrée pour les plantes soumises aux traitements N+M-S3, cette valeur est 3 fois plus élevée que pour les plantes témoins (1.106 µg/g MF), nous notons que ces plantes ont été cultivés sur un sol modérément salin en présence de l'azote.

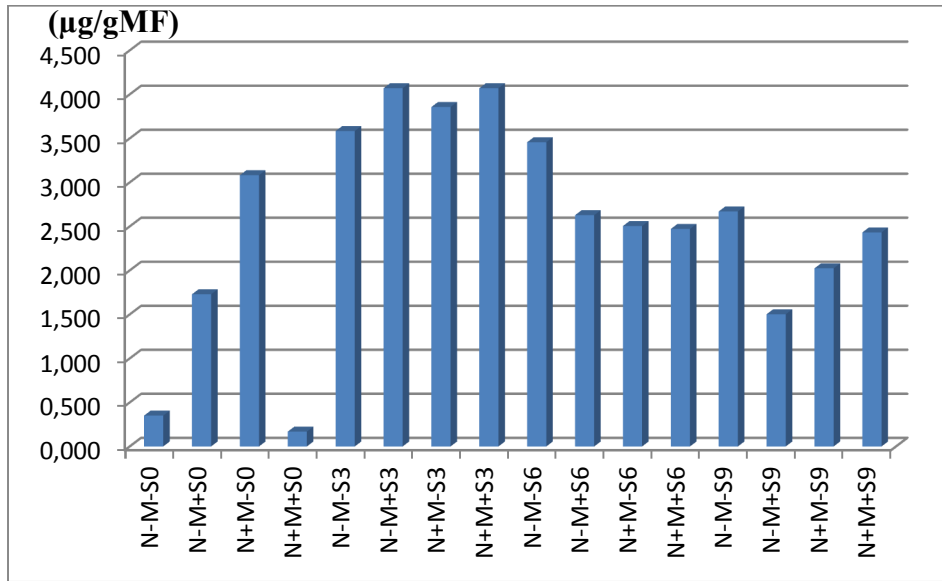


Figure 15 : La chlorophylle des plantes de *Cicer arietinum L* soumises aux différents traitements

Pour les plantes de pois chiche, la valeur élevée est 4.070 et 4.080 µg/g MF (10 fois supérieure à la valeur de 0.351 µg/g MF qui représente les plantes témoins) observée chez les individus cultivés sur le sol contenant 3g/l et en présence du molybdène. (fig.15)

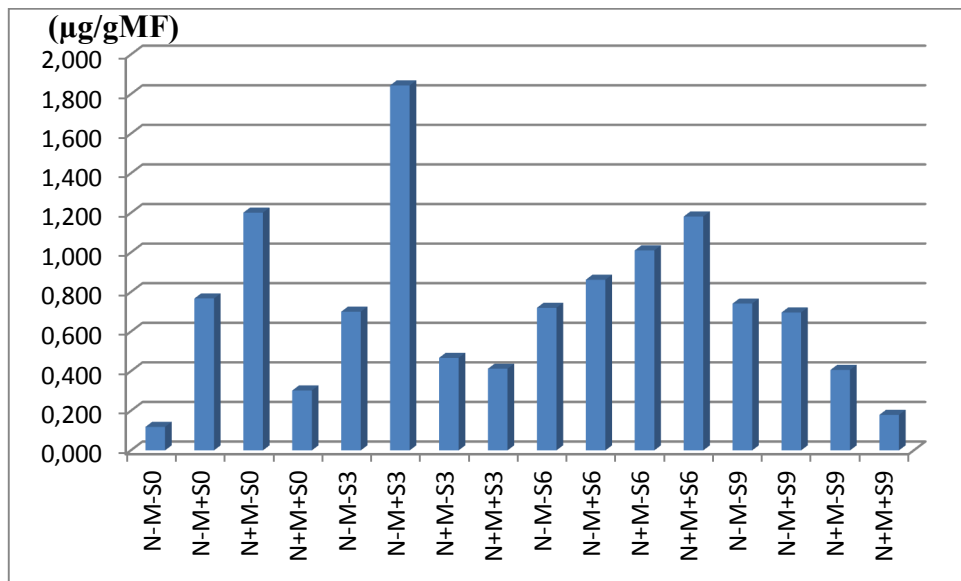


Figure 16 : La chlorophylle des plantes de *Lens culinaris M.* soumises aux différents traitements

On enregistre chez les plantes de lentille la valeur la plus élevée du taux de la chlorophylle de 1.844 µg/g MF (plus de 10 fois par rapport aux plantes témoins), (fig.16). Ces individus se sont développés dans des conditions de stress salin modéré (3g/l) et en présence du molybdène.

Les légumineuses spécialement la lentille, sont sensible au sel, l'apport de NaCl dans leur milieu, diminue le taux de chlorophylle totale et la croissance des plantules de *Lens culinaris* (Haq et al., 2012), mais dans notre étude, le fait d'ajouter le molybdène, même en stress salin le taux de la chlorophylle de la lentille augmente.

Une étude montre que l'application du molybdène dans les concentrations suivantes (1.5 à 10ppm) provoque une meilleure germination des graines, augmente la croissance, la biomasse fraîche et sèche ainsi que le taux de sucre soluble et la chlorophylle chez les plantule de *Cicer arietinum* (le pois chiche) (Datta et al., 2011)

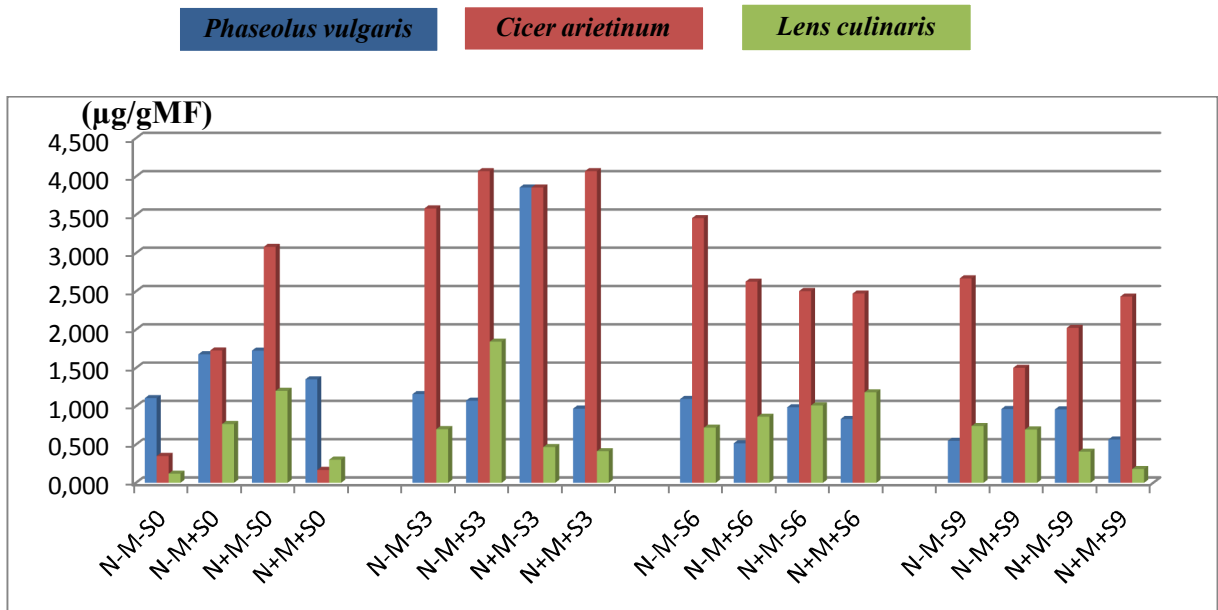


Figure 17 : Comparaison de la chlorophylle des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris* soumises aux différents traitements

La salinité est l'un des facteurs environnemental le plus important limitant la production et la fixation biologique de l'azote chez le pois chiche que l'on considère sensible au stress salin, dans des régions arides et semi-arides. Plusieurs études ont été effectuées sur des pois chiches (Zurayk *et al.*, 1998, Soussi *et al.*, 1998, Welfare *et al.*, 2002, Singla and Garg 2005 et Garg and Singla, 2009), mais dans ce travail le pois chiche semble tolérer le stress salin modéré (3g/l) en présence d'azote et le molybdène.

Dans un travail précédant réalisé sur la chlorose, il a été démontré qu'elle est due à l'incapacité des plantes pour former la chlorophylle à cause du manque de molybdène (Hristoskova *et al.*, 2006), donc le molybdène a un rôle dans la biosynthèse de la chlorophylle, parce que sous le déficit du molybdène, les intermédiaires de biosynthèse de la chlorophylle diminuent dans un cultivar de blé d'hiver (Yu *et al.*, 2006), donc ajouter le molybdène et l'azote dans un sol salin peuvent éviter l'effet négatif de stress salin sur la biosynthèse de la chlorophylle pour les plantes de pois chiche, de haricot et de la lentille.

Tableau 06: Le taux de la chlorophylle (a+b) (Chl) de *Phaseolus vulgaris* (P.v), *Cicer arietinum* (C.a) et *Lens culinaris* (L.c).

Chl ($\mu\text{g/gMF}$)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lens culinaris</i>
N-M-S0	1.106 \pm 0.021 f	0.351 \pm 0.004 m	0.119 \pm 0.003 l
N-M-S3	1.158 \pm 0.004 e	3.583 \pm 0.002 c	0.701 \pm 0.008 g
N-M-S6	1.095 \pm 0.001 f	3.457 \pm 0.069 d	0.721 \pm 0.001 Fg
N-M-S9	0.549 \pm 0.001 l	2.67 \pm 0.001 f	0.742 \pm 0.002 ef
N-M+S0	1.679 \pm 0.003 c	1.729 \pm 0.002 k	0.768 \pm 0.002 e
N-M+S3	1.073 \pm 0.002 g	4.08 \pm 0.004 a	1.844 \pm 0.003 a
N-M+S6	0.516 \pm 0.003 m	2.628 \pm 0.027 g	0.862 \pm 0.064 d
N-M+S9	0.964 \pm 0.001 i	1.502 \pm 0.001 l	0.697 \pm 0.004 g
N+M-S0	1.726 \pm 0.006 b	3.082 \pm 0.048 e	1.201 \pm 0.003 b
N+M-S3	3.857 \pm 0.006 a	3.857 \pm 0.006 b	0.468 \pm 0.005 h
N+M-S6	0.987 \pm 0.013 h	2.505 \pm 0.001 h	1.011 \pm 0.005 c
N+M-S9	0.959 \pm 0.011 i	2.024 \pm 0.005 j	0.407 \pm 0.001 i
N+M+S0	1.352 \pm 0.002 d	0.169 \pm 0.013 n	0.303 \pm 0.002 j
N+M+S3	0.969 \pm 0.004 i	4.07 \pm 0.004 a	0.413 \pm 0.001 i
N+M+S6	0.834 \pm 0.013 j	2.472 \pm 0.007 h	1.182 \pm 0.003 b
N+M+S9	0.566 \pm 0.003 k	2.432 \pm 0.001 i	0.18 \pm 0.002 k

2.3.3. Le ratio de la chlorophylle a/b

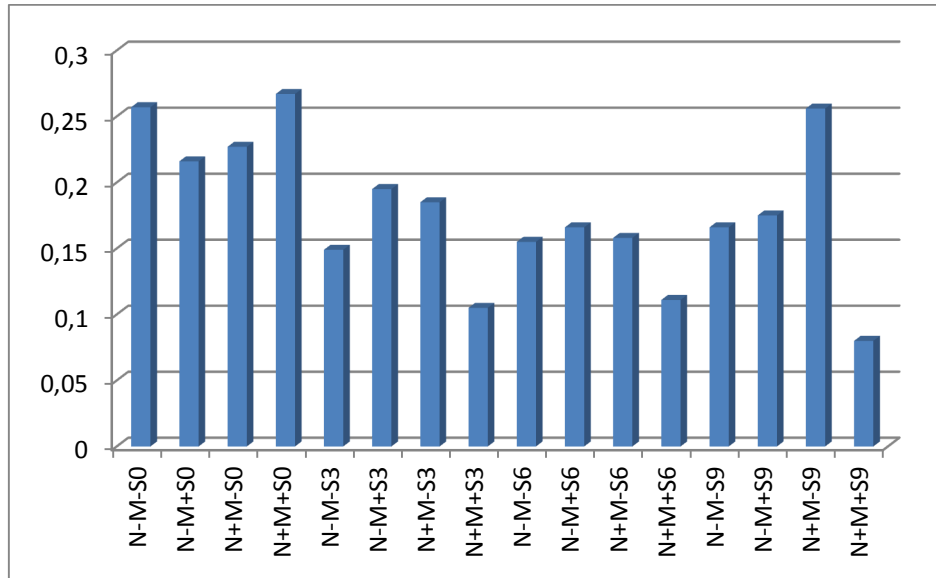


Figure 18 : Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de *P. vulgaris* soumises aux différents traitements

Pour le haricot l'étude statistique montre une différence très hautement significative entre les différentes valeurs du ratio cha/chb, cependant la valeur la plus élevée est observée chez 3 groupes d'individus (fig.18); les plantes témoins ainsi que les plantes qui ont reçu les traitements suivants : N+M-S9 et N+M+S0. La valeur la plus basse est observée chez les plantes qui ont reçu un stress important (N+M+S9). Toutes les autres valeurs varient entre 0,08 et 0,25.

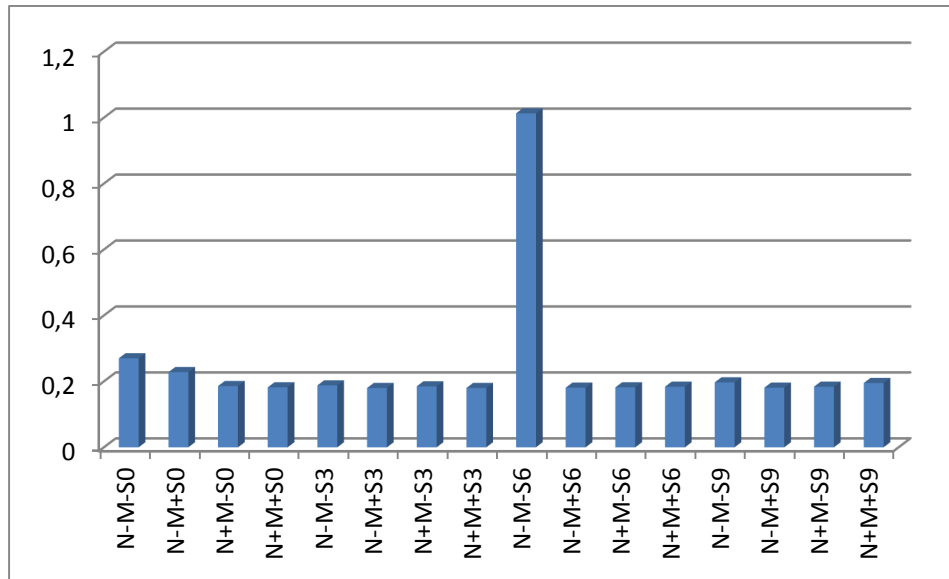


Figure 19 : Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de *C.arietinum* soumises aux différents traitements

Chez le pois chiche les résultats statistiques montrent une différence significative, la valeur la plus élevée est représentée par les individus développés sur un milieu qui contient 6g/l de NaCl seulement, et toutes les autres valeurs se rapprochent et appartiennent au même groupe statistique. (fig.19)

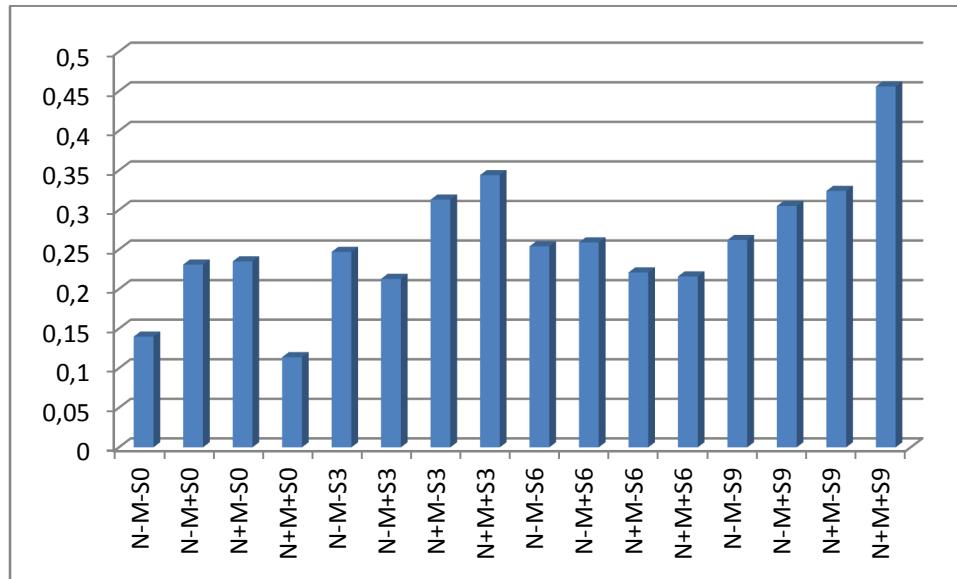


Figure 20 : Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de *L.culinaris* soumises aux différents traitements

La valeur la plus importante est 0,456 (fig.20), donnée par les individus qui ont été stressés (N+M+S9) alors la valeur la plus basse est 0,114 enregistrés chez les plantes non stressées mais en présence de l'azote et le molybdène (N+M+S0), (tableau07).

Il a été rapporté qu'une certaine concentration de NaCl dans la feuille cause la réduction de moitié de la photosynthèse sans affecter la concentration de la chlorophylle (Das et *al.*, 2015).

La tolérance des plantes cultivées aux stress abiotiques dépend de leur index de stabilité de la chlorophylle. La salinité n'a pas beaucoup d'effets sur le taux de la chlorophylle des cultivars tolérants parce qu'ils possèdent un index de stabilité de chlorophylle élevé (Mohan et *al.*, 2000; Sikuku et *al.*, 2010). Aussi le ratio de chlorophylle a et b des plantes diminue en raison du stress de sel (Senguttuvel et *al.*, 2014). Contrairement aux variétés sensibles à la salinité, les variétés tolérantes maintiennent leur ratio de la chlorophylle a/b dans des conditions de stress salin (Das et *al.*, 2015) ceci est aussi observé chez nos 3 espèces qui maintiennent un ration cha/b assez élevé en condition de stress salin, donc cela est un signe de tolérance.

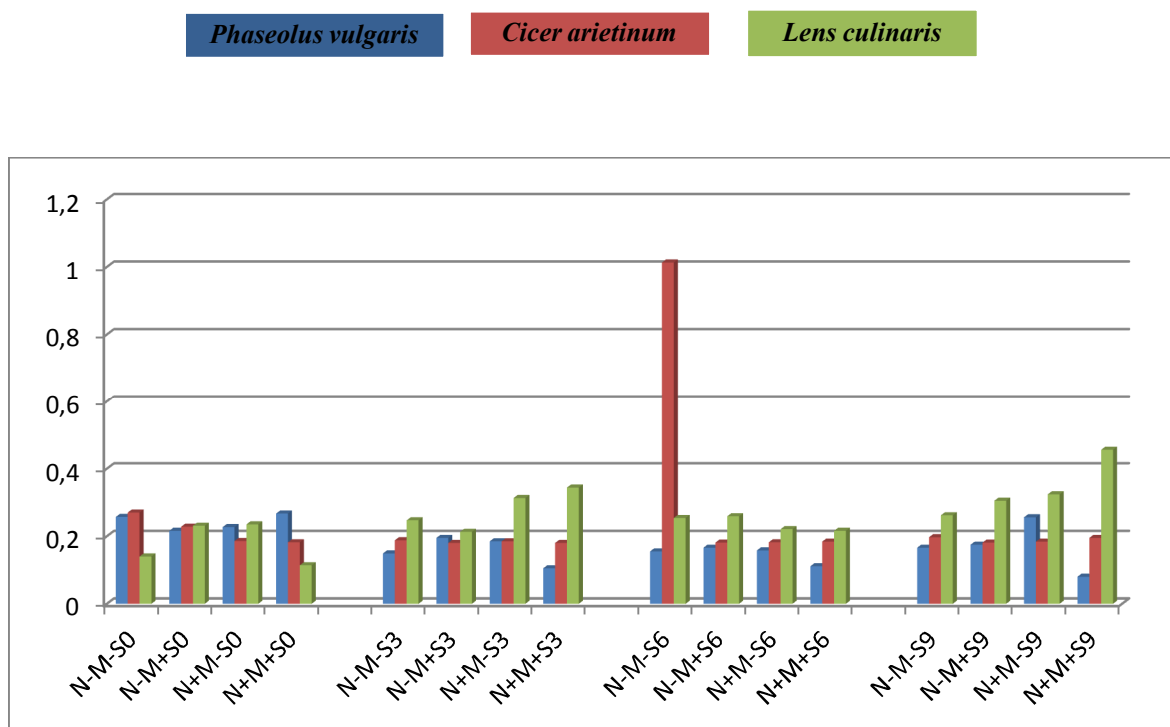


Figure 21 : Comparaison du ratio de la chlorophylle a/b des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris* soumises aux différents traitements

**Tableau 07: Le ratio de la chlorophylle a/b des plantes de *Phaseolus vulgaris* (P.v),
Cicer arietinum (C.a) et *Lens culinaris* (L.c).**

cha/chlb	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lens culinaris</i>
N-M-S0	0,257 ± 0.002 a	0,27 ± 0.004 b	0,14 ± 0.001 g
N-M+S0	0,216 ± 0.003 b	0,228 ± 0.017 bc	0,231 ± 0.008 ef
N+M-S0	0,227 ± 0.001 b	0,186 ± 0.001 c	0,235 ± 0.013 ef
N+M+S0	0,267 ± 0.004 a	0,182 ± 0.008 c	0,114 ± 0.032 h
N-M-S3	0,149 ± 0.003 g	0,188 ± 0.006 c	0,247 ± 0.011 de
N-M+S3	0,195 ± 0.005 c	0,18 ± 0.02 c	0,213 ± 0.017 f
N+M-S3	0,185 ± 0.005 cd	0,185 ± 0.03 c	0,313 ± 0.012 c
N+M+S3	0,105 ± 0.001 h	0,18 ± 0.02 c	0,344 ± 0.011 b
N-M-S6	0,155 ± 0.002 fg	1,013 ± 0.01 a	0,254 ± 0.023 de
N-M+S6	0,166 ± 0.001 efg	0,181 ± 0.07 c	0,259 ± 0.012 d
N+M-S6	0,158 ± 0.003 fg	0,182 ± 0.01 c	0,221 ± 0.032 f
N+M+S6	0,111 ± 0.002 h	0,184 ± 0.07 c	0,216 ± 0.03 f
N-M-S9	0,166 ± 0.004 ef	0,197 ± 0.12 c	0,262 ± 0.05 d
N-M+S9	0,175 ± 0.003 de	0,181 ± 0.006 c	0,305 ± 0.045 c
N+M-S9	0,256 ± 0.005 a	0,184 ± 0.005 c	0,324 ± 0.017 bc
N+M+S9	0,08 ± 0.005 i	0,195 ± 0.011 c	0,456 ± 0.12 a

2.3.4. L'activité de la nitrate reductase in vivo

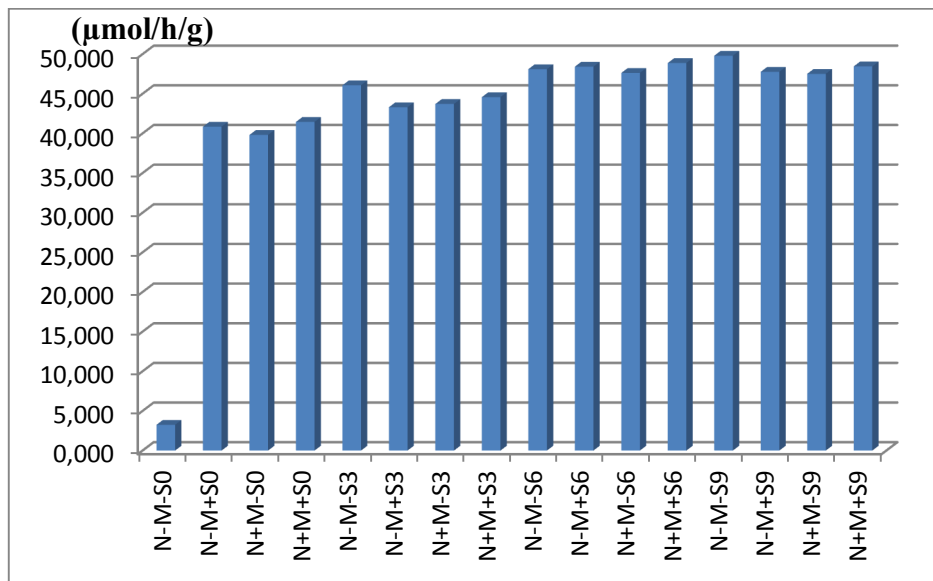


Figure 22 : L'activité de la nitrate réductase des plantes de *Phaseolus vulgaris* L. soumises aux différents traitements

Le tableau08 montre que l'activité de la nitrate réductase (ANR) augmente avec l'augmentation de la concentration du NaCl dans l'eau d'irrigation tant pour le pois chiche (fig.23) que le haricot avec 49.80μmol/h/g (N-M-S9) et 49.57μmol/h/g (N-M+S6) respectivement (fig.22), pour la lentille, la valeur la plus élevée de ANR est enregistré pour les plantes témoins avec 49.74 μmol/h/g. (fig.24)

Dans la littérature scientifique, les travaux et rapports concernant les effets de la salinité sur l'assimilation du nitrate et l'activité de la nitrate réductase sont contradictoire. Plusieurs études ont montré que la salinité diminue ANR (Aslam *et al.*, 1984; Martinez & Cerda, 1989; Gouia *et al.*,1994), tandis que d'autres ont montré des résultats opposés (Misra & Dwiverdi, 1990; Sagi *et al.*, 1997) ou n'ont pas observé d'effets significatifs sur ANR (Bourgeois- Chaillou *et al.*, 1992; Cramer & Lips, 1995).

Très probablement, les effets de salinité dépendent de beaucoup d'autres facteurs comme l'espèce de la plante, le niveau de NO_3^- , l'intensité du stress, le stade de développement de la plante, etc (Silveira *et al.*, 1999)

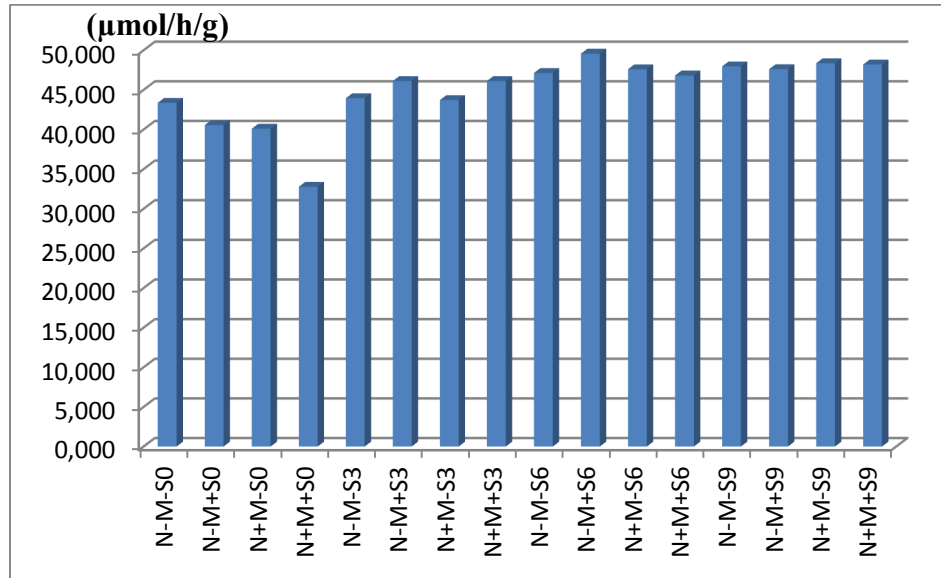


Figure 23 : L'activité de la nitrate réductase des plantes de *Cicer arietinum L.* soumises aux différents traitements

Pour nos plantes de haricot et de pois chiche, il semble que l'expression de l'activité de la nitrate réductase dans la partie aérienne est d'autant plus élevée que le stress salin est accentué (fig.25) ce qui correspond à un travail fait sur le cumin, le stress hydrique augmente l'activité de la nitrate réductase de la partie aérienne et racinaire (Sepehr *et al.*, 2012), mais pour la lentille c'est complètement l'opposé, la diminution de ANR est observé quand le stress salin augmente, plusieurs études ont rapporté que l'assimilation de nitrate et l'activité de la nitrate réductase de (ANR) diminuent dans des conditions de stress salin (Meloni *et al.*, 2004).

La tolérance à la sécheresse de *Sesbania aculeata* est associée à une plus petite réduction du nombre et de la masse des nodules de la racine, une activité de la nitrate réductase élevée dans les feuilles et les nodules, une importante accumulation de la proline dans les racines et les nodules et un taux élevé de glycine bêtaïne dans les nodules. (Ashraf et Iram, 2005).

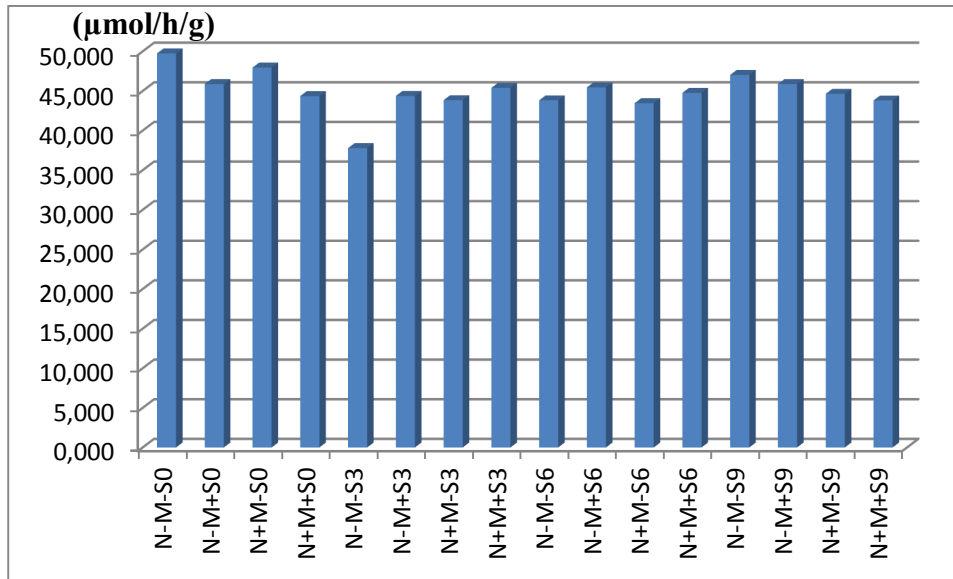


Figure 24 : L'activité de la nitrate réductase des plantes de *Lens culinaris M.* soumises aux différents traitements

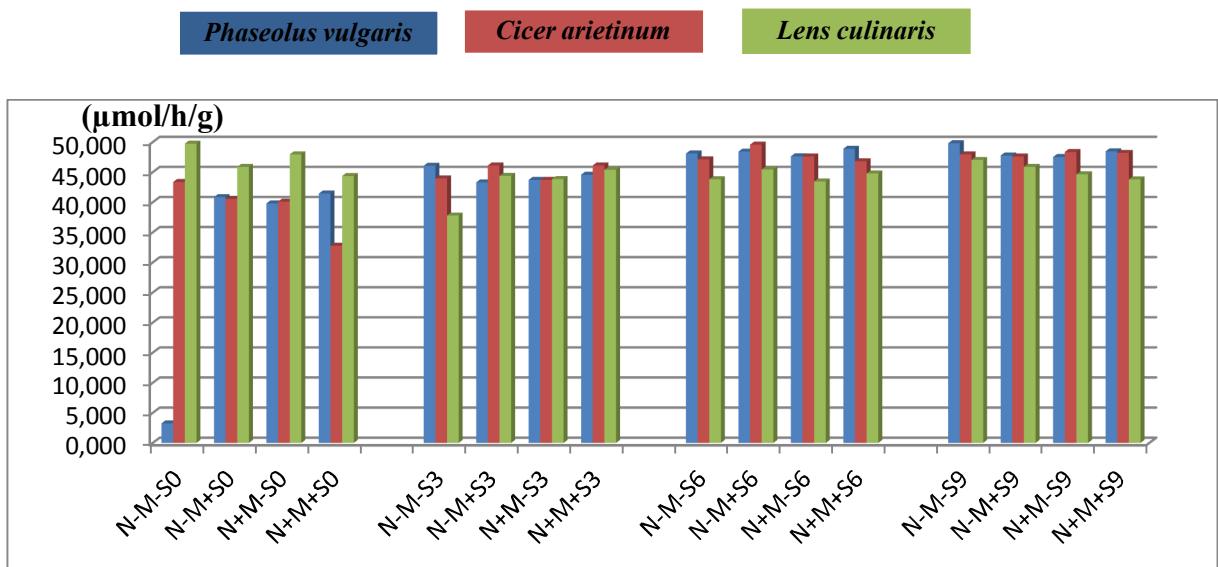


Figure 25: Comparaison de l'activité de la nitrate réductase des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris* soumises aux différents traitements

Tableau 08: L'activité de la Nitrate reductase (ANR) des plantes de *Phaseolus vulgaris* (P.v), *Cicer arietinum* (C.a) et *Lens culinaris* (L.c)

ANR($\mu\text{mol/h/g}$)	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lens culinaris</i>
N-M-S0	33.254 \pm 0.168 m	43.365 \pm 0.054 i	49.74 \pm 0.037 a
N-M-S3	46.07 \pm 0.153 f	43.946 \pm 0.169 h	37.79 \pm 0.053 h
N-M-S6	48.102 \pm 0.032 d	47.132 \pm 0.037 e	43.82 \pm 0.077 g
N-M-S9	49.801 \pm 0.025 a	47.953 \pm 0.032 c	47.03 \pm 0.496 c
N-M+S0	40.851 \pm 0.59 k	40.554 \pm 0.466 j	45.879 \pm 0.22 d
N-M+S3	43.301 \pm 0.239 i	46.119 \pm 0.086 g	44.37 \pm 0.086 f
N-M+S6	48.414 \pm 0.032 c	49.57 \pm 0.042 a	45.45 \pm 0.075 de
N-M+S9	47.769 \pm 0.037 e	47.613 \pm 0.032 d	45.88 \pm 0.077 d
N+M-S0	39.81 \pm 0.193 l	40.101 \pm 0.093 k	47.953 \pm 0.798 b
N+M-S3	43.712 \pm 0.085 h	43.712 \pm 0.085 h	43.84 \pm 0.074 g
N+M-S6	47.628 \pm 0.054 e	47.599 \pm 0.077 d	43.46 \pm 0.085 g
N+M-S9	47.514 \pm 0.077 e	48.357 \pm 0.032 b	44.64 \pm 0.013 f
N+M+S0	41.446 \pm 0.075 j	32.772 \pm 0.295 l	44.363 \pm 0.687 f
N+M+S3	44.576 \pm 0.068 g	46.119 \pm 0.086 g	45.39 \pm 0.065 e
N+M+S6	48.881 \pm 0.08 b	46.813 \pm 0.112 f	44.77 \pm 0.064 f
N+M+S9	48.449 \pm 0.074 c	48.201 \pm 0.044 bc	43.8 \pm 0.032 g

Le molybdène (Mo), un constituant de la nitrate réductase, est nécessaire pour l'assimilation du nitrates à partir du sol. (Bishop and Premakumar, 1992)

L'application de Mo chez la légumineuse (*Chamaecrista rotundifolia* cv. 'Wynn'), pourrait augmenter le nombre de chloroplastes et l'activité de la nitrate réductase dans la feuille (Weng *et al.*, 2009)

la salinité induite par 100 mM NaCl chez des plantes de *Vigna unguiculata* peut induire la diminution de l'activité de la nitrate réductase des feuilles (Silveira *et al.*, 1999), 600 mmol/l de NaCl a causé une réduction significative de la croissance de la racine et de la partie aérienne ainsi que de leurs activités de la nitrate réductase chez *Prosopis Alba* (Meloni *et al.*, 2004), l'application du molybdène a un effet positif sur la croissance du blé et augmente l'activité de la nitrate réductase. (Abd El-Samad *et al.*, 2005).

L'approvisionnement du molybdène chez *Salicornia* cultivée dans l'eau de mer améliore l'accumulation de la biomasse en augmentant l'activité de la nitrate réductase (Ventura *et al.*, 2010). L'application de KNO_3 a augmenté significativement la surface de la feuille, son poids frais et sec et l'activité de la nitrate réductase (Jabeen et Ahmad, 2011).

Le pois chiche qui est connu pour être une espèce sensible au stress salin (Tejera *et al.*, 2006), cependant, dans ce travail, les plantes de pois chiche se comportent comme tolérantes quand elles sont cultivées dans un pots contenant 3g/l de NaCl.

Les résultats présentés dans les tableaux 05, 06, 07 et 08 indiquent que les plantes de haricot, de lentille et de pois chiche pourraient être tolérantes à un stress salin modéré (3g/l), mais se comportent différemment en présence de l'azote et du molybdène, cela correspond à un travail précédent qui a montré que les plantes de haricot peuvent maintenir un niveau optimum de paramètres morphologiques et de taux de chlorophylle, sous des conditions de stress salin modéré (de 3g/l) en présence de molybdène, (Bouزيد and Rahmoune, 2012).

2.4. Conclusion

Comme conclusion de ce 2^{ème} chapitre, on pourrait dire qu'en situation de stress salin causé par une eau d'irrigation modérément saline (3g/l), la combinaison du molybdène et de l'azote conduit à une augmentation de la biomasse fraîche aérienne et le taux de la chlorophylle (a+b) chez le haricot, le pois chiche et la lentille.

Le ratio chlorophylle a sur b et l'activité de la nitrate réductase possèdent des valeurs élevés chez les trois espèces qui se comportent différemment considérant la tolérance au stress salin.

CHAPITRE 3

L'effet du molybdène, de l'azote et du chlorure de sodium sur l'activité de quelques molybdoenzymes chez les trois légumineuses

3.1. Introduction

3.2. Matériels et méthodes

3.2.1. Préparation des plantes

3.2.2. L'activité de la xanthine déshydrogénase et de l'aldéhyde oxydase

3.2.3. L'activité de la sulfite oxydase

3.2.4. L'activité de la nitrate réductase

3.2.5. L'activité du molybdène cofacteur

3.2.6. L'analyse statistique

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Les protéines totales

3.3.2. L'activité de la xanthine déshydrogénase

3.3.3. L'activité de l'aldéhyde oxydase

3.3.4. L'activité de la sulfite oxydase

3.3.5. L'activité de la nitrate réductase

3.3.6. L'activité du molybdène cofacteur

3.4. Conclusion

3.1. Introduction

Chez les eucaryotes, les molybdoenzymes les plus importantes sont ; la sulfite oxydase, qui catalyse la dernière étape de la dégradation des acides aminés contenant du soufre et aussi impliquée dans la détoxification de l'excès de sulfite, la xanthine déshydrogénase, est impliquée dans le métabolisme de la purine et la production d'espèce réactives d'oxygène, l'aldéhyde oxydase, qui catalyse plusieurs aldéhydes et est essentielle dans la biosynthèse de l'acide abscissique et la nitrate réductase qui catalyse l'assimilation de l'azote inorganique. (Mendel et Bittner, 2006).

Les molybdoenzymes sont impliquées dans les processus d'adaptation au stress, donc, comprendre le mécanisme de leurs réponses aux conditions environnementales est d'une importance primordiale dans l'agriculture pour l'amélioration de la tolérance des plantes aux divers stress. (Zdunek-Zastocka et Lips, 2003)

L'objectif de cette partie est d'étudier les changements dans l'activité enzymatique de la xanthine déshydrogénase, l'aldéhyde oxydase, la sulfite oxydase et la nitrate réductase, chez trois espèces de légumineuses, sous l'effet d'un stress salin et la présence de molybdène et d'azote, ainsi qu'un essai de mettre au point un protocole pour mesurer l'activité du molybdène cofacteur.

3.2. Matériels et Méthodes

3.2.1. Préparation des plantes

Les graines de *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L. et *Lens culinaris* M. ont été semés dans des pots dans les mêmes conditions de développement citées dans le chapitre 2.

Après deux semaines, les plantules sont soumises aux différents traitements pendant 4 semaines : 6g/l de chlorure de sodium (NaCl), 0,2ppm de molybdène (Mo) sous forme de molybdate d'ammonium et 0,2g/l d'azote (N) sous forme de nitrate de potassium.

Les traitements correspondent à :

T1: témoin

T2: molybdène et azote ajoutés à l'eau d'irrigation

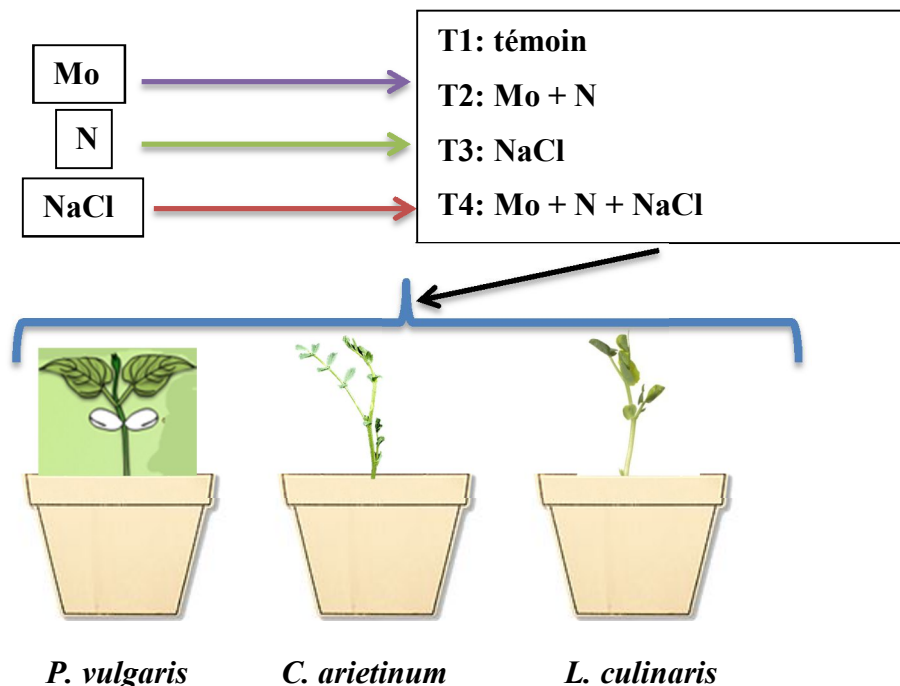
T3: NaCl ajouté à l'eau d'irrigation,

T4: NaCl, molybdène et azote ajoutés à l'eau d'irrigation,

(3 répétitions pour chaque pot)

Le dispositif expérimental

T1	T2
T3	T4



3.2.2. L'activité de la xanthine déshydrogénase et l'aldéhyde oxydase

Ces essais ont été réalisés selon le protocole de Koiwai et *al.*, (2000)

Broyer le matériel végétal dans de l'azote liquide dans un mortier et le réduire en poudre, le conserver à -80°C.

On met dans un microtube (de 1,5ml), 200 mg de poudre végétale de chaque espèce végétale, et on ajoute 200µl de tampon d'extraction composé de : 971 µl 100 mM de tampon K-phosphate pH7.5, 25 µl 200 mM DTT (5 mM concentration finale), 4 µl 0.5 M EDTA pH8.0

Presser avec un petit squeezer pour déchirer les parois végétales, puis procéder à une ultrasonication pendant 30s et remettre les échantillons dans la glace pendant 30s (répéter l'opération 2 fois)

Centrifugation pendant 20 min à 15000 rpm à 4°C. On reprend le surnageant dans de nouveaux microtubes.

On mesure la concentration totale des protéines par la méthode Bradford :

On prend 5µl de chaque échantillon et on ajoute 1000 µl de réactif Bradford (selon la procédure de Bradford, (1976) et mesurer à 595 nm et le blanc serait 1000 µl de la solution Bradford.

On mélange le tampon de charge avec les échantillons selon les volumes appropriés et on prépare les gels natifs de séparation et de concentration.

Le gel de séparation 7.5% : H₂O 6 ml, Tris L 3,1 ml, Acrylamide 3,1 ml, APS (10%) 46µl, TEMED 18,5 µl

Le gel de concentration : H₂O 1,97 ml, Tris U 0,83 ml, Acrylamide 0,53 ml, APS (10%) 33 µl, TEMED 6,7 µl

Après la polymérisation des gels on dépose les échantillons, et on remplit la machine d'électrophorèse (Hofer MIGHTY SMALL SE250) par le tampon de migration après 1h45, quand tous les échantillons migrent jusqu'en bas, on retire les gels et on les rince.

On coupe les gels et on les met dans des boites en plastique pour mettre les solutions de coloration pour la révélation des bandes pendant 30min dans l'obscurité. L'intensité relative des bandes de formazane est directement proportionnelle à l'activité de l'enzyme (Rothe, 1974).

Ces solutions de coloration se préparent fraîchement.

La solution de coloration pour XDH

5 mg Hypoxanthine

4 – 8 mg MTT

50 µl PMS (stock 10 mg/ml)

10 ml 250 mM Tris/HCl pH 8.5

La solution de coloration pour AO

3 mg 1-Naphthylaldéhyde (final 1 mM)

3 mg Indole-3-(carb)aldéhyde (final 1 mM)

4 – 8 mg MTT

50 µl PMS (stock 10 mg/ml)

10 ml 100 mM K-phosphate buffer pH 7.5

On prend des photos de ces gels avec le logiciel intas image et on mesure l'intensité des bandes grâce au logiciel imageJ pour pouvoir estimer la différence entre elles.

3.2.3. L'activité de la sulfite oxydase

On pèse 100mg de matériel végétal et on ajoute 400 μ l de tampon d'extraction.

Le tampon d'extraction est 100Mm Tris Acétate pH 7.25.

On procède à une ultrasonication pendant 30s, puis on remet les échantillons dans la glace pendant 30s. On répète cette opération 2 fois.

Centrifugation pendant 20 min à 15000 rpm à 4°C. On reprend le surnageant dans de nouveaux microtubes.

Et on ajoute 1ml de sulfate d'ammonium en 5 étapes et cela se passe dans la chambre froide 4°C, (on ajoute 200 μ l dans chaque échantillon et on attend 2min), de cette manière on permet aux protéines de précipiter. Centrifugation pour 10 ou 15min à 15000 rpm à 4°C.

On jette le surnageant et on garde le précipitât qui contient la sulfite oxydase et on ajoute 200 μ l du tampon d'extraction, et là on mesure la concentration de protéines totales avec la méthode de Bradford à 595nm, 5 μ l + 1000 μ l.

On prend de chaque échantillon le volume qui correspond à 80 μ g de protéines totales, on complète ce volume à 400 μ l avec le tampon d'extraction dans de nouveaux microtubes et on prépare d'autres nouveaux microtubes (0), (1), (2), (3), pour chaque échantillon, ce qui correspond à 0, 5, 10, et 20min.

Pour chaque espèce, on met dans tous les tubes (0) la solution d'induction, qui est la solution de sulfite ainsi que la solution de stop, et on met dans tous les autres tubes (1), (2), (3), la solution stop qui est la solution de détection

Après 5, 10, et 20min on met 100 μ l de l'échantillon correspondant dans les tubes (1), (2), (3) respectivement.

Mesurer la densité optique avec un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 570 nm, le blanc serait : 900 μ l solution stop et 100 μ l tampon d'extraction. (Pachmayr, 1960)

3.2.4. L'activité de la nitrate réductase

3.2.4.1. Protocole 1 de la nitrate réductase

Nous avons essayé deux protocoles pour estimer l'activité de la nitrate réductase in vitro
L'activité de la Nitrate réductase selon Sagi et *al.*, (1997) avec des modifications.

Tampon d'extraction:

25mM Tris HCl pH8.5

1mM EDTA

2% (p/v) caséine (nous avons utilisé BSA)

3% (p/v) PVP ou PVPP

3mM DTT

10 uM FAD

1uM molybdate de sodium

5mM glutathion GSH, Ultrasonication

Centrifugation à 30000 g à 3-5°C pendant 15 min

Le surnageant qui résulte est utilisé pour étudier l'activité de la nitrate réductase et l'activité du molybdène cofacteur.

❖ Dosage de l'activité de la nitrate réductase

200ul de surnageant + 200ul de tampon de réaction qui est de composition suivante :

15mM K- phosphate pH 7,5

25 mM Tris HCl pH 7,5

12,5 mM KNO₃

0,4mM NADH

Incubation à 30°C pendant 15min, puis on stop la réaction avec 100ul de:

0,15 mM PMS

0,5M acétate de zinc

Vortexer et ajouter 1ml de (1v/1v) de

1% SAD dans 3M HCl

0,02% NED

Centrifugation pendant 10min à 20000g avant la lecture au spectrophotomètre à 540nm

Le blanc tampon de réaction + la solution stop +SAD+NED

3.2.4.2. Protocole 2 de la nitrate réductase

Un protocole selon Evans et Nason (1952)

On pèse 100 mg de matière fraîche de partie aérienne des 3 espèces, auxquelles on ajoute 400 µl de tampon d'extraction (on général, le volume est 4 fois supérieur au poids du matériel végétal)

On prépare ces microtubes pour chaque échantillon : (0), (10), (20), (30), (réaction)

La composition du tampon d'extraction :

- 3,38 ml la solution de stock
- 200 µl DTT 0,1 M
- 400 µl PMSF
- 8 µl FAD
- La composition de la solution de stock
- 8m HEPES
- 4ml Glycérine 99%
- 400 µl EDTA
- 2ml Mg (OAc)
- 400 µl Triton X-100 10%
- 2ml NaMoO₄
- 200mg BSA (fraction UV)
- 400mg PVPP

On prend 50 µl de la solution en suspension = la solution initiale (= 100 mg matériel végétal + 400 µl de tampon d'extraction) de chaque échantillon et on les met dans les nouveaux microtubes (0)

On ajoute dans les autres tubes :

(0) : 50 µl solution initiale + 25 µl Zn(OAc)₂ 600mM + 235 µl tampon de test A + 15 µl solution de réduction équivalente (RES)

(10) : 25 µl Zn(OAc)₂ 600mM

(20) : 25 µl Zn(OAc)₂ 600mM

(30) : 25 µl Zn(OAc)₂ 600Mm

(réaction) : 775 µl tampon de test A + 50 µl solution de réduction équivalente.

La solution initiale est le matériel végétal mélangé au tampon d'extraction, quand on l'ajoute dans les nouveau microtubes on les mets dans la glace jusqu'au moment où on ajoute les autres réactifs.

Tampon de test A

Hepes : 5 ml

KNO₃ : 1,5 ml

EDTA : 1,5 ml

H₂O : 15,5 ml

Tampon de test C

Hepes : 5 ml

KNO₃ : 1,5 ml

EDTA : 1,5 ml

NaNO₂ : 1 ml

H₂O : 15,5 ml

Solution de réduction équivalente (sensible à la lumière)

- NADH (grade II) : 21,3 mg
- HEPES : 300 µl
- FAD : 60 µl
- DTT 60 µl
- Na₂MoO₄ : 3 µl
- H₂O : 2477 µl

On prend 165 µl de la solution initiale, les mettre dans les tubes (réaction), les incubé à 26°C. 10 minutes plus tard, on prend 300 µl des tubes (réaction) et on les met dans les tubes (10) de tous les échantillons à mesurer.

10 minutes après cette action, on prend 300 µl autre des tubes (réaction) et on les met dans les tubes (20).

10 minutes après cette action, on prend 300 µl autre des tubes (réaction) et on les met dans les tubes (30).

On ajoute 5µl de PMS dans les tous les tubes (0) (10) (20) (30) (control) et incubation pendant 15min dans le noir à la température ambiante

On ajoute 100 µl de sulfanilamide (SA 1% dans 3N HCl) et 100 µl de NED (qui est la solution de coloration N-(1-Naphtyle)-etylendiamine-dihydrochloride (0,02% dans H₂O)

On passe les échantillons dans la centrifugeuse à 15000 rpm pendant 5 min à une température ambiante, et on lit l'absorbance à 540nm

3.2.5. L'activité du molybdène cofacteur

Basé sur la détermination de l'activité de la NADPH-nitrate réductase assemblé à partir de l'apoptérine de la nitrate réductase de l'espèce *Neurospora crassa* mutante et déficiente en Moco (**Nit-1**) et le Moco de la nitrate réductase de nos espèces végétales (Sagi et *al.*, 1997)

Libération du Moco

- 50ul de **surageant** issu du protocole 2 de la nitrate réductase
- 25ul de 25mM GHS

Chauffer à 80°C pendant 90s et mettre dans la glace immédiatement

La Complémentation

On ajoute à 75ul de la solution obtenue:

- 40ul d'extrait de *Neurospora crassa* Nit-1
- 10ul de molybdate de sodium (20mM)
- 20ul de 50mM KNO₃

Incubation pendant 26h à 4°C

Dosage de l'activité

Après on ajoute 100ul de:

- 200ul 100mM KNO₃ (2v)
- 20ul FAD (1mM) + 180ul H₂O (2v)
- 25ul NADPH (20mM) + 75ul H₂O (1v)

Incubation à 30°C pendant 15min

On stoppe la réaction et on la révèle selon les mêmes étapes que la nitrate réductase

On stop la réaction avec 100ul de:

- 0,15 mM PMS
- 0,5M acétate de zinc

Vortexer et ajouter 1ml de (1v/1v) de

- 1% SAD dans 3M HCl
- 0,02% NED

Centrifugation pendant 10min à 20000g avant la lecture au spectrophotomètre à 540nm

Le blanc tampon de réaction + la solution stop +SAD+NED.

3.2.6. L'analyse statistique

Les données obtenues ont été soumises à une analyse de la variance à un, deux et trois facteurs fixes de classification; les moyennes sont comparées selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1999), basée sur la plus petite valeur significative, réalisés par le logiciel Minitab version 13.31.

On considère que les résultats sont significatifs quand $P \leq 0,05$. Les tableaux des groupements des moyennes sont réalisés par le logiciel Excelstat 2016, se (erreur standard)

L'analyse de composante principale est réalisée à l'aide du logiciel Excelstat 2016.

3.3. Résultats et Discussion

3.3.1. La concentration des protéines totales

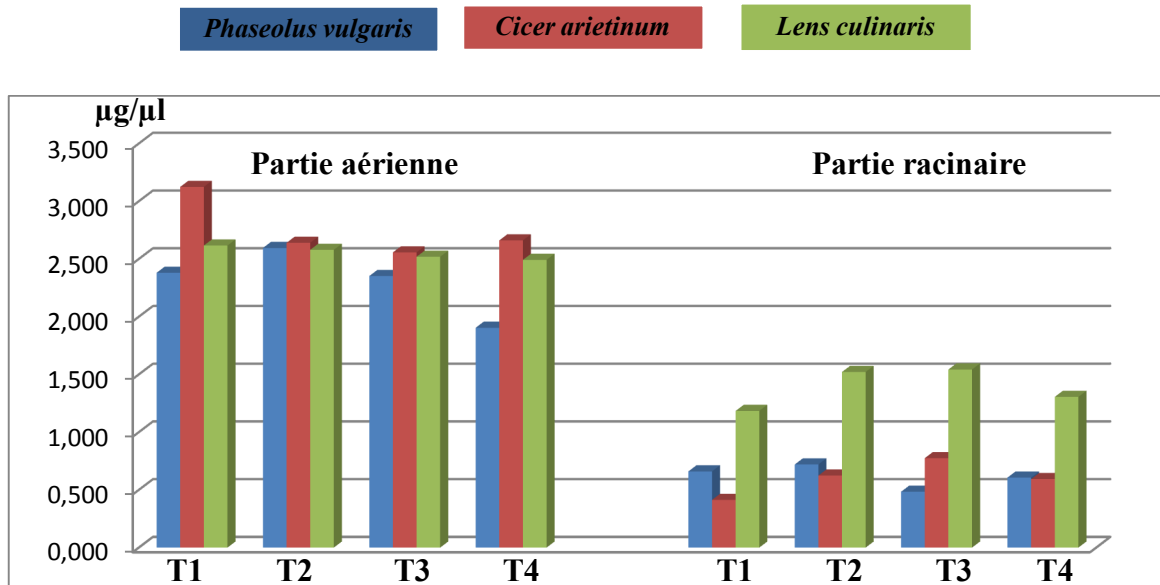


Figure 26 : La concentration des protéines totales des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

On observe une différence très hautement significative dans la concentration des protéines entre la partie aérienne et racinaire, chez les trois espèces.

Dans la partie aérienne du haricot on remarque que la valeur la plus élevée du taux de protéines totales est 2,595µg/µl et dans les racines est de 0,720µg/µl représentées par les individus qui ont reçu le traitement T2 ce qui correspond à l'apport du molybdène et de l'azote, donc ces deux derniers éléments ont contribué à l'accumulation de protéines totales (fig.26).

L'un des principaux caractères physiologiques de tolérance aux contraintes du milieu est l'ajustement osmotique, celui-ci est réalisé grâce à une accumulation de composés osmorégulateurs conduisant à une réduction du potentiel osmotique permettant ainsi le maintien du potentiel de turgescence. (El Midaoui et *al.*, 2007)

Dans la partie aérienne du pois chiche et de la lentille, les valeurs sont proches de point de vue statistique (tableau09) mais la plus élevée est représentée par les plantes témoins, mais dans les racines les valeurs les plus importantes sont données par les traitements T3 c'est-à-dire en condition de stress salin.

Puisque les racines sont les premières à percevoir le signal du stress, elle commence à synthétiser de nouvelles molécules pour faire face à l'excès de NaCl autour des racines. (Zdunek-Zastocka et Lips, 2003)

Dans un travail précédant, on a trouvé que tous les paramètres de la croissance et du rendement ont été significativement influencé par l'effet combiné du molybdène et phosphore, leur application a significativement augmenté le taux de protéines chez les plantes de haricot (Kandil *et al.*, 2013)

Tableau 09 : La concentration des protéines totales des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

[protéines totales] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	<i>P.vulgaris</i>	<i>C.arietinum</i>	<i>L.culinaris</i>
Partie aérienne			
T1	2,380 \pm 0,034 ab	3,124 \pm 0,053 a	2,616 \pm 0,013 a
T2	2,595 \pm0,051 a	2,640 \pm 0,024 a	2,579 \pm 0,024 a
T3	2,352 \pm 0,019 ab	2,557 \pm 0,016 a	2,519 \pm 0,056 a
T4	1,904 \pm 0,022 abc	2,661 \pm 0,012 a	2,492 \pm 0,097 a
Partie racinaire			
T1	0,660 \pm 0,012 c	0,413 \pm 0,013b	1,184 \pm 0,065 b
T2	0,720 \pm0,064 bc	0,624 \pm 0,067 b	1,521 \pm 0,062 b
T3	0,484 \pm 0,015 c	0,775 \pm 0,020 b	1,543 \pm 0,012 b
T4	0,607 \pm 0,003 c	0,593 \pm 0,049 b	1,305 \pm 0,043 b

Les légumineuses ont besoin de Calcium, d'azote et de molybdène pour leur développement normal, le déficit en ces éléments peut restreindre la croissance des plantes à travers différents mécanismes. L'application du molybdène augmente le rendement du haricot *Phaseolus vulgaris* (Bonilla et Bolaños, 2009).

Par exemple, la déficience en Calcium est connue pour diminuer la quantité de l'azote fixé chez les légumineuses, ce qui résulte en croissance réduite due à un azote inadéquat, l'azote qui est nécessaire dans la structure des protéines (Bambara et Ndakidemi, 2010).

3.3.2. L'activité de la xanthine déshydrogénase

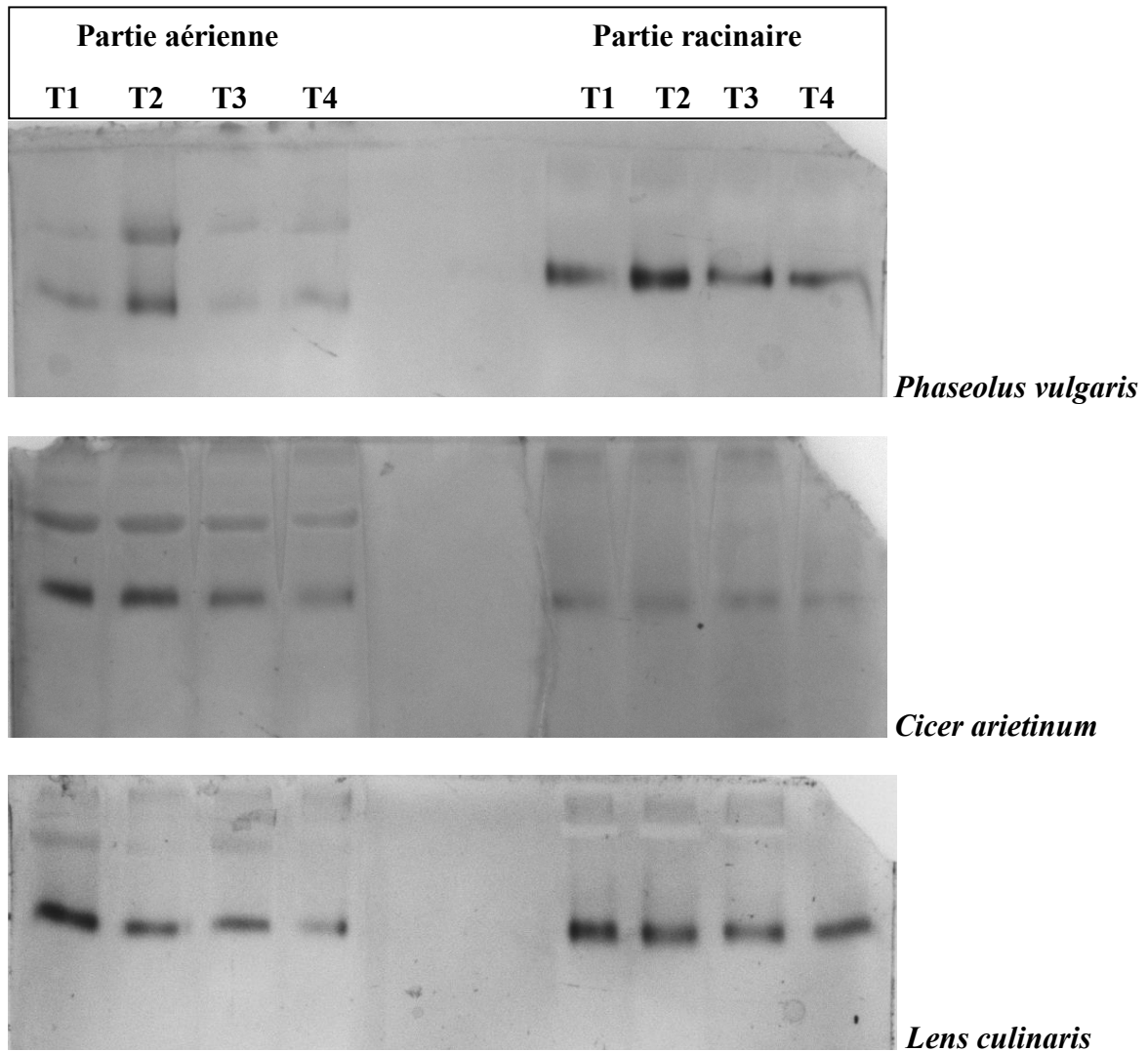


Figure 27: Le zymogramme de la xanthine déshydrogénase, sur gel de polyacrylamide des 3 espèces

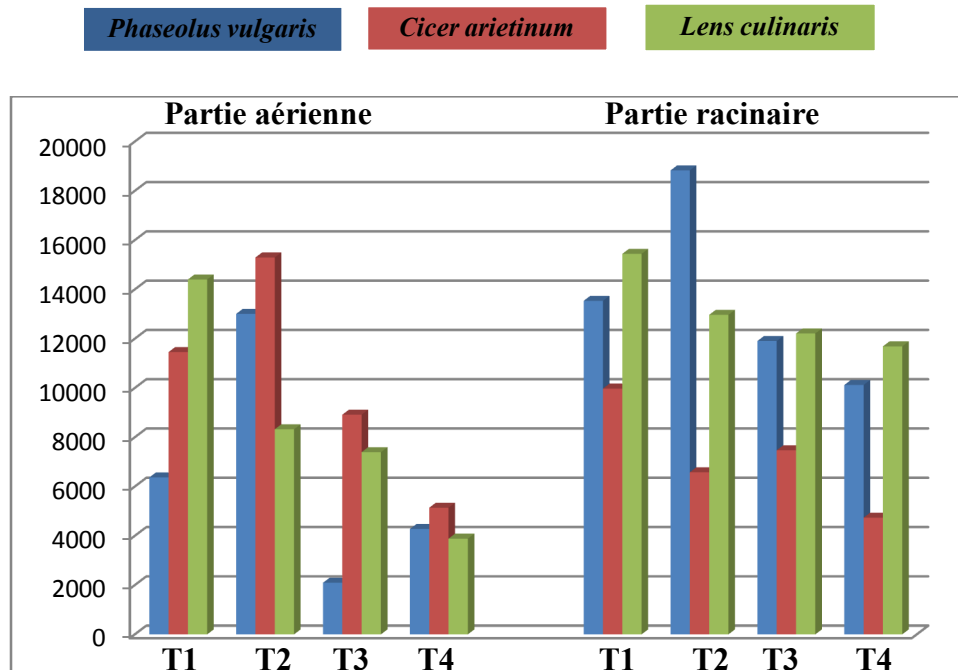


Figure 28 : L'activité de la xanthine déshydrogénase des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

Dans la figure 28, on observe que les bandes de l'activité de la xanthine déshydrogénase sont plus saillantes dans les racines que dans la partie aérienne, et que l'activité de cette enzyme semble être affectée et diminuée par la salinité.

Chez le haricot les valeurs les plus élevées de la xanthine déshydrogénase dans la partie aérienne et racinaire sont données par les plantes irriguées par le traitement T2, c'est-à-dire l'apport du molybdène et de l'azote a stimulé l'activité de la xanthine déshydrogénase, avec 13007,53 et 18829,89, respectivement (fig.27).

Chez le pois chiche l'activité de la xanthine déshydrogénase est stimulée dans la partie aérienne par l'apport du molybdène et de l'azote (T2) (fig.27). Cependant dans la partie racinaire, les plantes témoins possèdent l'activité la plus importante, ainsi que pour la lentille avec les valeurs 14403,18 et 15442,58 de la partie aérienne et racinaire respectivement. (tableau 10)

Tableau 10 : L'activité de la xanthine déshydrogénase des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

XDH	<i>P.vulgaris</i>	<i>C.arietinum</i>	<i>L.culinaris</i>
	Partie aérienne		
T1	6368,94 ±211 b	11458,82 ±214 b	14403,18 ±414 a
T2	13007,53 ±116 a	15296,06 ±654 a	8324,94 ±114 b
T3	2096,23 ±177 c	8916,20 ±174 c	7395,63 ±044 c
T4	4278,53 ±145 d	5140,45 ±045 d	3885,11 ±023 d
	Partie racinaire		
T1	13537,84 ±1224 b	9975,87 ±156 a	15442,58 ±564 a
T2	18829,89 ±1544 a	6580,79 ±122 c	12968,11 ±214 b
T3	11906,60 ±0814 c	7473,62 ±126 b	12211,28 ±284 b
T4	10121,58 ±1234 c	4737,99 ±112 d	11689,63 ±234 b

L'augmentation dans l'activité de la xanthine déshydrogénase du maïs et du ray-grass en conditions de salinité ou par le traitement d'ammonium pourrait être due à la production accrue de l'acide urique, en éliminant efficacement les espèces réactives d'oxygène sous le stress salin (Hernandez *et al.*, 1995).

Le NO⁻ peut jouer un rôle important dans la régulation osmotique dans des conditions de salinité, le maintien de la synthèse des enzymes et leur protection de la dégradation ou l'inactivation. (Sagi *et al.*, 1997)

Cependant, chez le pois, la salinité n'affecte pas significativement l'activité de XDH dans les racines, mais la diminue nettement dans les feuilles. Mais cette activité augmente dans les feuilles ainsi que dans les racines quand l'ammonium est ajouté comme seule source d'azote. (Zdunek-Zastocka et Lips, 2003)

Les légumineuses répondent favorablement à l'application du soufre, phosphore et molybdène. Il a été rapporté que l'application de ses éléments nutritifs augmente le rendement des plantes de soja (Ahmad *et al.*, 2005)

Mansour, (2014) a conclu que combiner l'azote et le molybdène crée un effet plus appréciable sur le taux de macro et microélément qu'ajouter l'azote seul, chez des transplants de l'olivier.

Il a été suggéré que le rôle de XDH pendant le stress pourrait être relié au besoin d'une utilisation plus efficace du squelette du carbone disponibles pour synthétiser des composés d'azote organiques avec un ratio bas C/N pour leur transport par le xylème vers la partie aérienne (Sagi *et al.* 1998).

3.3.3. L'activité de l'aldéhyde oxydase

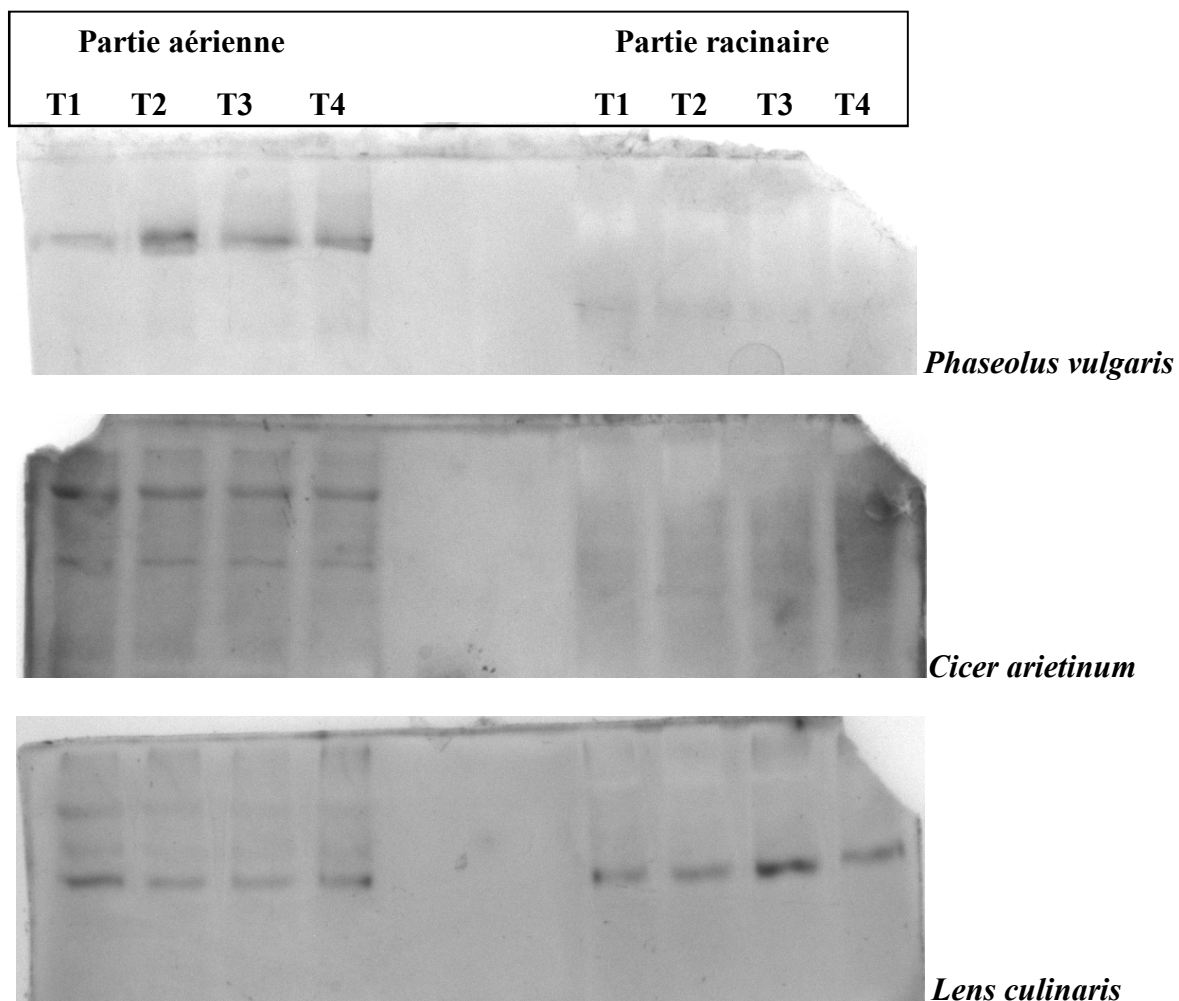


Figure 29: Le zymogramme de l'aldéhyde oxydase, sur un gel de polyacrylamide des 3 espèces

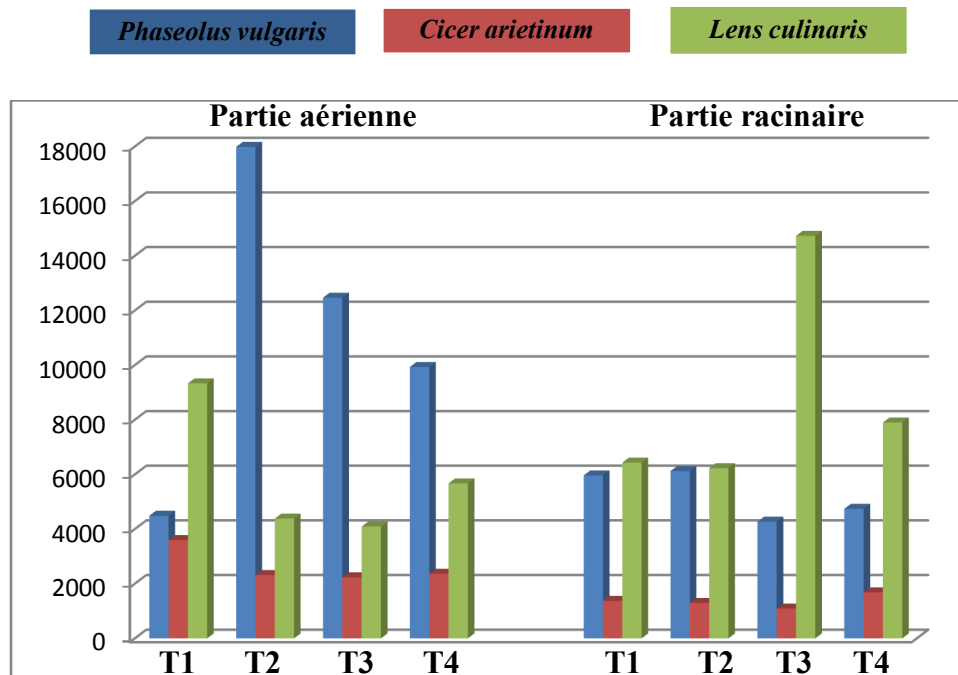


Figure 30 : L'activité de l'aldéhyde oxydase des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

Les valeurs de l'activité de l'enzyme aldéhyde oxydase sont plus élevées dans la partie aérienne chez le haricot et le pois chiche par contre on rencontre les valeurs le plus élevés chez la lentille dans la partie racinaire (fig.30).

Chez le haricot, il semble que dans la partie aérienne, l'activité de l'aldéhyde oxydase soit stimulée par l'ajout du molybdène et de l'azote avec une valeur de 17986,35 qui est 4 fois plus élevé par rapport aux témoins, et dans la partie racinaire on remarque que cette activité diminue.(tableau11)

Chez le pois chiche, dans la partie aérienne, l'intensité la plus importante de l'activité de l'aldéhyde oxydase est donnée par les individus témoins, alors que dans les racines l'activité est presque inexistante par rapport aux deux autres espèces (fig.29).

Pour la lentille, l'activité de l'aldéhyde oxydase la plus importante est enregistrée chez les individus témoins, dans la partie aérienne alors que dans la partie racinaire, elle est enregistrée chez les plantes soumises au stress salin avec une valeur de 14731,087 qui est 2 fois plus élevé que les témoins. (tableau 11)

Puisque le site principale de la synthèse de ABA est la racine (Bano et al., 1993), ce qui pourrait expliquer le taux élevé de l'activité de AO dans les racines plus que dans la partie aérienne en condition de stress pour la lentille qui pourrait être son moyen d'adaptation au stress salin.

Tableau 11 : L'activité de l'aldéhyde oxydase des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

AO	<i>P.vulgaris</i>	<i>C.arietinum</i>	<i>L.culinaris</i>
Partie aérienne			
T1	4487,489±56 d	3596,409±43 a	9331,116±33 a
T2	17986,35±126 a	2321,205±98 b	4385,539±72 c
T3	12468,329±56 b	2237,569±76 b	4094,004 ±23 c
T4	9932,966±76 c	2364,458±42 b	5672,317±21 b
Partie racinaire			
T1	5964,773±56 a	1376,123±31 a	6432,409±13 c
T2	6122,543±14 a	1296,447±49 a	6229,095±90 c
T3	4270,158±98 b	1090,418±12 a	14731,087±87 a
T4	4741,214±23 b	1687,64±11 a	7901,874±76 b

L'augmentation de l'activité de l'aldéhyde oxydase observée dans les racines des plantes de pois exposée à la salinité est accompagnée de l'augmentation du passage de ABA au xylème, (Zdunek et Lips, 2001), ceci peut expliquer l'activité élevée de AO dans les racines de la lentille.

Il a été suggérer qu'en condition de salinité ou de sécheresse, les racines sont les premier détecteurs du stress et les producteur du signal du stress (Zdunek-Zastocka and Lips, 2003).

L'augmentation de l'activité de l'aldéhyde oxydase des plantes exposé à la salinité peut être due à l'expression accrue du gène codant pour la ptérine de AO ou à l'activation post-traductionnelle des molécules de l'enzyme existantes. (Omarov *et al.*, 1998)

L'activité de la XDH et AO est plus élevée dans les racines dans lesquelles l'effet de la salinité est largement plus important que dans la partie aérienne (Sagi *et al.*, 1998).

Pour un meilleur rendement du soja, de grande quantité d'azote doit être apportées, ce qui peut être obtenu par la fixation symbiotique du N₂. Cependant l'efficacité de ce processus biologique peut être limitée par le déficit en oligoéléments, notamment le molybdène (Campo *et al.*, 2009)

L'activité de AO de la partie aérienne de l'orge n'est pas stimulée en condition de stress salin, par contre elle est augmenté dans les racine, (Omarov *et al.*, 1998) ce qui concordent avec nos résultats concernant la partie aérienne de la lentille et du pois chiche qui ne voit pas leur activité de l'aldéhyde oxydase s'élever par rapport au témoin.

3.3.4. L'activité de la sulfite oxydase

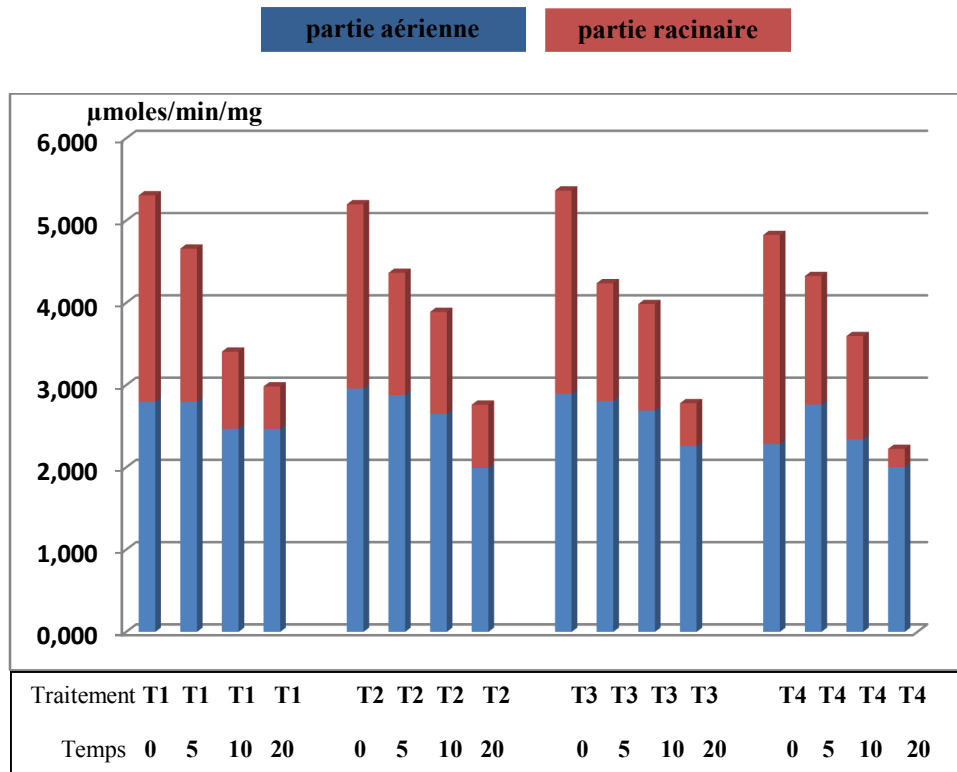


Figure 31 : L'activité de la sulfite oxydase des plantes de *Phaseolus vulgaris*

Les résultats de l'étude statistique montre des valeurs proches de l'activité de la sulfite oxydase, qu'il n'y a pas une différence significative entre les différents traitements et il y a une différence hautement significative entre les parties aérienne et racinaire.

L'activité de la sulfite oxydase semble être stimulée dans les feuilles de façon plus importante que dans les racines.

Chez le haricot, la valeur la plus élevée (2,959 µmoles/min/mg prot.) est donné au temps 0 par les plantes qui ont reçu le molybdène et l'azote dans la partie aérienne et dans les racines la valeur de (2,54 µmoles/min/mg prot.) donnée par les plantes soumises au stress salin (fig.31).

Cette enzyme semble être affectée par la salinité dans la partie aérienne et stimulé par le molybdène et l'azote, mais dans les racines c'est la condition de stress qui donne l'activité la plus importante.

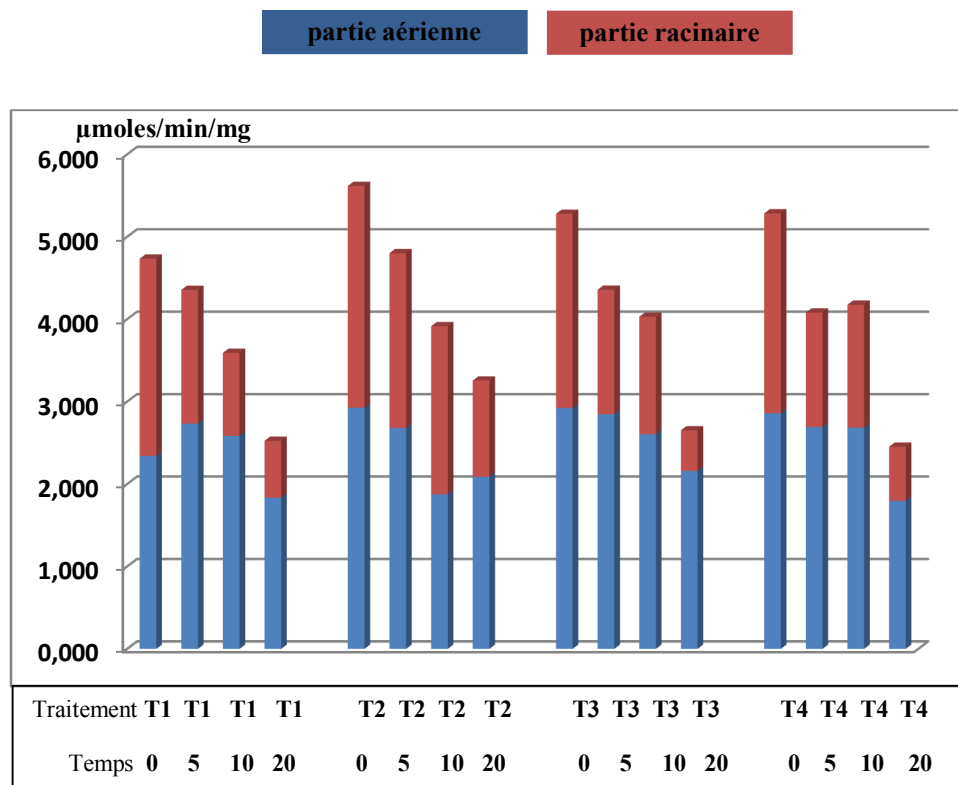


Figure 32 : L'activité de la sulfite oxydase des plantes de *Cicer arietinum*

Dans la partie aérienne du pois chiche la valeur la plus importante est enregistrée au temps 0 au traitement T2 c'est-à-dire quand le molybdène et l'azote sont ajoutés ($2,925\mu\text{moles/min/mg prot}$), et la valeur la plus basse ($1,797\mu\text{moles/min/mg prot}$) est donnée par les plantes soumises au stress salin et en présence de molybdène et d'azote après 20 min. (tableau 12)

Dans les racines l'activité de la sulfite oxydase semble aussi être stimulée par l'apport du molybdène et de l'azote (fig.32).

Chez les eucaryotes, les molybdoenzymes les plus importantes sont ; la sulfite oxydase, qui catalyse la dernière étape de la dégradation des acides aminés contenant du soufre et aussi impliquée dans la détoxification de l'excès de sulfite. (Mendel et Bittner, 2006).

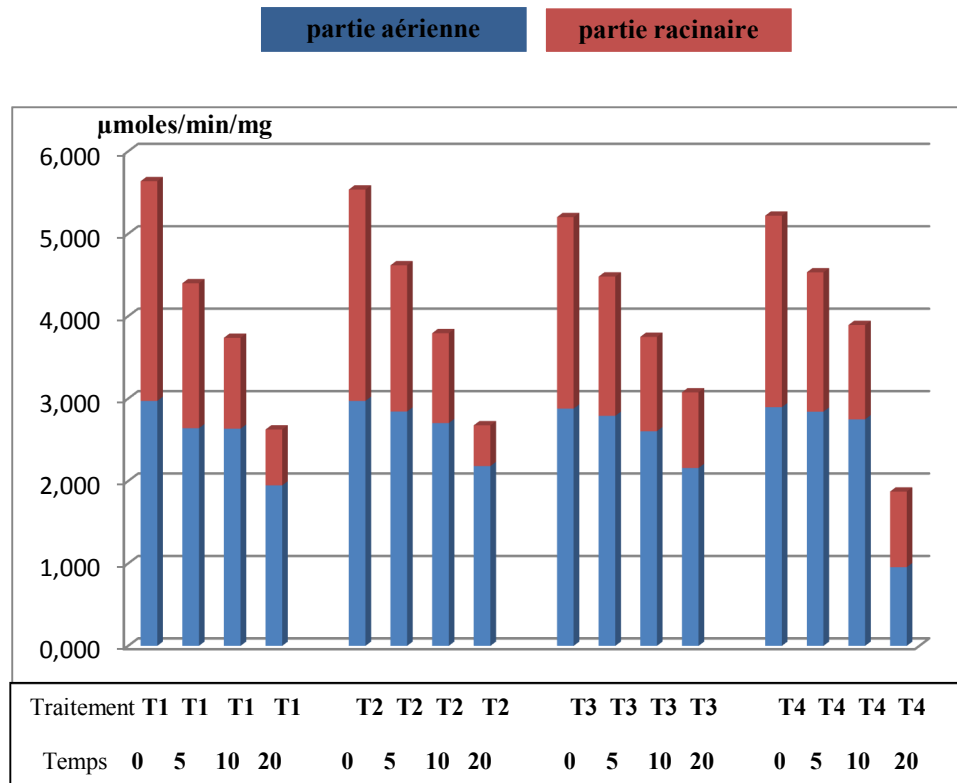


Figure 33 : L'activité de la sulfite oxydase des plantes de *Lens culinaris*

Dans la partie aérienne de la lentille la valeur la plus importante est (2,972 $\mu\text{moles/min/mg}$ prot) représentée par les traitements T1 et T2 au temps 0 et la valeur la plus basse (0,955 $\mu\text{moles/min/mg}$ prot) est donnée après 20 min, chez les plantes soumises au stress salin et en présence de molybdène et d'azote (fig.33).

Dans la racine la valeur la plus élevée est 2,665 $\mu\text{moles/min/mg}$ prot est enregistré chez les plantes témoins au temps 0 et la valeur la plus basse (0,494 $\mu\text{moles/min/mg}$ prot) est représentée par les individus recevant le traitement T2 après 20 min. (tableau12)

Les molybdoenzymes sont impliquées dans le métabolisme de l'azote, en améliorant les qualités de l'acide ascorbique, les sucre solubles et les concentrations de la chlorophylle (Zhao et Bai, 2001; Chen et Nian, 2004), ce qui pourrait expliquer le taux élevé de l'activité de la sulfite oxydase dans la partie aérienne plutôt que dans la partie racinaire.

Tableau 12 : L'activité de la sulfite oxydase de la partie aérienne et racinaire des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris* (T: traitement)

SO		Partie aérienne			partie racinaire		
T	Temps (min)	<i>P.vulgaris</i>	<i>C.arietinum</i>	<i>L.culinaris</i>	<i>P.vulgaris</i>	<i>C.arietinum</i>	<i>L.culinaris</i>
T1	0	2,8 ±0,143	2,341 ±0,115	2,972 ±0,113	2,507 ±0,142	2,393 ±0,145	2,665 ±0,137
T1	5	2,799 ±0,135	2,733 ±0,137	2,641 ±0,142	1,86 ±0,137	1,623 ±0,127	1,758 ±0,135
T1	10	2,47 ±0,132	2,585 ±0,135	2,635 ±0,137	0,938 ±0,165	1,007 ±0,165	1,104 ±0,112
T1	20	2,47 ±0,142	1,835 ±0,133	1,947 ±0,156	0,514 ±0,108	0,69 ±0,111	0,678 ±0,166
T2	0	2,959 ±0,154	2,925 ±0,166	2,972 ±0,173	2,239 ±0,142	2,692 ±0,155	2,564 ±0,112
T2	5	2,879 ±0,155	2,681 ±0,135	2,844 ±0,165	1,485 ±0,137	2,12 ±0,109	1,773 ±0,165
T2	10	2,649 ±0,165	1,874 ±0,137	2,703 ±0,142	1,241 ±0,147	2,041 ±0,165	1,09 ±0,142
T2	20	1,993 ±0,187	2,088 ±0,165	2,182 ±0,137	0,768 ±0,165	1,167±0,114	0,494 ±0,1388
T3	0	2,894 ±0,102	2,923 ±0,113	2,879 ±0,137	2,472 ±0,137	2,355 ±0,112	2,323 ±0,117
T3	5	2,806 ±0,103	2,847 ±0,135	2,791 ±0,134	1,432 ±0,142	1,511 ±0,133	1,69 ±0,125
T3	10	2,69 ±0,109	2,605 ±0,132	2,605 ±0,142	1,296 ±0,127	1,424 ±0,132	1,144 ±0,122
T3	20	2,259 ±0,123	2,158 ±0,165	2,158 ±0,111	0,521 ±0,165	0,493 ±0,151	0,918 ±0,197
T4	0	2,285 ±0,154	2,86 ±0,131	2,896 ±0,137	2,54 ±0,117	2,424 ±0,137	2,323 ±0,165
T4	5	2,763 ±0,122	2,692 ±0,135	2,843 ±0,165	1,562 ±0,142	1,389 ±0,165	1,69 ±0,127
T4	10	2,341 ±0,112	2,684 ±0,165	2,749 ±0,142	1,255 ±0,108	1,492 ±0,121	1,144 ±0,162
T4	20	2,003 ±0,113	1,797 ±0,137	0,955 ±0,137	0,222 ±0,165	0,656 ±0,123	0,918 ±0,127

3.3.5. L'activité de la nitrate réductase

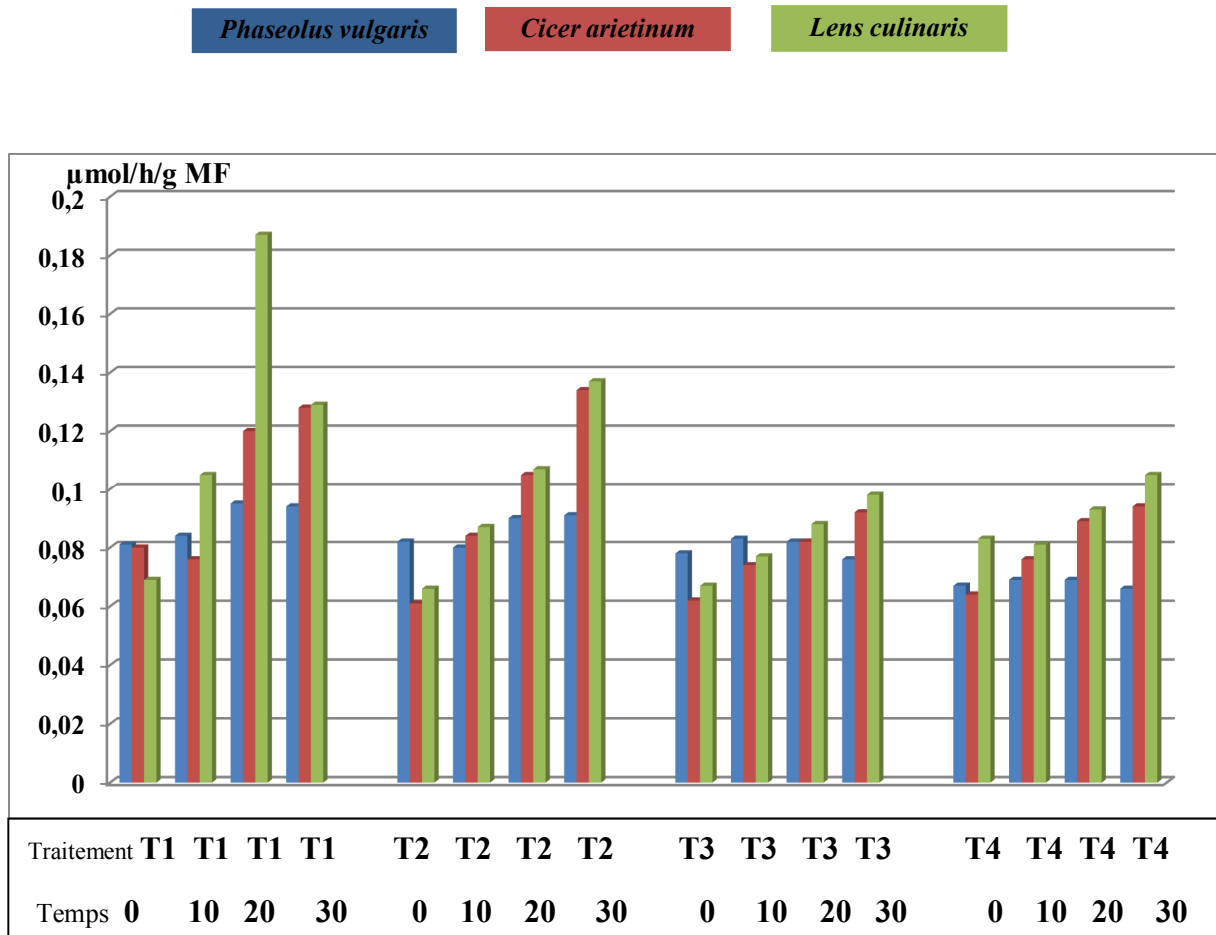


Figure 34 : L'activité de la nitrate réductase de la partie aérienne des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

C'est le protocole 2 qui nous a permis d'avoir ces résultats.

Chez le haricot, les valeurs de l'activité de la nitrate réductase sont proches et appartiennent au même groupe statistique. Cette activité est diminuée par la salinité. (tableau13)

Chez le pois chiche et la lentille, l'analyse statistique montre qu'il y a une différence hautement et très hautement significative respectivement.

Chez ces mêmes espèces, la valeur la plus importante de l'activité de la nitrate réductase est 0,134 et 187 $\mu\text{mol/h/g MF}$ représentées par les individus qui ont reçu le Mo et N dans leur milieu de développement (T2), cette activité est stimulée par la présence de ces deux éléments et se voit décliner à cause du stress salin (fig.34).

Dans les tissus photosynthétiques l'ARNm du NR et l'activité de NR varient selon la journée, avec le taux le plus élevé durant le jour et le plus bas durant la nuit. (Zdunek-Zastocka et Lips, 2003)

L'augmentation de l'activité de la nitrate réductase est dû au stress chez *Cuminum cyminum*. (Sepehr et al., 2012)

Tableau 13 : L'activité de la nitrate réductase de la partie aérienne des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris* (T: traitement)

NR ($\mu\text{mol/h/g MF}$)		<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lens culinaris</i>
T	Temps (min)			
T1	0	0,081 \pm 0,005 a	0,08 \pm 0,012 cde	0,069 \pm 0,013 e
T1	10	0,084 \pm 0,003 a	0,076 \pm 0,013 cde	0,105 \pm 0,011 bcd
T1	20	0,095 \pm 0,002 a	0,12 \pm 0,010 ab	0,187 \pm 0,009 a
T1	30	0,094 \pm 0,001 a	0,128 \pm 0,011 a	0,129 \pm 0,010 bc
T2	0	0,082 \pm 0,006 a	0,061 \pm 0,009 e	0,066 \pm 0,014 e
T2	10	0,08 \pm 0,007 a	0,084 \pm 0,010 cde	0,087 \pm 0,010 de
T2	20	0,09 \pm 0,002 a	0,105 \pm 0,014 abc	0,107 \pm 0,008 bcd
T2	30	0,091 \pm 0,001 a	0,134 \pm 0,012 a	0,137 \pm 0,012 b
T3	0	0,078 \pm 0,009 a	0,062 \pm 0,010 de	0,067 \pm 0,011 e
T3	10	0,083 \pm 0,005 a	0,074 \pm 0,008 cde	0,077 \pm 0,013 de
T3	20	0,082 \pm 0,001 a	0,082 \pm 0,011 cde	0,088 \pm 0,007 de
T3	30	0,076 \pm 0,007 a	0,092 \pm 0,010 bcde	0,098 \pm 0,009 cde
T4	0	0,067 \pm 0,002 a	0,064 \pm 0,011 de	0,083 \pm 0,012 de
T4	10	0,069 \pm 0,001 a	0,076 \pm 0,016 cde	0,081 \pm 0,010 de
T4	20	0,069 \pm 0,004 a	0,089 \pm 0,006 bcde	0,093 \pm 0,011 de
T4	30	0,066 \pm 0,005 a	0,094 \pm 0,012 bcd	0,105 \pm 0,009 bcd

Les graines de haricots imprégnées dans le molybdate de sodium donnent une meilleure nodulation, accumulation de la matière fraîche, fixation de l'azote et un meilleur rendement (Farooq et al., 2012)

La tolérance au stress hydrique chez *S. aculeata* est associée avec une petite réduction du nombre et de la masse des nodules racinaire, une activité de la NR élevée dans les feuilles et les nodules. (Ashraf et Iram, 2005)

L'activité de la nitrate réductase est inhibée par l'effet osmotique du traitement du NaCl chez *Anacardium occidentale*. (Viegas et al., 1999).

La nitrate réductase est généralement considérée comme inductible par son substrat, ceci implique une augmentation de son activité, de sa protéine et de ses ARNm en présence de nitrate. (Bedell, 1996)

L'activité de la nitrate réductase est affectée par la salinité de manière différente dans les racines par rapport aux feuilles, ces résultats suggèrent que la NR est régulée différemment par rapport à la disponibilité du NO₃ dans les feuilles ou les racines en condition de stress salin, la diminution des concentrations en NO₃ à cause du NaCl peut provenir de la perturbation de l'intégrité de la membrane dans les racines (Carvajal et al., 1999), d'une inhibition de l'absorption du NO₃ (Parida and Das, 2004), d'un passage réduit du NO₃ vers le xylème (Abd-El Baki et al., 2000) ou une inactivation des transporteurs de NO₃ à cause de l'effet toxique du ions NaCl (Debouba et al., 2007).

La nitrate réductase (NR, EC 1,6,6,1) est la première enzyme dans l'assimilation du nitrate et est un facteur limitant dans la croissance et le développement des plantes (Solomonson et Barber 1990) et elle est influencée par plusieurs facteurs environnementaux, et pourrait être augmentée par la salinité dans la partie aérienne des plantes qui ont reçu NH₄NO₃ ou NaNO₃ (Sagi et al., 1997).

3.3.6. L'activité du molybdène cofacteur

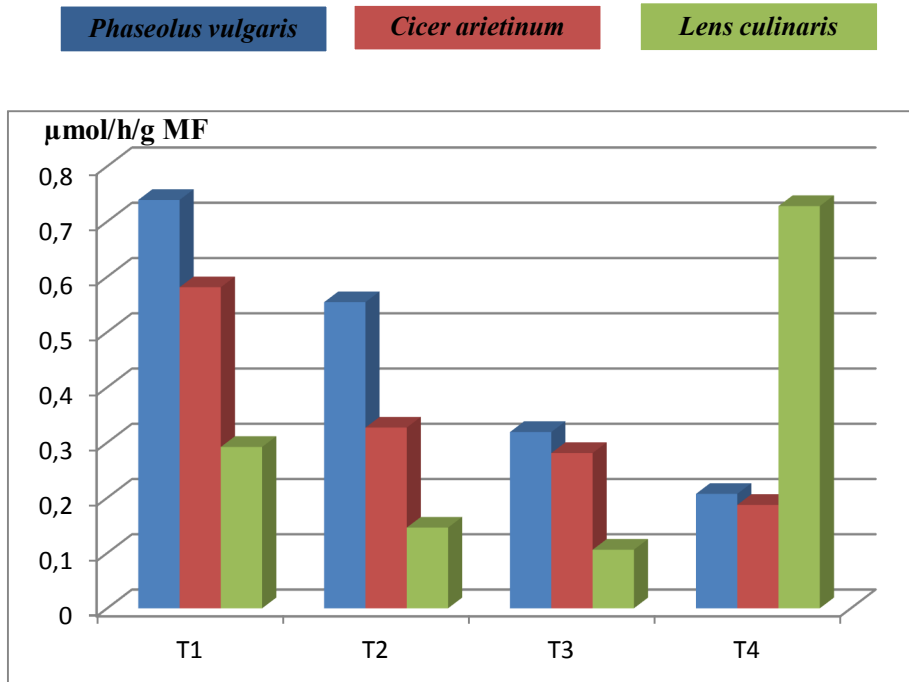


Figure 35 : L'activité du molybdène cofacteur de la partie aérienne des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

L'analyse statistique révèle une différence très hautement significative entre les traitements et entre les espèces. (tableau 14)

L'activité du molybdène cofacteur est plus élevée chez le haricot par rapport à la lentille et au pois chiche

Chez le haricot et le pois chiche l'activité du Moco diminue dans les différents traitements avec la valeur la plus élevée chez les plantes témoins avec 0,739 et 0,581 $\mu\text{mol/h/g MF}$ respectivement et les valeurs les plus basses sont 0,207 et 0,187 $\mu\text{mol/h/g MF}$, respectivement, représentées par les individus stressés et en présence de molybdène et azote (fig.35).

Contrairement aux deux autres espèces, la lentille voit l'activité du Moco augmenter chez les plantes stressées et en présence de molybdène et d'azote.

Tableau 14 : L'activité du molybdène cofacteur de la partie aérienne des plantes de *P. vulgaris*, *C. arietinum* et *L. culinaris*

Moco	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Lens culinaris</i>
T1	0,739 ± 0,005 a	0,581 ± 0,011 c	0,292 ± 0,021 g
T2	0,554 ± 0,007 d	0,327 ± 0,009 e	0,146 ± 0,005 k
T3	0,319 ± 0,002 f	0,281 ± 0,012 h	0,106 ± 0,012 l
T4	0,207 ± 0,008 i	0,187 ± 0,008 j	0,728 ± 0,017 b

L'excès apparent du Moco dans les tissue peut être dû à la quantité considérable des molybdoenzymes inactives comme ce qui est largement décrit pour la NR (Omarov et *al.*, 1998).

Des plantes mutante d'orge ayant une capacité réduite pour produire l'acide abscissique (ABA) en réponse au stress hydrique ou thermique étaient incapables d'exprimer la NR, AO et XDH (Walker-Simmons et *al.*, 1989), NR était surexprimée dans les feuilles des plantes de tobacco mutantes en ABA, apparemment due à la disponibilité accrue du MoCo pour la synthèse de NR (Sagi et *al.*, 1997), puisque le Moco est incorporé à l'aldéhyde oxydase, qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse de ABA (Walker-Simmons et *al.*, 1989), ainsi le domaine MoCo peut être le site qui contrôle l'activité de la NR et peut être aussi relié aux mécanismes d'adaptation des plantes aux conditions de stress comme l'acidité du sol, le stress hydrique, le stress thermique ainsi qu'à la salinité élevée (Sagi et *al.*, 1997), ce même auteur a rapporté que dans des conditions de salinité, l'augmentation du niveau Moco est corrélée avec l'activité de la NR de la partie aérienne des plantes développées avec le NO⁻, ce qui correspond à notre traitement ACP, où on note une corrélation positive entre l'activité du Moco et l'activité de la NR chez le haricot et le pois chiche avec (0,951) et (0,876), ainsi qu'avec l'activité de AO avec (0,984) (Annexe 6).

3.4. Conclusion

La concentration des protéines totales est plus élevée dans la partie aérienne que dans les racines pour les trois espèces, et la lentille est l'espèce qui synthétise la quantité la plus élevée par rapport aux deux autres espèces.

Le molybdène et l'azote stimule la synthèse des protéines totales chez le haricot dans les deux parties aérienne et racinaire. Dans la partie aérienne du pois chiche et de la lentille, les valeurs les plus élevées sont données par les plantes témoins, alors que dans leurs racines, c'est le stress salin qui cause l'augmentation de la concentration des protéines totales.

L'activité de la xanthine déshydrogénase est plus importante dans les racines que dans la partie aérienne chez le haricot et la lentille, et c'est cette dernière espèce qui possède la plus importante activité parmi les trois espèces.

Dans la partie aérienne du haricot et du pois chiche, l'activité de la xanthine déshydrogénase est stimulée par l'apport du molybdène et de l'azote.

L'activité de l'aldéhyde oxydase est plus importante chez le haricot et la lentille par rapport au pois chiche, elle est augmentée dans la partie aérienne du haricot par l'apport du molybdène et de l'azote, et dans les racines de la lentille en condition de stress salin.

La sulfite oxydase possède une activité plus importante dans les feuilles par rapport aux racines chez les trois espèces, qui diminue avec le temps et est affectée par le stress salin.

L'activité de la nitrate réductase augmente avec le temps mais elle est affectée par le stress salin. La lentille se distingue par l'activité la plus élevée.

L'activité du molybdène cofacteur diminue à cause du stress salin à part pour la lentille qui augmente en condition de stress salin.

Grace à l'apport du molybdène et de l'azote dans l'eau d'irrigation, la lentille connue pour être une espèce sensible, montre la meilleure adaptation au stress salin par rapport au haricot et au pois chiche.

Chapitre 4

Mise en évidence des molybdoenzymes par technique de western blot chez les trois espèces

4.1. Introduction

4.2. Matériel et méthode

4.3. Résultats et discussion

4.4. Conclusion

4.1. Introduction :

Dans cette partie nous avons essayé de mettre en évidence la présence des protéines des molybdoenzyme par technique de western blot.

4.2. Matériel et méthode :

La technique se base sur l'analyse des extraits enzymatique dans une électrophorèse d'une SDS-page donc pour chaque enzyme, XDH, AO, SO et NR on utilisera l'extrait enzymatique obtenu selon les différentes techniques expliquées dans le chapitre 3.

4.2.1. Le western blot de la sulfite oxydase

On prépare un gel SDS 10%

Le gel de séparation

H₂O 3,4ml , L tris 2,13 ml, SDS 10% : 85µl, 0,5 M EDTA pH 8.0 : 31,5 µl, l'acrylamide 2,83 ml, APS (10%) 31,5 µl, TEMED 12,5 µl.

Le gel de concentration

Les quantités pour 2 gel : le mix 3* 780 µl , 4* U Tris 1ml, Acrylamide 640 ml, APS (10%) 40 µl, TEMED 8 µl (le mix : H₂O 118ml, SDS 10% 2 ml, 0,5 M EDTA pH 8.0 1ml)

On mesure la concentration des protéines totales par la méthode de bradford à 595 nm pour prendre la même concentration des protéines pour tous les échantillons (80µg) à partir des extrait enzymatiques et on leur ajoute le tampon de charge, on les met dans le bloc chauffant pour incubation à 95°C pendant 10mn, dans l'appareil d'électrophorèse avec le tampon de migration

Composition du tampon de migration : 1l de 10X Tris-Glycin, 100 ml de 10% SDS, 400 ml de 0,5 M EDTA pH 8.5, Compléter avec H₂O jusqu'à 10 litres

Après 2 heures on enlève le gel de l'appareil d'électrophorèse, on le rince avec de H₂O puis on le trompe dans le tampon de transfert pendant 10mn, on a utilisé une membrane PVDF et 6 papiers wattman 10cm sur 7cm, dans la boîte de la machine de western blot on met dans l'ordre

- 3 papiers wattman trempés dans le tampon de transfert, - la membrane trempée dans le méthanol et après dans le tampon de transfert, - le gel, - 3 papiers wattman trempés dans le tampon de transfert, on verse le reste du tampon de transfert dans la boîte et on met on marche pendant 20mn. (tampon de transfert :1X Tris Glycine 100ml, 10% méthanol 1l) Après les 20 mn passées, on retire la membrane de la boîte du western blot, on la remet dans une petite boîte en plastique transparente, dans le tampon de blocage, qui est composé de 2,5 mg lait en poudre et on complète jusqu'à 50 ml avec TBS, on met la boîte dans le shaker à 4°C la chambre froide pendant toute une nuit.

On reprend la membrane du western blot de la chambre froide, on jette la solution blocage et on met la solution d'anticorps dans une nouvelle solution de blocage et on la remet dans la chambre froide pour 1h40

La solution d'anticorps pour la sulfite oxydase : SO.AC.1 :500 dans 5% de lait en poudre
Après 1h40, on reprend la membrane, on ôte la solution de blocage et on procède à une série de rinçage, avec H₂O puis avec le TBSTX pendant 5min 3fois , puis avec le NaCl (0,8%) pendant 10min puis avec la solution de blocage pendant 5min
Et on met la solution des anticorps secondaires sur la membrane et on met la boîte dans la chambre froide pour 1h40

On procède à l'étape de révélation dans une grande boîte étroite métallique ou dépose d'abord le papier transparent qu'on utilise dans la cuisine, puis la membrane en question puis les deux solutions de coloration (100µl) et on remet le papier transparent et on referme la boîte direction la chambre noire ou on dépose un papier film sur la membrane et on referme laisser 5min et 20 mn.

4.2.2. Le western blot de la xanthine déshydrogénase et l'aldéhyde oxydase

On prépare l'extrait enzymatique comme décrit dans le chapitre 3 et on mesure la concentration des protéines totales avec la méthode de Bradford, pour prendre les différents volumes qui correspondent à la même concentration 80µg.

On prépare un gel SDS 7.5%_et un gel natif

Gel de séparation SDS 7.5%

H₂O 4,1 ml, 4X L tris 2,13 ml, SDS 10% : 85µl, 0,5 M EDTA pH 8.0 : 31,5 µl,
l'acrylamide 2,1 ml, APS (10%) 31,5 µl, TEMED 12,5 µl

Gel natif de séparation

H₂O 4,1ml, 4X L 2,13 ml, l'acrylamide 2,1 ml, APS (10%) 31,5 µl, TEMED
12,5 µl

Le gel natif de concentration

H₂O 28ml, U tris 1 ml, l'acrylamide 640 µl, APS 25 µl, TEMED 8 µl

Le gel de concentration SDS

MIX : (H₂O, SDS, EDTA)780µl * 3 , 4 X U tris 1 ml, l'acrylamide 640 µl, APS
40 µl, TEMED 8 µl

Après avoir calculé les volumes appropriés on leur ajoute le tampon de charge (le gel SDS ; le β-Mercaptoethanol, 2M saccharose, 1% bromophénol) (et pour le gel natif ; 2M saccharose, 1% bromophénol)

Pour le gel SDS, les échantillons doivent passer en incubation à 95°C pendant 10 min pour que les protéines soient dénaturer, et les autre échantillons restent dans la glace jusqu'au moment de les déposer dans l'appareil d'électrophorèse pendant 1h30

Le tampon de migration pour le gel SDS : tris glycine, SDS, EDTA

Le tampon de migration pour le gel natif : tris glycine

Après que toutes les protéines ont migré, on prépare les boites, les papiers wattman et les membranes ; - 3 papiers wattman trempés dans le tampon de transfert, - la membrane trempée dans le méthanol et après dans le tampon de transfert, - le gel, - 3 papiers wattman trempés dans le tampon de transfert, on verse le reste du tampon de transfert dans la boite et on met on marche pendant 20mn. (tampon de transfert ; 1X Tris Glycine 100ml, 10% méthanol 1l)

Après les 20 mn passées, on retire les membranes de la boite du western blot, on les remet dans de petites boites en plastique transparente, dans le tampon de blocage, qui est composé de 2,5 mg lait en poudre et on complète jusqu'à 50 ml avec TBS, on met les boites dans le shaker à 4°C la chambre froide pendant toute une nuit.

on va mettre les anticorps primaires

Pour la Membrane XDH on utilisera *Lens esculentum* XDH antisérum des feuilles

Pour la Membrane AO on utilisera anti AAO1 anticorps finale blutng

Pour la Membrane SO on utilisera anti-lapin

Et aussi nous avons utilisés ses anticorps :

Pour XDH : *Vicia faba* XDH antisérum rabbit

Pour AO : anti-AAO3 2H9 Monoclone

Avec les anticorps secondaires suivants :

XDH : antirabbit

AO : antimouse IgG peroxydase EGL 1/10000

La concentration des anticorps 1µl dans 1000µl de solution de blocage (qui est 5% cad 5g lait en poudre dans 100 ml TBS),

Après avoir ajouté les anticorps on met les membranes dans la chambre froide toujours sur le shaker pendant 2h, après on procède à une série de rinçage :

H₂O puis avec le TBST - XS pendant 5min, TBST - T pendant 5min 2 fois, 8% NaCl pendant 10min, la solution de blocage pendant 10 min (5g lait en poudre dans 100 ml TBS)

Et on met la solution des anticorps secondaires sur la membrane directement sur la solution de blocage, et on met les boites dans la chambre froide pour 2h, et après ses 2h on procède à la meme série de rinçage mais sans la solution de blocage. Le volume des anticorps pour chaque membrane est 2µl, On prépare la boite métallique pour la révélation des bandes

4.2.3. Le western blot pour la nitrate réductase

On utilisera es extraits enzymatique comme décrit dans le chapitre 3 avec des volumes qui correspondent à 80µg de protéines totales

Le gel de séparation SDS 10%

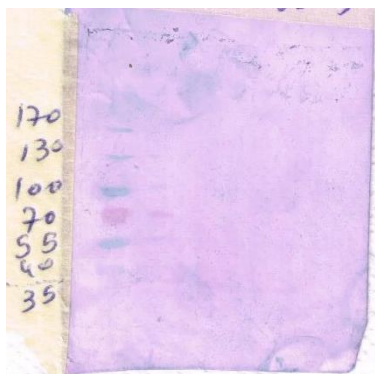
H₂O 3,4ml , L Tris 2,13 ml, SDS 10% : 85µl, 0,5 M EDTA pH 8.0 : 31,5 µl,
l'acrylamide 2,83 ml, APS (10%) 31,5 µl, TEMED 12,5 µl

Le gel de concentration

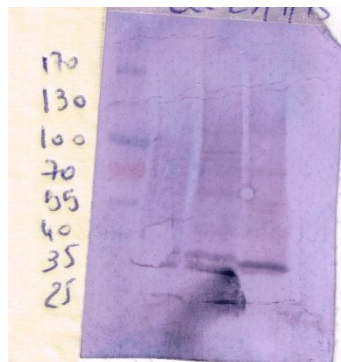
Pour 4 gels

Le mix: 5* 936 µl , 4* U Tris 2ml, l'acrylamide 2 X 640 ml, APS (10%) 80 µl, TEMED 16 µl. On suit les mêmes étapes pour les autre western blots.

4.3. Résultats et discussion



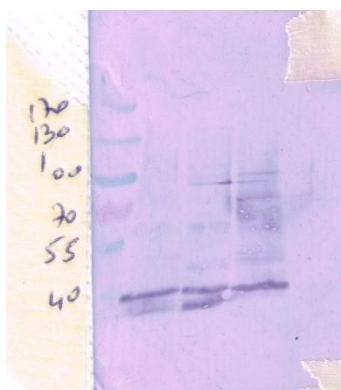
**La sulfite oxydase
sur gel SDS**



**La xanthine déshydrogénase
sur gel SDS**



**La nitrate réductase
sur gel SDS**



**GAPDH
sur gel SDS**

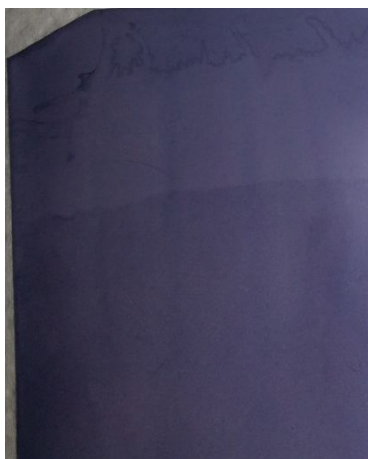


**L'aldéhyde oxydase
sur gel natif**

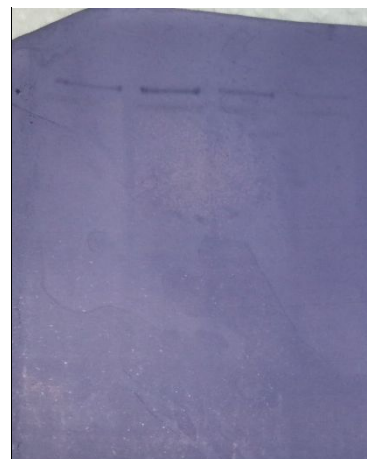
Figure 36: Les membranes du western blot chez le haricot



La sulfite oxydase



La nitrate réductase



La xanthine déshydrogénase

Figure 37 : Les membranes du western blot chez le pois chiche sur gel natif



L'aldéhyde oxydase



La sulfite oxydase



La nitrate réductase

Figure 38 : Les membranes du western blot chez la lentille sur gel natif

Finaleme nt dans ce chapitre il n y a pas un résultat positif, nous n'avons pas pu détecter les bande qui correspondent à nos enzymes étudiées avec cette technique qui au départ a été mise au point pour *Arabidopsis thaliana*, cela peut être dû aux anticorps utilisés car pour l'enzyme GAPDH, nous avons réussi à la détecter, cela veut dire au moins que le protocole a été bien respecter.

4.4. Conclusion

On devrait choisir d'autre anticorps et prendre le temps de mettre au point ce protocole et jouer sur chaque facteur de l'essai.

CHAPITRE 5

L'effet du molybdène, de l'azote et du chlorure de sodium sur l'expression de quelques gènes de molybdoenzymes chez trois légumineuses

5.1. Introduction

5.2. Matériels et Méthodes

5.2.1. Les conditions de développement des plantes

5.2.2. Isolement et purification de ARN

5.2.3. Préparation de la réaction de la transcriptase inverse

5.2.4. La PCR transcriptase inverse

5.2.5. La purification

5.2.6. La ligation

5.2.7. La transformation

5.2.8. Isolement du plasmide et purification de ADN insert de *E. coli*

5.2.9. La digestion

5.2.10. L'analyse statistique

5.2.11. La liste des amorces utilisées

5.3. Résultats et discussion

5.3.1. Le résultat de l'expression des gènes chez *Phaseolus vulgaris*

5.3.2. Le résultat de l'expression des gènes chez *Cicer arietinum*

5.3.3. Le résultat de l'expression des gènes chez *Lens culinaris*

5.3.4. La discussion

5.3.5. Le résultat du séquençage du gène mARC

5.3.6. Le résultat du séquençage du gène XDH1

5.4. Conclusion

5.1. Introduction

Les déficiences en nutrition minérale et la salinité constituent une limitation majeure de la croissance des plantes cultivées en sols dans le monde (Maathuis *et al.*, 2003; Tester and Davenport, 2003). La tolérance à la salinité est un caractère multigénique, et qui implique un complexe de réponses au niveau métabolique, cellulaire, moléculaire, physiologique et sur toute la plante (Das *et al.*, 2015)

L'objectif de cette partie est d'étudier les changements qui se passent dans l'expression des gènes de la nitrate réductase (NIA1), la sulfite oxydase (SO), la xanthine déshydrogénase (XDH1), l'aldéhyde oxydase (AAO3), la sulfurase du molybdène cofacteur ABA3/LOS5, et la molybdoenzyme récemment découverte, appelée le complexe mitochondrial de réduction d'amidoximes (mARC) chez les trois espèces de la famille des fabacées ; *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., et *Lens culinaris* M. face au stress salin et à la présence du molybdène et de l'azote.

Quantifier le niveau d'expression des gènes est un outil très important pour comprendre leur réseau complexe de régulation (Dekkers *et al.*, 2012).

L'utilisation de gènes de références instables ou invalides peut avoir un impact important sur les résultats obtenus et peut conduire à des conclusions erronées. Les gènes de références (housekeeping genes (HKGs)) les plus utilisés sont l'actine, la tubuline, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et l'ubiquitine (Dekkers *et al.*, 2012).

Dans notre étude nous avons essayé la tubuline d'abord qui n'a pas donné de résultats concluants car le gène n'était pas stable dans les différents traitements et donc nous avons utilisé l'actine qui était stable.

5.2. Matériels et Méthodes

5.2.1. Les conditions de développement des plantes

Les graines de *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L. and *Lens culinaris* M. ont été semés dans des pots dans les mêmes conditions de développement citées dans le chapitre 2. Après deux semaines, les plantules sont soumises aux différents traitements pendant 4 semaines : 6g/l NaCl, 0,2ppm Mo sous forme de molybdate d'ammonium qui est une concentration optimale (Bouزيد et Rahmoune, 2012) et 0,2g/l N sous forme de nitrate de potassium qui ont été ajoutés dans l'eau d'irrigation.

Les traitements correspondent à :

T1: témoin.

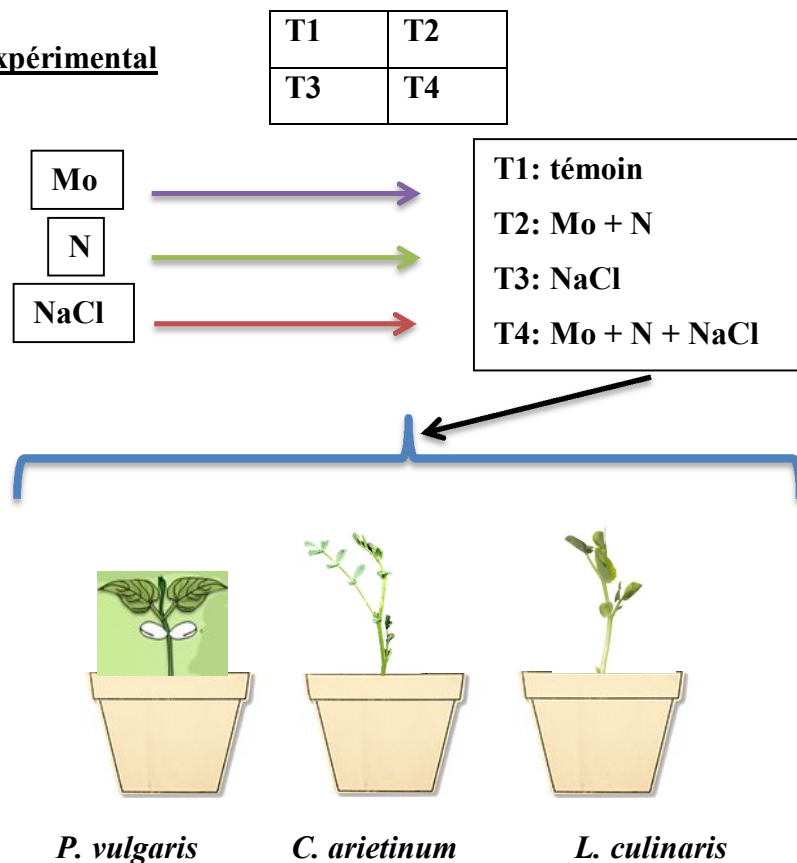
T2: molybdène et azote ajoutés à l'eau d'irrigation.

T3: NaCl ajouté à l'eau d'irrigation.

T4: NaCl, molybdène et azote ajoutés à l'eau d'irrigation.

(3 répétitions pour chaque traitement)

Le dispositif expérimental



5.2.2. Isolement ou isolation et purification de ARN

En utilisant le kit nucleospin RNA plant de Macherey-Nagel, 100mg de matériel végétal +350µl RA1+3,5µl Mercaptoéthanol, bien vortexer, transférer tout le volume dans les colonnes nucleospin avec l'anneau rose avec un microtube de collecte 2ml, centrifugation pendant 1min à 12000g, transférer le filtrat dans de nouveaux microtubes stérile de 1,5ml.

Ajouter 350µl éthanol à 70% (avec DEPC H₂O), et transférer ce volume du lysat dans de nouvelles colonnes nucleospin avec l'anneau bleu, centrifugation pendant 30s à 12000 g. Jeter le filtrat et mettre de nouveaux microtubes de collecte et on ajoute 350µl MDB directement sur la membrane, centrifugation pendant 1min à 11000g et jeter le filtrat.

Ajouter 100µl rDNase directement sur la membrane, incubation à température ambiante pendant 15min, puis procéder à une série de lavage et rinçage :

Ajouter 200µl RAW2 et centrifugation pendant 30s à 11000g et mettre de nouveaux microtube de collecte de 2ml.

Ajouter 600µl RA3 et centrifugation pendant 30s à 11000g, jeter le filtrat et garder le même microtube de collecte.

Ajouter 250µl RA3 et centrifugation pendant 2min à 11000g, mettre la colonne dans un nouveau microtube stérile de 1,5ml et ajouter 30µl de H₂O du kit.

Incubation pendant 5min à température ambiante puis centrifugation pendant 1min à 11000g. Ajouter 30µl de H₂O du kit et centrifugation pendant 1min à 11000g, et là, l'ARN est élué dans ce microtube qui doit être gardé dans la glace.

5.2.3. Préparation de la réaction de la transcriptase reverse

20 µl de ARN purifié + 480µl H₂O pour mesurer la concentration de ARN et vérifier le rapport saccharose - ARN- protéine qui doit être 1-2-1.

Nous avons utilisé le kit AMV Reverse Transcriptase de Promega.

On prend le volume qu'il faut pour chaque espèce qui correspond à 60ng/µl de ARN de chaque traitement et chaque espèce, puis le reste est complété avec DEPC H₂O. Le reste de ARN est stocké à -80°C.

La dénaturation se fait en incubant les microtubes à 70°C pendant 5min puis les remettre directement dans la glace et ajouter 10µl du mélange suivant:

- 4µl de tampon AMV ou (MMLV)
- 4µl dNTP (10mM)
- 0,5µl inhibiteur de RNases
- 0,5µl poly anchor primer (100pmol/ml)
- 1µl AMV ou MMLV reverse transcriptase (10U/ml)

5.2.4. La PCR transcriptase inverse

Nous avons utilisé le kit de GoTaq® PCR Core Systems de promega. On prépare un mélange de 25µl dans les microtubes de 100µl pour PCR

On a commencé d'abord par mettre au point la température de l'hybridation entre 50°C et 60°C.

On prépare toujours un mélange avec des volumes trop petits de l'ordre du microlitre:

- 14µl H₂O stérile
- 5µl tampon de réaction (se trouve avec le kit)
- 2µl un mélange de dNTP (10mM , 2,5mM chaque nucléotide)
- 0,25µl amorce 1 (sens)
- 0,25µl amorce 2 (anti-sens)
- 3µl la réaction de la transcriptase inverse ADNc pour les 3espèces *Phaseolus vulgaris*, *Cicer arietinum* et *Lens culinaris* traitées avec les différents traitements.
- 0,5µl de la taq polymérase

Nous avons testé plusieurs températures d'hybridation: 55°C- 57°C-58°C-60°C, ainsi que pour le nombre de cycle: 30 et 33, et finalement nous avons opté pour 60°C et 33 cycles.

Le programme de la PCR : 5min: 95°C, {1min: 94°C, 1min: 60°C température d'hybridation, 1min: 72°C} 33cycles, 7min: 72°C et arrêté à 4°C.

Nous avons cherché les séquences nucléotidiques des gènes suivants : mARC, l'actine, XDH1, AAO3, NIA1, SO et ABA3/ LOS5 sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), en utilisant les séquences polypeptidiques de l'espèce *Arabidopsis thaliana*, nous avons trouvé ses séquences que chez le haricot et le pois chiche mais pas pour la lentille, et donc nous avons essayé d'utiliser les amorces des gènes des deux espèces précédentes pour la lentille.

Après la fin de la RT-PCR (2h) on prépare un gel de 1,5g d'agarose: 1.5g agarose dans 100 ml TAE qu'on chauffe dans un micro-onde puis on ajoute 1,5µl de bromure d'éthidium.

On verse le gel dans la cuve sous la hotte et on laisse polymériser pendant 30 min et après on pose le gel dans la cuve d'électrophorèse à 100volt pendant 25min. les, photos sont produites par le logiciel intas science imaging GDS.

Nous avons utilisé un marqueur de taille de ADN, et les bandes de gènes qui nous intéressent (ceux qui correspondent à 500pb ; la taille du fragment du gène utilisé) chez la lentille ont subi une purification et un clonage dans *E.coli* DHα5 ainsi qu'un séquençage.

5.2.5. La purification

Extraction et Purification de l'ADN d'intérêt à partir d'un gel d'agarose ; en utilisant le kit « PCR clean up Gel extraction »

On coupe avec un cutter, les bandes sur le gel, qui représentent notre gène d'intérêt, et on conserve dans des microtubes à -20°C.

On les pèse et on met 3fois le volume de NT1 (pour chaque 100mg on ajoute 300µl de NT1)

On ajoute 12µl de la matrice de silice, (bien vortexer (mélanger au vortex) le pilulier de la matrice avant utilisation).

Incubation à 50°C pendant 10min et vortexer chaque 2 min jusqu'à ce que l'agarose soit complètement fondu. Centrifugation à 10000g pendant 45s, jeter le surnageant.

Série de ou rinçage : 1^{er} rinçage : 500µl de tampon NT2, vortexer brièvement puis centrifugation à 10000g pendant 45s et jeter le surnageant, 2^{ème} rinçage : 500µl de tampon NT3, vortexer brièvement puis centrifugation à 10000g pendant 45s et jeter le surnageant, 3^{ème} rinçage : 500µl de tampon NT3, vortexer brièvement puis centrifugation à 10000g pendant 45s et jeter le surnageant.

Centrifugation à 10000g pendant 10s et jeter tout liquide qui se trouve dans le culot, et laisser sécher à l'air libre en laissant ouverts les microtubes sous une hotte stérile pendant 10 min à température ambiante

L'élution: on ajoute 30µl du tampon d'élution NE (généralement on ajoute 25µl à 50µl)

Incubation à température ambiante pendant 15 min et taper sur le fond du microtube chaque 2min. Centrifugation à 10000g pendant 1min, et là on prend le surnageant sans aucun culot le mettre dans un nouveau microtube stérile et il est supposé contenir ADN insert

5.2.6. La ligation

En utilisant le kit de Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning.

Le volume final du mélange ne doit pas dépasser 20µl. Le tampon de réaction est deux fois concentré donc on prend la moitié du volume totale, donc :

Le tampon de réaction : 10µl, ADN insert : 8,5µl, le plasmide PJET1.2 : 0,5µl, T4 ADN ligase : 1µl.

Centrifugation à 10000g pendant 5s, incubation à 22°C pendant 30min. Pendant ce temps d'incubation on vérifie notre ADN insert sur un gel d'agarose de 1,5% (On prend un volume moyen de 10µl de ADN insert)

5.2.7. La transformation

On utilise des aliquotes de 100µl de la bactérie compétente *E.coli* DH5α.

On transfère le volume total de la ligation (20µl) dans les microtubes de *E.coli* DH5α.

Incubation pendant 30min dans la glace. Traitement avec la chaleur pendant 1min à 42°C, et on remet dans la glace pendant 3min, ajouter 800µl de milieu de culture liquide LB près du bec Bunsen. On met les microtubes dans le bloc chauffant en mouvement à 37°C pendant 1h.

Pendant ce temps on prépare les milieux de culture LB avec agarose en leur ajoutant de l'ampicilline (400µl dans 400ml de milieu) et on les verse dans les boîtes de pétri sous la hotte à flux laminaire.

La croissance

Sous la hotte et près du bec Bunsen on prépare 3 tubes à hémolyse stériles pour chaque boîte de Petri avec 5ml de milieu de culture LB avec l'antibiotique Ampicilline.

On reprend les boîtes de Petri qui ont passé 20h dans l'incubateur, et près du bec Bunsen sur la paillasse on prend avec une micropipette une colonie unique et séparée et la plonger dans le tube à hémolyse, et donc on prend 3, on remet les tubes dans l'incubateur à 37°C pour une nuit (max 20h)

5.2.8. Isolement du plasmide et purification de ADN insert de *E.coli*

En utilisant le kit nucleospin plasmid DNA purification p16 (Isolation of High copy plasmid DNA from *E.coli*).

La collecte des cellules de *E.coli*: On remplit des microtubes de 1,5ml à partir de culture de *E.coli* qui se trouvent dans les tubes à hémolyse et on les centrifuge à 11000g pendant 30s, on jette le surnageant et on répète cette opération sur le même microtube jusqu'à la fin des 5ml de la suspension cellulaire. On retire tout liquide qui pourrait rester dans le microtube avec une micropipette.

La lyse des cellules : On ajoute 250µl de tampon A1 (avec RNase) vortexer pour homogénéiser complètement, ajouter 250µl de tampon A2 avec un mouvement de haut en bas doucement et attendre 5min sur la paillasse, ajouter 300µl de tampon avec le même mouvement jusqu'à ce que la suspension devient blanche.

Clarification du lysat : Centrifugation à 11000g pendant 5min.

Pipeter 750µl du surnageant dans la colonne blanche du nucleospin avec le microtube de collecte de 2ml et centrifugation à 11000g pendant 1min.

Centrifuger encore une fois et jeter le filtrat dans la bouteille spéciale pour suspension de *E.coli* et on garde le même microtube de collecte.

Rinçage de la membrane en silice : Ajouter 500µl de tampon AW et centrifugation à 11000g pendant 1min, jeter le filtrat et garder le même microtube de collecte.

Ajouter 600µl de tampon A4 et centrifugation à 11000g pendant 1min, jeter le filtrat et garder le même microtube de collecte.

Séchage de la membrane en silice en la centrifugeant à 11000g pendant 2min.

Elution de ADN : Placer la colonne dans un nouveau microtube de 1,5ml stérile , ajouter 50µl du tampon AE , incubation à température ambiante pendant 10min et après centrifugation à 11000g pendant 1min, enlever la colonne et mettre le microtube qui est sensé contenir ADN dans le bloque chauffant à 65°C pendant 10min cela détruit les ADNase. On doit vérifier ADN insert sur un gel d'agarose de 1,5%.

5.2.9. La digestion

En utilisant le kit Thermo Scientific FastDigest BglII

Le volume total doit être 10µl : H₂O dd : 3,5µl, FD tampon de digestion: 1µl, Enzyme BGLII: 0,5µl, ADN élué: 5µl. Incubation à 37°C pendant 30min et là, on prépare une électrophorèse sur gel d'agarose de 1,5%, et on envoi ADN en question pour qu'il soit séquencé par les services de Eurofins Genomics.

5.2.10. L'analyse statistique:

Nous avons utilisé le logiciel imageJ 1.48v pour quantifier l'intensité des bandes ADN et pour pouvoir estimer la différence entre les différents traitements et espèces, nous avons procédé à une analyse ANOVA à un et à deux facteurs en utilisant le logiciel xlstat 2016. Les moyennes sont comparées selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1999), basée sur la plus petite valeur significative.

L'analyse de composante principale est réalisée à l'aide du logiciel Excelstat 2016.

5.2.11. La liste des amorces utilisées:

Tableau 15: Les séquences des amorces utilisées chez *Phaseolus vulgaris* et *Lens culinaris*

Protéines	Gènes	Le numéro de l'accèsion des Nucléotides	Les séquences des amorces
Actine	Actine	KF569629	Sens:5'-AGGTTATTCCTTCACTACCACCGC-3' Reverse:5'-AGCCTCATCATACTCAGACTTTGC-3'
mARC	mARC1	XM_007138795	Sens:5'-CACTTGTTGAACACTATCAACCTACCAAC-3' Anti-sens: 5'-CCTTGTTTTTCATAAGAGTCTCAGTTGGC-3'
mARC	mARC2	XM_007138794	Sens: 5'-CTTGAAAACCTGGGAACCAACTCAAGAC-3' Anti-sens: 5'-CATGAGAATTTTCATTTGTTTCTGGC-3'
AO	AAO3	XM_007141542	Sens:5'-TGC CTT CAA TAT GGA GTA AGT TGG C-3' Anti-sens:5'-TAA GTT CAC AGC TCG CAG GTT TGC C-3'
XDH	XDH1	XM_007150309	Sens:5'-CGA ATA GAT CTT TCT GCC CAT GG-3' Anti-sens:5'-TCC GAA TTC TCT CTG GAG TTG C-3'
NR	NIA1	XM_007141046	Sens:5'-CCT ACA CTC CAA CAA GTA GCG-3' Anti-sens:5'-AGA ATC GCT TGA AGC TTC TGG -3'
SO	SO	XM_007151463	Sens:5'-GTG TCA TTG GAG CTC GAT CTG-3' Anti-sens:5'-GGT TTG AGT GAC TTG CTT GGA C-3'
ABA3	ABA3 /LOS5	XM_007133810	Sens:5'-AGC AAT GGT CTG ACA CAT GAT CGC-3' Anti-sens:5'-TCG CTA TTG CTC TTC CAG ATA TGC C-3'

Tableau 16: Les séquences des amorces utilisées chez *Cicer arietinum* et *Lens culinaris*

Protéines	Gènes	Le numéro de l'accèsion des Nucléotides	Les séquences des amorces
Actine	Actine	XM_004497837	Sens:5'-AACTGGTATTGTTCTGGATTCCGG-3' Anti-sens:5'-TTCATGCTACTTGGTGCCAATGC-3'
mARC	mARC	XM_004487841	Sens:5'-GTAGACCCTGATTATGTTGAGGAACAG-3' Anti-sens:5'-TCAAGCAGCTGCTTCTGCTGCAGAAG-3'
AO	AAO3	XM_004491092	Sens:5'-TAC ATA CCT AGC AAT AAC TCG ATG-3' Anti-sens:5'-CAG GTC CTT CTT CGT TGC TCC-3'
XDH	XDH1	XM_004486904	Sens:5'-TGC TAT GCA GAG CGA ATA GAC C-3' Anti-sens:5'-CAA CTC TTG CAG CAC TGA TGG C-3'
NR	NIA1	XM_004513774	Sens:5'-CTT ATA CTC CAA CGA GTA GTG TCG-3' Anti-sens:5'-CAA AGC CAA AGT ATC CTG ACT TGC-3'
SO	SO	XM_004489554	Sens:5'-GGT CTG TTA AAT GGC TGG AAG C-3' Anti-sens:5'-CTT GAA CTT GGA CTC GAT GCC-3'
ABA3	ABA3/ LOS5	XM_004506406	Sens:5'-AGT TAC AGC AAC GAG ACC AAT GC-3' Anti-sens:5'-AGC CAA GAA TCA CCT TGT TGC TGC-3'

5.3. Résultats et Discussion

5.3.1. Le résultat de l'expression des gènes chez *Phaseolus vulgaris*

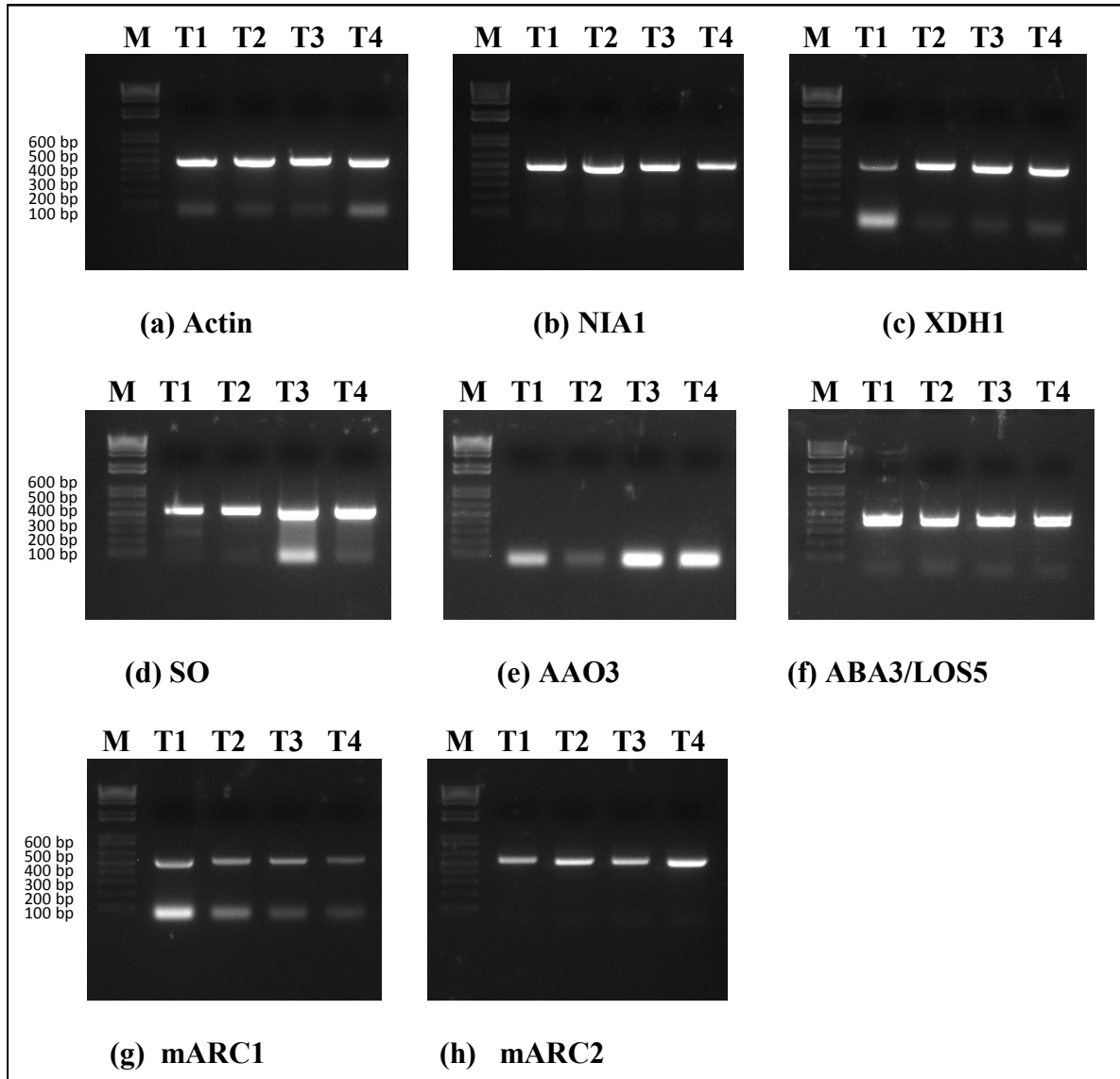


Figure 39: Le profil d'électrophorèse de RT-PCR de l'expression des gènes sur gel d'agarose chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) (M : marqueur)

Tableau 17: L'intensité des bandes d'expression des gènes chez *Phaseolus vulgaris*

	NIA1	XDH1	SO	ABA3/LOS5	mARC1	mARC2
T1	0,97 b ± 0,010	0,39 d ± 0,013	0,67 d ± 0,066	1,13 a ± 0,008	1,031 a ± 0,008	0,678 c ± 0,023
T2	1,09 a ± 0,013	0,88 c ± 0,016	0,72 c ± 0,012	0,93b ± 0,008	0,739 b ± 0,006	0,820 b ± 0,012
T3	0,93 c ± 0,026	0,96 b ± 0,045	1,04 b ± 0,035	0,87 c ± 0,008	0,569 c ± 0,010	0,651 d ± 0,005
T4	0,80 d ± 0,018	1,06 a ± 0,033	1,09 a ± 0,015	0,86 c ± 0,008	0,350 d ± 0,013	1,021 a ± 0,018

5.3.2. Le résultat de l'expression des gènes chez *Cicer arietinum*

Tableau 18: L'intensité des bandes d'expression des gènes chez *Cicer arietinum*

	NIA1	XDH1	SO	AAO3	mARC
T1	0,95 b ± 0,006	0,85 b ± 0,028	1,028 a ± 0,022	0,351 d ± 0,023	0,561 c ± 0,018
T2	0,98 a ± 0,016	0,93 a ± 0,022	0,865 b ± 0,018	0,900 a ± 0,054	0,471 d ± 0,025
T3	0,918 c ± 0,033	0,778 c ± 0,034	0,858b ± 0,018	0,661 b ± 0,014	0,759 b ± 0,015
T4	0,838 d ± 0,024	0,762 c ± 0,009	0,898 b ± 0,037	0,462 c ± 0,052	1,088 a ± 0,023

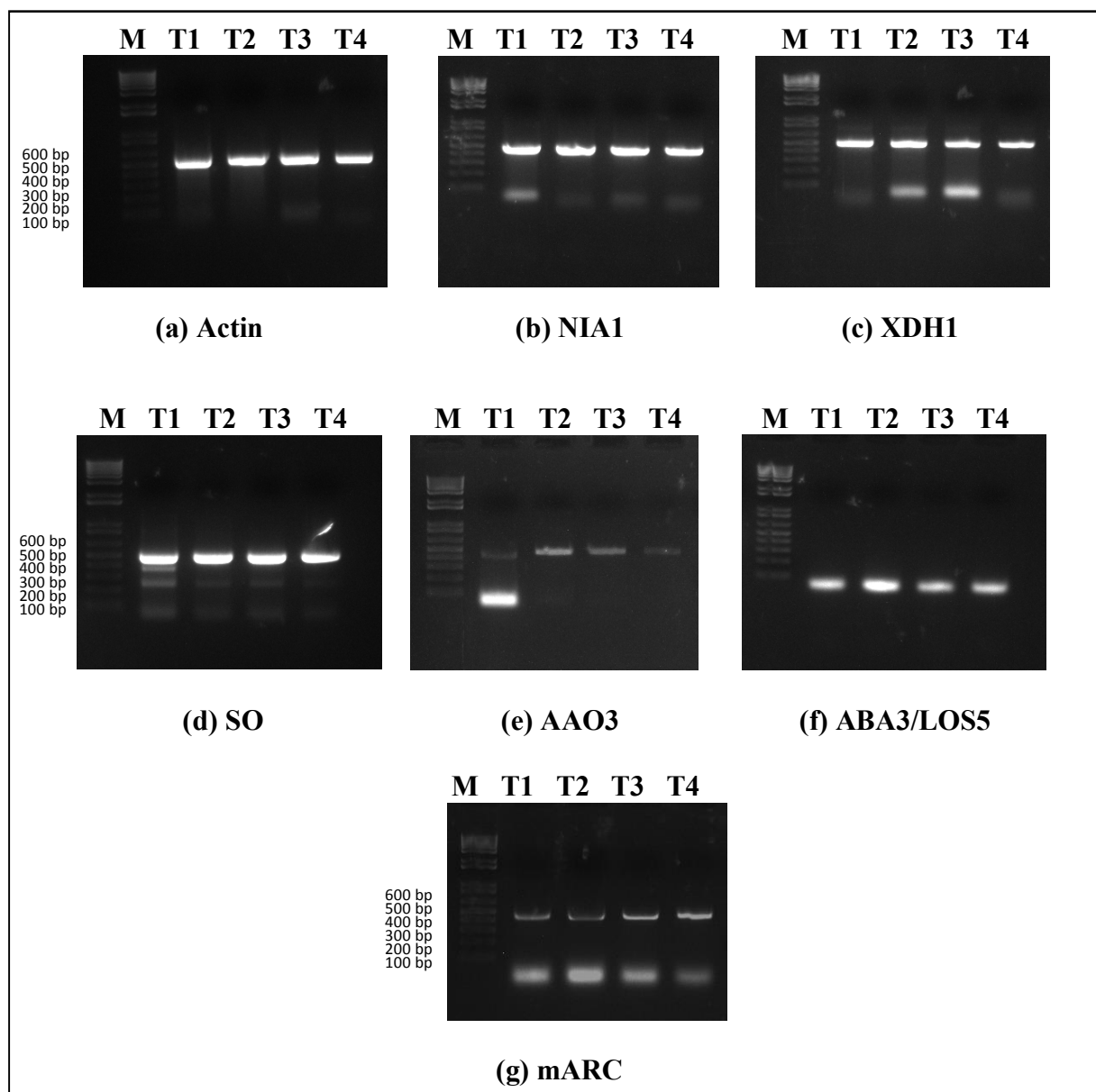


Figure 40: Le profil d'électrophorèse de RT-PCR de l'expression des gènes sur un gel d'agarose chez le pois chiche (*Cicer arietinum*) (M : marqueur)

5.3.3. Le résultat de l'expression des gènes chez *Lens culinaris*

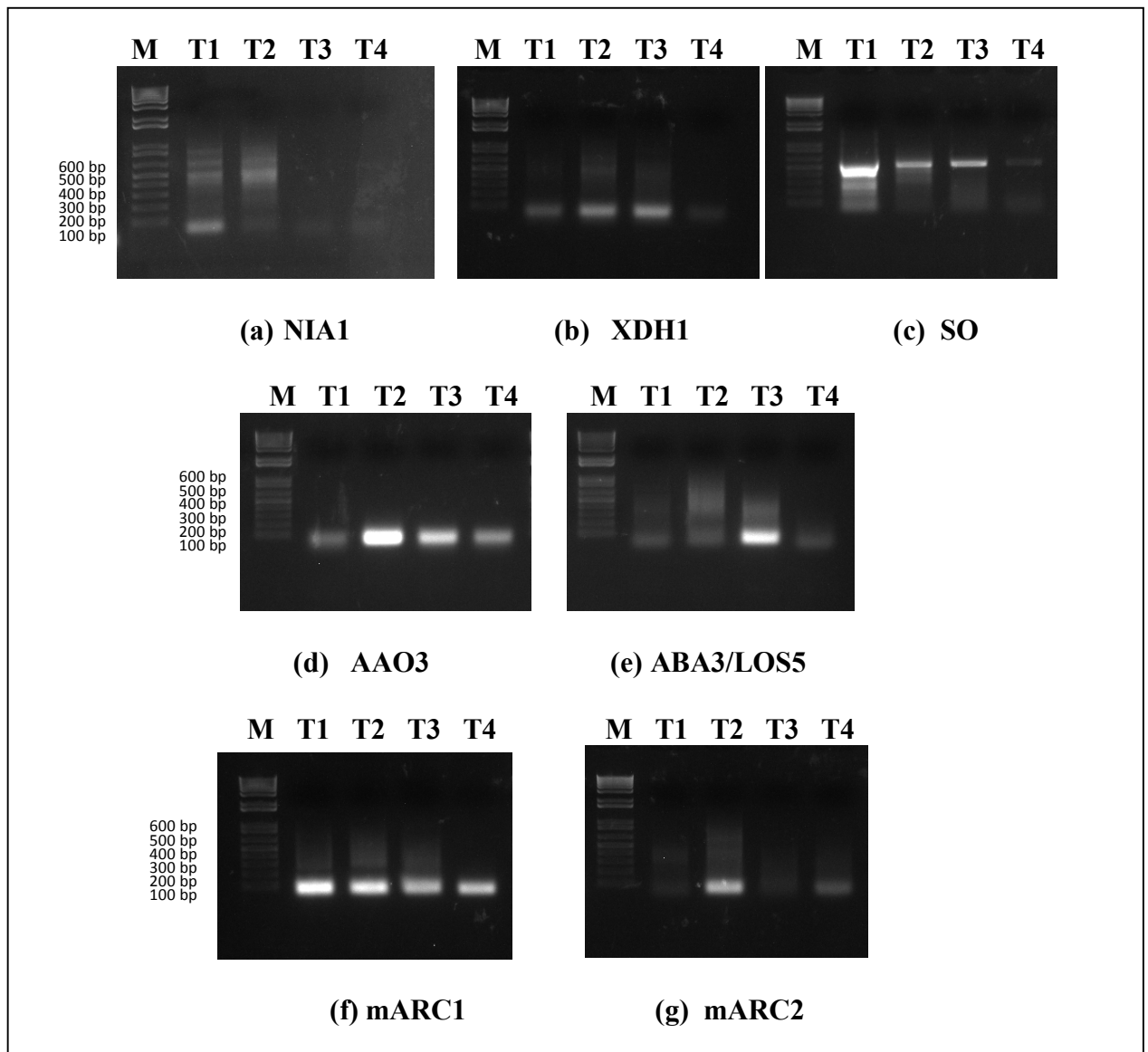


Figure 41: Le profil d'électrophorèse de RT-PCR de l'expression des gènes sur un gel d'agarose chez la lentille (*Lens culinaris*) en utilisant les amorces du haricot

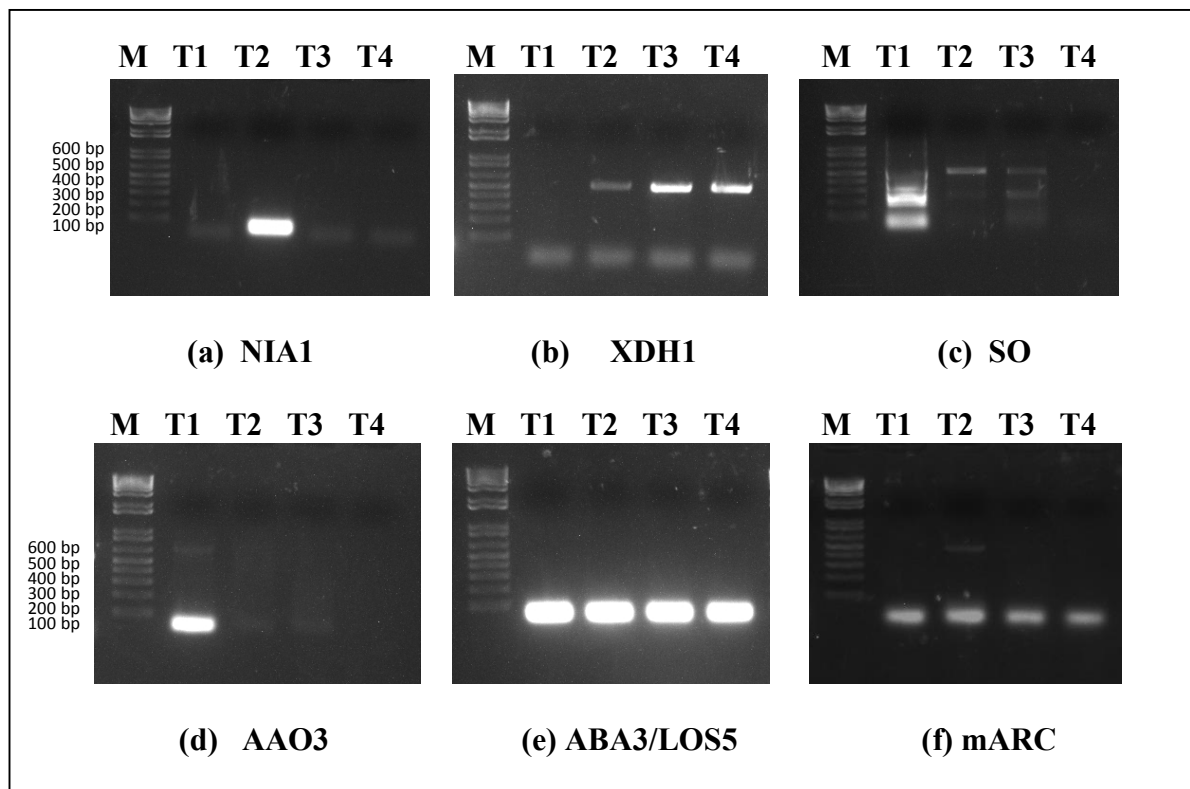


Figure 42: Le profil d'électrophorèse de RT-PCR de l'expression des gènes sur un gel d'agarose chez la lentille (*Lens culinaris*) en utilisant les amorces du pois chiche

5.3.4. Discussion

Deux différentes familles d'enzymes de molybdène sont connues chez les eucaryotes (Hille et *al.*, 2011): (i) la famille de la sulfite oxydase, à laquelle la NR et mARC appartiennent et (ii) la famille de la xanthine oxydase, à laquelle l'aldéhyde oxydase et la xanthine déshydrogénase appartiennent aussi.

Contrairement à la famille de la sulfite oxydase, les enzymes de la famille de la xanthine oxydase exigent une étape finale de maturation avant ou après l'insertion du Moco. En plus des soufres dithiolènes de la ptérine et deux groupements oxo, l'atome de molybdène du Moco a besoin du complément d'un soufre inorganique terminal pour fournir l'activité enzymatique à ces enzymes (Wahl et *al.*, 1984). Cette étape finale est catalysée par la protéine la sulfurase du Molybdène cofacteur (ABA3) (Mendel, 2013)

Les molybdoenzymes chez les plantes sont des enzymes clés dans l'assimilation du nitrate, le métabolisme de la purine, la biosynthèse des hormones, ainsi que dans la détoxification du sulfite. Ils sont impliqués dans des processus d'acclimatation de stress et, donc, l'élucidation des mécanismes de leurs réponses aux conditions de stress environnementales est importante pour l'amélioration de la tolérance des plantes au stress. (Zdunek-Zastocka and Lips, 2003)

Le stress osmotique résultant de la salinité élevée ou du déficit hydrique induit l'expression de nombreux gènes sensibles au stress chez les plantes (Xiong et *al.*, 2002).

Les figures 39, 40, 41 et 42 montrent l'expression des gènes des molybdoenzymes sous le stress salin et en présence de molybdène et l'azote dans l'eau d'irrigation, cette expression diffère entre les différents traitements et espèces.

L'aldéhyde oxydase (AO) est dérivée de XDH par la duplication génique et la néofonctionnalisation (Rodríguez-Trelles et *al.*, 2003) et donc partage des similarités structurales et catalytiques avec XDH. Contrairement à XDH, la protéine AO préfère oxyder les aldéhydes que l'acide carboxylique. (Bittner, 2014)

Dans la figure 39, on remarque que le gène AAO3 ne montre pas d'expression chez le haricot, mais chez le pois chiche nous pouvons observer une expression intense quand le molybdène et l'azote sont ajoutés à l'eau d'irrigation (tableau18).

L'isoforme la plus importante de l'aldéhyde oxydase est AAO3, qui catalyse l'oxydation de l'aldéhyde abscissique en acide abscissique (ABA) dans la dernière étape de synthèse de ABA dans le cytosol. En raison de la fonction de ABA dans pas mal d'aspects de la croissance et le développement des plantes et dans l'adaptation aux stress abiotiques variés, les plantes déficientes en AAO3 avec un taux réduit de ABA, sont caractérisées par un niveau important de transpiration, une tolérance au stress réduite (Seo and Koshiba, 2011).

Le gène XDH1 est bien exprimé chez le haricot en condition de stress salin et avec le molybdène et l'azote ajoutés, (tableau 17) et la bande la plus faible est représentée par les plantes témoins, mais chez le pois chiche l'expression la plus importante de ce gène est observée chez les plantes qui ont reçu le molybdène et l'azote dans leur eau d'irrigation sans le NaCl (tableau18).

L'activité XDH a été augmentée par la salinité et l'ammonium dans les nodules des racines du maïs (Barabás *et al.* 2000). L'augmentation de XDH dans des conditions semblables a été précédemment rapportée dans le ray-grass, où il a une corrélation avec un taux élevé d'uréides dans des tissus végétaux (Sagi *et al.* 1998), en produisant les espèces réactives de l'oxygène générées lors d'un stress salin (Hernandez *et al.*, 1995)

L'analyse statistique dans le tableau 17 montre que le fait d'ajouter Mo et N dans l'eau d'irrigation pour les plantes de haricot mène à une forte expression forte du gène NIA1, et elle diminue quand les plantes sont exposées au stress salin, la nitrate réductase est une enzyme qui est sensible à la salinité, la même chose est observée chez les plantes de pois chiche (tableau 18).

On note une corrélation positive importante entre l'expression de ce gène et la concentration des protéines totales chez le haricot (0,971), alors qu'il y a une forte corrélation négative entre l'expression des gènes NIA1 et mARC chez le pois chiche (0,993).

Les rapports sur la sensibilité de l'activité de NR à la salinité chez les plantes supérieures sont contradictoires ; une augmentation de ANR a été observé après une application d'une concentration très élevée de NaCl, dans les racines et feuilles du ray-grass (Sagi et *al.* 1997).

Dans certains cas, les conditions de salinité réduisent l'activité de NR non seulement dans des feuilles mais aussi dans des racines. Une diminution significative de NR sous l'effet de la salinité a été observée dans les racine du riz (Richharia et *al.*, 1997), l'orge (Aslam et *al.* 1984, Omarov et *al.*, 1998), la luzerne (Khan et *al.*, 1995) et chez quelques légumineuses cultivées (Khan 1994, Zdunek 2002). L'inhibition de l'assimilation du NO_3^- par les racines (Aslam et *al.*, 1984) et la diminution dans le flux du nitrate vers la partie aérienne (Gao et *al.*, 1996) peuvent être une raison de la réduction de l'activité de NR dans les racines et les feuilles non seulement sous l'effet du NaCl, mais aussi en conditions de stress hydrique. (Zdunek-Zastocka and Lips, 2003)

Le gène SO est fortement exprimé en condition de stress salin et en présence de Mo et N chez le haricot, cette expression diminue avec la diminution de la salinité et la valeur de l'intensité la plus faible est enregistrée pour les plantes témoins (tableau17). Pour le pois chiche, on observe une importante expression de ce gène pour les plantes témoins, mais pour les autres traitements il n y a pas de différence significative entre les moyennes (tableau18).

L'enzyme SO catalyse l'oxydation de sulfite en sulfate, la dernière étape dans la dégradation des acides aminés soufrés. (Mendel et Bittner, 2006), SO est une enzyme du peroxyosome (Nowak et *al.*, 2004), qui consiste exclusivement en un domaine avec une liaison molybdène cofacteur nécessaire à l'oxydation de sulfite en sulfate (Bittner, 2014). Comme le sulfite est nucléophile fort qui peut réagir avec une large variété de composants

cellulaires, il a été suggéré que SO est nécessaire pour éliminer l'excès sulfite de la cellule. (Bittner et Mendel, 2010). On note une corrélation positive importante entre l'expression du gène SO et la concentration des protéines totales chez le pois chiche (0,996)

La sulfurase du molybdène cofacteur ABA3 est une protéine à deux domaines homodimères (Bittner et *al.*, 2001), qui active les enzymes AO et XDH (Bittner, 2014)

Pour le haricot, l'expression du gène ABA3/LOS5 est affectée par la salinité, comme nous notons sur le tableau 17, l'intensité des bandes la plus importante est observée chez les plantes témoins, cette expression est affectée par la salinité et pas stimulée par l'ajout de Mo ou N. Chez le pois chiche on ne remarque aucune bande, donc nous n'avons pas réussi à isoler ce gène, peut-être qu'il fallait choisir une autre paire d'amorces.

La sulfurase du molybdène cofacteur catalyse la génération de la forme sulfatée (sulfatation) du Moco, un cofacteur nécessaire pour l'aldéhyde oxydase qui a une fonction dans la dernière étape de biosynthèse de ABA des plantes. Le gène ABA3/ LOS5 est exprimé de façon ubiquitaire dans différentes parties de la plante, et le niveau d'expression augmente en réponse à un traitement de ABA, stress hydrique ou salin. (Xion et *al.*, 2001)

Après une exposition de l'espèce *Arabidopsis thaliana* à une déshydratation de 4h, un taux accru de ARNm de ABA3 a été observé dans les feuilles ainsi qu'une activité importante de l'aldéhyde oxydase. (Bittner et *al.*, 2001)

Comme chez les mammifères, le génome des plantes code deux isoformes du gène mARC. Le rôle physiologique de la protéine mARC reste encore énigmatique, même si des études antérieures chez *Chlamydomonas* et sur des protéines humaines recombinantes suggèrent une fonction dans la détoxification des bases nucléiques N-hydroxylées (Chamizo-Ampudia et *al.*, 2011; Krompholz et *al.*, 2012)

Il y a une différence dans l'expression entre les deux isoformes du gène chez le haricot, un travail précédant sur le gène mARC indique que selon l'espèce, généralement l'une des isoformes est exprimée de manière prédominante (Plitzko et *al.*, 2013), comme nous

pouvons le voir (figure 39) les deux isoformes mARC1 et mARC2 s'expriment différemment, la valeur la plus élevée de l'intensité de la bande de mARC1 est 1,031 représentée par les plantes témoins, ce qui signifie que le molybdène ou l'azote ajoutés n'améliorent pas l'expression de mARC1 et le stress salin peut mener à une diminution de son expression, le contraire se passe avec mARC2; où nous pouvons observer que la valeur la plus importante est 1,021 (tableau 17) enregistré pour le haricot qui est soumis à un stress salin et en présence de Mo et N, en comparaison à la valeur la plus basse qui est représentée par les plantes témoins.

On remarque qu'il y a une corrélation négative entre l'expression du gène mARC et l'activité de XDH chez le pois chiche (-0,944) et une importante corrélation positive entre l'expression du gène mARC1 et l'activité du Moco et la NR avec (0,985) et (0,964) respectivement.

Pour le pois chiche, la recherche sur NCBI nous mène à un seul mARC, son expression est presque la même que mARC2 chez le haricot qui montre une intensité importante dans T4 (figure 40) avec la valeur de 1,088 (tableau 18), il semble que la protéine mARC chez le pois chiche et la protéine mARC2 chez le haricot peuvent avoir un rôle dans le mécanisme d'adaptation au stress salin.

Comme nous pouvons voir sur la figure 41 et 42 dans la lentille nous avons réussi à isoler juste SO, XDH1 et mARC à partir d'amorce du pois chiche ce qui nous a poussé à les cloner et les séquencer et au cours de ce travail nous avons réussi à séquencer XDH1 et mARC.

5.3.5. Le résultat du séquençage du gène mARC

```
GTGGCTCGAGTTTTTCAACAAGATTAGACCCTGATTATGTTGAGGAACAGCAGATGACCTTGTT
CAGTGATGGTTATCCATTCTTACTTGTATCTCAGGATTCAGTGGATGCACTAAACAAGCTTCTAG
ACGAATCCATATCTATGAATCGTTTCAGACCCAATATCCTTGTGGAAGGTTGTGAAGCATATTCT
GAAGACTTGTGGAGAGATATCAAGATAAGCAGGTTTTTCATTTTCAGGGTGTCAAGCTGTGTGCC
GTTGTAAGGTGCCAACAAATCAATCAAGAGACAGCAATACATGGAAGTGAACCATATGAAACTC
TCACGAAAGTTCGGTCTGGCGAAGTCTTGAGACCAAATAAAAAAAAAACAAAAAAGATCTACT
TTGGTCAGAATGTTAGTGTGGAAGTGGAAAGGATTCTTCTGCTAAAGGGGATGGAAACGTGCTTAA
ACTGGGAGATCCTGTTTATGTTATCAAACATATTCTTCTGCAGCAGAAGCAGCTGCTTGAATCT
TTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTTATTCTCTC
AAGATTTTCAGGCTGTATATTAATAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCACCTCATCAGGAACC
GTTGTAGGTGGCGTGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAACACTACGAGCTAAATATTCAA
TATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTTGAACGAGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGA
AACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTTGAAGAAAGTTCAGGGTTAATAGCATCCA
TTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAACAAAAGACGTCT
```

Cette séquence a été comparée et alignée sur le site suivant :

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&BLAST_SPEC=blast2seqand

avec la séquence de 489 pb du pois chiche que nous avons utilisée; XM_004487841 (Cicer arietinum mitochondrial amidoxime reducing component 2-like LOC101506896, mRNA):

```
GTAGACCCTGATTATGTTGAGGAACAGCACCAGACCTTGTTCACTGATGGTTATCCGTTCTTACT
CATATCTCAAGAATCGTTGGATGCAGTAAACAAGCTTCTAGAGGAACCGATACCTATGAATCGT
TTCAGACCCAATATCCTTGTGGAAGGTTGTGAACATTTTCTGAAGACATATGGAGAGATATCA
AGATAAGCAGGTTTTTCATTTTCAGGGTGTCAAGCTGTGTTCCCGTTGTAAGGTACCAACAATAAA
CCAAGAGACAGCAATACCAGATGGATCTGAACCAACTGAAACTCTCATGAAAATTAGGTCTGG
CAAAGTCATAAGACCAAATGATAAAAACAAAAACAAGGTCTACTTTGGTCAGAATATAGTCTG
GAATTGGAGGGATTCTTCTGCTAAAGGGGATGGAAAAGTCTTAAAGTTGGAGATCCAGTTTAT
GTTACCAAAAAGTTATCTTCTGCAGCAGAAGCAGCTGCTTGA
```

Le résultat de l'alignement est :

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
599 bits(324)	1e-175	434/488(89%)	3/488(0%)	Plus/Plus
Query 25		TAGACCCTGATTATGTTGAGGAACAGCAGATGACCTTGTTCAGTGATGGTTATCCATTCT		84
Sbjct 2		TAGACCCTGATTATGTTGAGGAACAGCACCAGACCTTGTTCAGTGATGGTTATCCGTTCT		61
Query 85		TACTTGTATCTCAGGATTCAGTGGATGCAGTAAACAAGCTTCTAGACGAATCCATATCTA		144
Sbjct 62		TACTCATATCTCAAGAATCGTTGGATGCAGTAAACAAGCTTCTAGAGGAACCGATACCTA		121
Query 145		TGAATCGTTTCAGACCCAATATCCTTGTGAAAGGTTGTGAAGCATATCTGAAGACTTGT		204
Sbjct 122		TGAATCGTTTCAGACCCAATATCCTTGTGAAAGGTTGTGAACCATTTTCTGAAGACATAT		181
Query 205		GGAGAGATATCAAGATAAGCAGGTTTTTCATTTTCAGGGTGTCAAGCTGTGTGCCCGTTGTA		264
Sbjct 182		GGAGAGATATCAAGATAAGCAGGTTTTTCATTTTCAGGGTGTCAAGCTGTGTGCCCGTTGTA		241
Query 265		AGGTGCCAACAATCAATCAAGAGACAGCAATAC---ATGGAACTGAACCATATGAAACTC		321
Sbjct 242		AGGTACCAACAATAAACAAGAGACAGCAATACCAGATGGATCTGAACCAACTGAAACTC		301
Query 322		TCACGAAAGTTTCGGTCTGGCGAAGTCTTGAGACCAAATaaaaaaaaacaaaaaaaaGATCT		381
Sbjct 302		TCATGAAAATTAGGTCTGGCAAAGTCATAAGACCAAATGATAAAAAACAAAACAAGGTCT		361
Query 382		ACTTTGGTCAGAATGTAGTGTGGAACGGAAGGATTCTTCTGCTAAAGGGGATGGAAACG		441
Sbjct 362		ACTTTGGTCAGAATATAGTCTGGAATTGGAGGGATTCTTCTGCTAAAGGGGATGGAAAAG		421
Query 442		TGCTTAAACTGGGAGATCCTGTTTATGTTATCAAACATATCTTCTGCAGCAGAAGCAG		501
Sbjct 422		TCCTTAAAGTTGGAGATCCAGTTTATGTTACCAAAAAGTTATCTTCTGCAGCAGAAGCAG		481
Query 502		CTGCTTGA 509		
Sbjct 482		CTGCTTGA 489		

5.3.6. Le résultat du séquençage du gène XDH1

```
GTGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATTGCTATGCAGAGCGAATAGACCTTTCTGCCCATGGA
TTTTATATTACACCTGATATTGGCTTTGATTGGATCACGGGTAAAGGAAAACCTTTTAGG
TATTTCACTTACGGGGCTGCATTTGCCGAGGTTGAAATTGACACCTTGACTGGAGATTTT
CACACCAGGGTGGCAGACATAATTTTGGATCTCGGTTATTCTCTGAACCCAGCAATAGAT
GTTGGGCAGATCGAAGGAGCTTTTATTCAAGGTTTGGGCTGGGTTGCTTTAGAAGAACTT
AAATGGGGAGATGCAGCTCATAAATGGATCCCCCTCTGGGTGGCTTAACACTTGTGGACCC
GGAGCTTATAAAATTCCTTCTATAAATGACGTTCCCTTGAAATTTGATGTCTCACTTCTG
AAGGGCCATCCAAATGTAAAGGCAATCCATTCGCTCTAAAGCAGTTGGCGAGCCTCCGTTT
TTCTTAGCATCAGCTGTATTCTTTGCCATAAAGGATGCCATCAGTGCTGCAAGAGTTGAT
CTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGCTGCCATGGAAAATCGATGTTCTTCTTTT
ATTCTCTCAAGATTTTCAGGCTGTATATTAAGAACTTATATTAAGAACTATGCTAACCC
TCATCAGGAACCGTTGTAGGTGGCGGGGGTTTTCTTGGCAATCGACTCTCATGAAAAT
ACGAGCTAAATATTCAATATGTTCTCTTGACCAACTTTATTCTGCATTTTTTTTGAACG
AGGTTTAGAGCAAGCTTCAGGAACTGAGACAGGAATTTTATTAATAAATTTAAATTTGA
AGAAAGTTCAGGGTTAATAGCATCCATTTTTTGCTTTGCAAGTTCCTCAGCATTCTTAAC
AAA
```

Cette séquence a été comparée sur ce site, à celle de 514pb que nous avons utilisé
XM_004486904

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=MegaBlast&PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAM=S=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&DATABASE=n/a&QUERY=&SUBJECTS=

La séquence de 514pb du pois chiche XDH1 XM_004486904 (Cicer arietinum xanthine dehydrogenase 1-like (LOC101495267), mRNA) :

```
TGCTATGCAGAGCGAATAGACCTTTCTGCCCATGGTTTTTTTATTACACCTGATATTGGTTTTGA
TTGGACCACGGGTAAAGGAAACCCTTTTAGGTATTTACATATGGGGCTGCATTTGCTGA
GGTTGAAATTGACACCTTGACTGGAGATTTTCACACTAGGGTGGCAAATATATTTTTGGA
TCTCGGTTATTCTCTGAATCCAGCGATAGATGTTGGGCAGATCGAAGGAGCTTTTATTCA
AGGTTTGGGTTGGGCTGCTTTAGAAGAACTTAAATGGGGAGATGGAGCACATAAATGGAT
CCCCCTCTGGATGGCTTAACACTTGTGGACCTGGAGCTTATAAAATTCCTTCTATAAATGA
TGTTCCCTTGAAATTTAATGTCTCACTTCTTAAGGGCCATCCAAATGTAAAGGCAATCCA
TTCATCGAAAGCAGTTGGTGAGCCTCCATTTTTCTAGCATCAGCTGTATTCTTCGCCAT
CAAGGATGCCATCAGTGCTGCAAGAGTTG
```

Le résultat de l'alignement est:

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
784 bits(424)	0.0	484/514(94%)	0/514(0%)	Plus/Plus
Query 25	TGCTATGCAGAGCGAATAGACCTTTCTGCCCATGGATTTTATATTACACCTGATATTGGC			84
Sbjct 1	TGCTATGCAGAGCGAATAGACCTTTCTGCCCATGGTTTTTTTATTACACCTGATATTGGT			60
Query 85	TTTGATTGGATCACGGGTAAAGGAAAACCTTTTAGGTATTTCACTTACGGGGCTGCATTT			144
Sbjct 61	TTTGATTGGACCACGGGTAAAGGAAAACCTTTTAGGTATTTACATATGGGGCTGCATTT			120
Query 145	GCCGAGGTTGAAATTGACACCTTGACTGGAGATTTTCACACCAGGGTGGCAGACATAATT			204
Sbjct 121	GCTGAGGTTGAAATTGACACCTTGACTGGAGATTTTCACACTAGGGTGGCAAATATATTT			180
Query 205	TTGGATCTCGGTTATTCTCTGAACCCAGCAATAGATGTTGGGCAGATCGAAGGAGCTTTT			264
Sbjct 181	TTGGATCTCGGTTATTCTCTGAATCCAGCGATAGATGTTGGGCAGATCGAAGGAGCTTTT			240
Query 265	ATTCAAGGTTTGGGCTGGGTTGCTTTAGAAGAACTTAAATGGGGAGATGCAGCTCATAAA			324
Sbjct 241	ATTCAAGGTTTGGGTTGGGCTGCTTTAGAAGAACTTAAATGGGGAGATGGAGCACATAAA			300
Query 325	TGGATCCCCTCTGGGTGGCTTAACACTTGTGGACCCGGAGCTTATAAAATTCCTTCTATA			384
Sbjct 301	TGGATCCCCTCTGGATGGCTTAACACTTGTGGACCTGGAGCTTATAAAATTCCTTCTATA			360
Query 385	AATGACGTTCCCTTGAATTTGATGTCTCACTTCTGAAGGGCCATCCAAATGTAAAGGCA			444
Sbjct 361	AATGATGTTCCCTTGAATTTAATGTCTCACTTCTTAAGGGCCATCCAAATGTAAAGGCA			420
Query 445	ATCCATTCGTCTAAAGCAGTTGGCGAGCCTCCGTTTTTCTTAGCATCAGCTGTATTCTTT			504
Sbjct 421	ATCCATTCATCGAAAGCAGTTGGTGAGCCTCCATTTTCTTAGCATCAGCTGTATTCTTC			480
Query 505	GCCATAAAGGATGCCATCAGTGCTGCAAGAGTTG		538	
Sbjct 481	GCCATCAAGGATGCCATCAGTGCTGCAAGAGTTG		514	

5.4. Conclusion

Pour le haricot, l'expression des gènes de la sulfite oxydase et la xanthine déshydrogénase sont régulés sous le stress salin, ce qui prouve que ces deux enzymes possèdent un rôle dans l'adaptation au stress salin.

On peut dire que l'expression des gènes de l'aldéhyde oxydase et la xanthine déshydrogénase chez le pois chiche est amplifiée par le molybdène et l'azote.

L'expression du gène de la nitrate réductase est affectée par la salinité mais elle est plus importante chez le haricot que chez le pois chiche.

Pour le haricot, l'expression du gène ABA3/LOS5 est affectée par la salinité et nous n'avons pas pu l'isoler chez le pois chiche.

L'expression des gènes mARC chez le pois chiche et mARC2 chez le haricot est stimulée en condition de stress salin ce qui leur confère la propriété d'être des gènes sensibles à la salinité et d'avoir un rôle dans l'adaptation au stress salin.

Conclusions et Perspectives

Conclusions et Perspectives

Notre objectif est d'évaluer le comportement de trois espèces de légumineuses en condition de stress salin causé par le NaCl, et la présence du molybdène et de l'azote et d'étudier les changements qui affectent leurs molybdoenzymes sur le plan biochimique et moléculaire.

Les espèces légumineuses sont ; le haricot; *Phaseolus vulgaris* L., le pois chiche; *Cicer arietinum* L., et la lentille; *Lens culinaris* M., ce sont les espèces les plus cultivées en Algérie.

Nous avons estimé les changements dans la biomasse fraîche aérienne ainsi que la chlorophylle dans différentes concentrations de chlorure de sodium, et nous avons constaté qu'en situation de stress salin causé par une eau d'irrigation modérément saline (3g/l), la combinaison du molybdène et de l'azote conduit à une augmentation de la biomasse fraîche aérienne et le taux de la chlorophylle (a+b) chez le haricot, le pois chiche et la lentille.

Le ratio chlorophylle a sur b et l'activité de la nitrate réductase possèdent des valeurs élevés chez les trois espèces qui se comportent différemment considérant la tolérance au stress salin.

La concentration des protéines totales est plus élevée dans la partie aérienne que dans les racines pour les trois espèces, et la lentille est l'espèce qui synthétise la quantité la plus élevée par rapport aux deux autres espèces.

Le molybdène et l'azote stimulent la synthèse des protéines totales chez le haricot dans les deux parties aérienne et racinaire. Dans la partie aérienne du pois chiche et de la lentille, les valeurs les plus élevées sont données par les plantes témoins, alors que dans leurs racines, c'est le stress salin qui cause l'augmentation de la concentration des protéines totales.

L'activité de la xanthine déshydrogénase est plus importante dans les racines que dans la partie aérienne chez le haricot et la lentille, et c'est cette dernière espèce qui possède la plus importante activité parmi les trois espèces.

Dans la partie aérienne du haricot et du pois chiche, l'activité de la xanthine déshydrogénase est stimulée par l'apport du molybdène et de l'azote.

L'activité de l'aldéhyde oxydase est plus importante chez le haricot et la lentille par rapport au pois chiche, elle est plus élevée dans la partie aérienne du haricot par l'apport du molybdène et de l'azote, et dans les racines de la lentille en condition de stress salin.

La sulfite oxydase possède une activité plus importante dans les feuilles par rapport aux racines chez les trois espèces, qui diminue avec le temps et est affectée par le stress salin.

L'activité de la nitrate réductase augmente avec le temps mais elle est affectée par le stress salin. La lentille se distingue par l'activité la plus élevée.

L'activité du molybdène cofacteur diminue à cause du stress salin à part pour la lentille qui augmente en condition de stress salin.

Grace à l'apport du molybdène et de l'azote dans l'eau d'irrigation, la lentille connue pour être une espèce sensible, montre la meilleure adaptation au stress salin par rapport au haricot et au pois chiche.

Pour le western blot, on devrait choisir d'autre anticorps et prendre le temps de mettre au point ce protocole et jouer sur chaque facteur de l'essai.

L'expression des gènes de la sulfite oxydase et de la xanthine déshydrogénase chez le haricot, est régulée sous le stress salin, ce qui prouve que ces deux enzymes possèdent un rôle dans l'adaptation au stress salin.

On peut dire que l'expression des gènes de l'aldéhyde oxydase et la xanthine déshydrogénase chez le pois chiche est amplifiée par le molybdène et l'azote.

L'expression du gène de la nitrate réductase est affectée par la salinité mais elle est plus importante chez le haricot que chez le pois chiche.

L'expression des gènes mARC chez le pois chiche et mARC2 chez le haricot s'intensifie en condition de stress salin ce qui leur confère la propriété d'être des gènes sensibles à la salinité que leurs protéines possèdent un rôle dans l'adaptation au stress salin.

En perspective nous voudrions concentrer nos futures recherches sur le gène mARC, ce gène qui est récemment découvert, sa fonction reste encore non élucidée et avec son expression en situation de stress salin, cela nous poussera à s'intéresser de près à ce gène, en un séquençage complet de et l'expression de sa protéines dans différents systèmes ainsi que d'élargir le champ de recherche sur d'autres légumineuses.

En ce qui concerne la mise en évidence des protéines, l'utilisation d'autres anticorps conçus spécialement pour les légumineuses donnerait un meilleur résultat.

La science est un projet coopératif qui se transmet entre les générations. C'est le relais d'une torche du professeur à l'étudiant au professeur. Une communauté d'esprits prenant racine dans l'Antiquité et se dirigeant vers les étoiles.

Les références bibliographiques

1. **Abd El Samad HM, El Komy HM, Shaddad MAK, Hetta AM. 2005.** Effect of molybdenum on nitrogenase and nitrate reductase activities of wheat Inoculated with *Azospirillum brasilense* grown under drought stress. *General and Applied Plant Physiology* 31 (1-2), 43-54.
2. **Abdelguerfi A, Ramdane SA. 2003.** Evaluation Des Besoins En Matière De Renforcement Des Capacités Nécessaires A La Conservation Et L'utilisation Durable De La Biodiversité Importante Pour L'agriculture. Bilans des Expertises sur «La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie » MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31. P11
3. **Abd-ElBaki GK, Siefritz F, Man HM, Weiner H, Haldenhoff R, Kaiser WM. 2000.** Nitrate reductase in *Zea mays* L. under salinity. *Plant, Cell and Environment* 23: 515–521.
4. **Abdenour H (1982)** Etude de la fixation de l'azote chez quelques légumineuses. Thèse d'ing. Institut national d'agronomie (INA) de El Harrach, 72p.
5. **Adams MW, Coyne DP, Davis JH, Graham PH, Francis CA (1985)** Common bean (*Phaseolus vulgaris* L). Ed. In R. J. Summer field and E. H. Roberts, Colins, London, Grain Legume Crops: 433-476.
6. **Ahmad S.R, Jan N, Khan M. A and Sultana Q. (2005)** Effect of sulphur, phosphorus and molybdenum Application on the quality of soybean grain. *Sarhad J. Agric.* Vol.21, No.4, 2005
7. **Ahmed S. 2009.** Effect of soil salinity on the yield and yield components of Mung bean. *Pakistan Journal of Botany* 4(1), 263-268.
8. **Arkoun M. (2012).** Etude de la nutrition uréique et ammoniacale chez le colza (*Brassica napus* L.) et développement de nouveaux inhibiteurs d'uréases et de la nitrification. Thèse de doctorat. Université de Caen. France
9. **APG (2003)** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc*141: 399-436.
10. **Ashraf M, Iram A. 2005.** Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora* 200, 535–546 <http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2005.06.005>
11. **Ashraf M. (1997).** Improvement of salt tolerance in some native pulse crops. In : Jaiwal P.K.,
12. **Ashraf, M. and A. Waheed. 1993.** Responses of some genetically diverse lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to salt. *Plant Soil.* 154: 257- 266.

13. **Aslam M., tluffaker R.C., Rains D.W. 1984.** Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.*, 76: 321-325.
14. **Aykroyd W. et Doughty J., 1964-**Les graines de légumineuses dans l'alimentation humaine. Etude de la nutrition de la F. A .O n°19 : 1-5
15. **Badwey JA, Robinson JM, Karnovsky MJ, Karnovsky ML (1981)** Superoxide production by an unusual aldehyde oxidase in guinea pig granulocytes. Characterization and cytochemical localization. *J Biol Chem* 256:3479–3486
16. **Bambara S and Ndakidemi P A. 2010.** *Phaseolus vulgaris* response to *Rhizobium* inoculation, lime and molybdenum in selected low pH soil in Western Cape, South Africa. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 5(14), pp. 1804-1811, 18 July, 2010
17. **Bano A, Dorffing K, Bettin D, Hahn H (1993)** Abscisic acid and cytokinins as possible root-shoot signals in xylem sap of rice plants in drying soil. *Aust J Plant Physiol* 20: 109–115
18. **Barabas N.K., Omarov R.T., Erdei L., Lips S.H. 2000.** Distribution of the Moenzymes aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize (*Zea mays* L.) nodal roots as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci.*, 155: 49-58.
19. **Beddar N., 1990-** Analyse de l'effet inoculation par différentes souches de *Rhizobium* sur l'élaboration du rendement chez les pois chiche (*Cicer arietinum* L) var ILC3279. Mémoire d'ingénieur agronome, INSB, Sétif , 81p
20. **Bedell J.P.1996.** Purification, caractérisation et régulation de la glutamine synthétase ractnalre chez le Douglas (*Pseudotsuga menziesii*). Etude de son activité dans les mycorhizes Douglas/ *Laccaria bicolor*. Thèse de doctorat à l'Université Henri Poincaré. France
21. **Beligni MV, Lamattina L (2000)** Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210:215–221
22. **Ben Naceur M, Ben Salem M, Rahmoune C, Chorfi A, El Jaafari S, Paul R. 1998.** Etude comparée du comportement de quelques variétés anciennes et quelques variétés nouvelles de blé dur (*Triticum durum* Defsf.) sous contrainte hydrique. *Annales de l'INRA*, 71, 251-273.

23. **Benmahioul B., Daguin F., Kaid-Harche M. (2009)** Effet du stress salin sur la germination et la croissance in vitro du pistachier (*Pistacia vera* L.). *Comptes rendus en Biologies*, **332**,164- 170.
24. **Berger,B., de Regt, B., and Tester, M. (2012).** “High-throughput phenotyping of plant shoots,” in High-Throughput Phenotyping in Plants. Methods in Molecular Biology, ed. J. Normanly (New York, NY: Humana Press), 9–20.
25. **Bernal G, et Graham PH (2001)** Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Canadian J Microbiol* 47 (6): 526-534.
26. **Bishop, P.E. and R. Premakumar, 1992.** Alternative Nitrogen Fixation Systems. In Biological Nitrogen Fixation. Stacey, G., Roberts, G.P. and D.J. Evans, (Eds.) New York: Chapman & Hill, pp: 736-762.
27. **Bittner F. (2014).** Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. *Front Plant Sci.* 5:28. doi: 10.3389/fpls.2014.00028.
28. **Bittner F., and Mendel, R. R. (2010).** “Cell Biology of Molybdenum,” in Cell Biology of Metals and Nutrients, eds. R. Hell and R. R. Mendel (Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010), *Plant Cell Monogr.* 17, 119–143. doi: 10.1007/978-3-642-10613-2_6
29. **Bittner, F., Oreb, M., and Mendel, R. R. (2001)** ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 40381–40384
30. **Blumwald, E. (2000).** Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 431–434.
31. **Blumwald,E. (1987).** Tonoplast vesicles as a tool in the study of ion transport at the plant vacuole. *Physiol. Plant.* 69, 731–734.
32. **Bohnert, H. J., Ayoubi, P., Borchert, C., Bressan, R. A., Burnap, R. L., Cushman, J. C., et al. (2001).** A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 39, 295–311.
33. **Bohnert, H. J., Nelson, D. E., and Jensen, R. G. (1995).** Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099–1111.
34. **Boland MJ, Schubert KR (1982)** Purine biosynthesis and catabolism in soybean root nodules: incorporation of ¹⁴C from ¹⁴CO₂ into xanthine. *Arch Biochem Biophys* 213:486–491

35. **Bonilla I, Bolaños L (2009).** Mineral Nutrition for Legume-Rhizobia Symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co, and Ni: A Review. In *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants* (ed Lichtfouse, E.) Springer, pp. 253-274
36. **Bordas J, Bray RC, Garner CD, Gutteridge S, Hasnain SS (1980)** X-ray absorption spectroscopy of xanthine oxidase. The molybdenum centres of the functional and the desulpho forms. *Biochem J* 191:499–508
37. **Bortels H.**1930. Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. *Archiv für Mikrobiologie* 1,333–342. Botany. Vol.58, N°9, pp. 2289-2296
38. **Bouchenak M and Lamri-Senhadji M. (2013)** Nutritional Quality of Legumes, and Their Role in Cardiometabolic Risk Prevention: A Review. *Journal of Medicinal Food* , 16, 1–14
39. **Bouhmouch I, Souad-Mouhsine B, Brhada F (2005)** Influence of host cultivars and Rhizobium species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 1103-1113.
40. **Bourgeois-Chaillou, P.; Perez-Alfocea, F. & Guerrier, G. 1992.**Comparative effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress. *Journal of Experimental Botany*, 43:1225-1233.
41. **Bouزيد S, Rahmoune C. 2012.** Enhancement of Saline Water for Irrigation of *Phaseolus vulgaris* L. Species in Presence of Molybdenum. *Procedia Engineering* 33, 168 – 173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1190>
42. **Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–54.
43. **Brink M, Belay G. 2006.** Céréales et légumes secs, ressources végétales de l’Afrique tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P: 102.
44. **Broughton W.J., Hernandez G., Blair M.W., Beebe S., Gepts P. & Vanderleyden J. (2003).**Beans (*Phaseolus* spp.) - Model Food Legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.
45. **Bundy, J. G., Davey, M. P., and Viant, M. R. (2009).** Environmental metabolomics: a critical review and future perspectives. *Metabolomics* 5, 3–21. doi: 10.1007/s11306-008-0152-0
46. **Bussi C.,Habib R., Salsac L., Cotte M., Combe F. (1989)** Mesures in vivo et in situ de l'activité nitrate r_eductase chez le p^echer (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Agronomie, EDP Sciences*,9 (4), pp.409-414.

47. **Bybordi A. 2010.** Effects of Salinity and N on the Growth, Photosynthesis and N Status of Canola (*Brassica napus* L.). *Not Sci Biol* 2 (2) 2010, 92-97
48. **Cai, X., Chen, T., Zhou, Q. Y., Xu, L., Qu, L. Q., and Hua, X. J. (2011).** Development of Casparian strip in rice cultivars. *Plant Signal. Behav.* 6, 59–65.
49. **Campo R.J.; Araujo R.S. and Hungria, M. 2009.** Molybdenum-enriched soybean seeds enhance N accumulation, seed yield, and seed protein content in Brazil. *Field Crops Res.*, 110:219-224,.
50. **Canado IC, Doussinague C, Villena E (2003)** *Technicien en agriculture*. Ed. Cultural S. A.Madrid. 519 p.
51. **Carvajal M, Martnez V, Alcaraz FC. 1999.** Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. *Physiologia Plantarum* 105: 95–101.
52. **Chahota RK, Kishore N, Dhiman KC, Sharma TR, Sharma SK. 2007.** Predicting transgressive segregants in early generation using single seed descent method-derived micromacrosperma genepool of lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Euphytica* 156: 305–310.
53. **Chamizo-Ampudia, A., Galvan, A., Fernandez, E., and Llamas, A. (2011).** The *Chlamydomonas reinhardtii* molybdenum cofactor enzyme crARC has a Zn-dependent activity and protein partners similar to those of its human homologue. *Eukaryot. Cell* 10, 1270–1282.
54. **Chaux C et Foury C, 1994.** *Productions légumières, tome 3 : légumineuses potagères et légumes fruits*, Lavoisier Tec&Doc, (ISBN 2-85206-975-X)
55. **Chen G, Nian FZ (2004).** Effect of B, Mo on fatty acid component of *Brassica napus*. *Chin J. Oil Crop Sci.*, 26:69-71.
56. **CIAT (1992).** Constraints to and opportunities for improving bean production. A planning document 1993–98. An achievement document 1987–92, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia.
57. **Cordovilla MP, Ligerio F, Lluch C. 1994.** The effect of salinity on nitrogen fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* 45, 1483-1488. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/45.10.1483>
58. **Cornillon P, Palloix A. 1997.** Influence of sodium chloride on the growth and mineral nutrition of pepper cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 20, 1085-1094. <http://dx.doi.org/10.1080/01904169709365320>

59. **Corpas FJ, Palma JM, Sandalio LM, Valderrama R, Barroso JB, Del Rio LA (2008)** Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *J Plant Physiol* 165:1319–1330
60. **Cramer, M.D. & Lyps, L.H. 1995.** Enriched rhizosphere CO₂ concentration can ameliorate the influence of salinity on hydroponically grown tomato plants. *Physiologia Plantarum*, 94:425-432.
61. **Cuartero, J., and Bolarin, M. C. (2010).** “Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants,” in *Molecular Techniques in Crop Improvement*, eds S. M. Jain and D. S. Brar (Berlin: Springer).
62. **Cuartero, J., and Bolarin, M. C. (2010).** “Molecular tools for enhancing salinity tolerance in plants,” in *Molecular Techniques in Crop Improvement*, eds S. M. Jain and D. S. Brar (Berlin: Springer).
63. **Cubero.J.I.(1981).** Origin, taxonomy and domestication In: *Lentils* (eds C.Webb & G.C. Hawtin). Commonwealth Agricultural Bureau, Slough, England.
64. **Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone P, Martinou J (2003)** Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 278:41566–41571
65. **Dagnelie P. (1999):** Statistique théorique et appliquée. Tome 2. Inférence statistique à une et à deux dimensions. Bruxelles. Université de Boeck et Larcier. 659PP.
66. **Das P, Nutan K.K, Singla-Pareek S.L and Pareek A. (2015).** Understanding salinity responses and adopting ‘omics-based’ approaches to generate salinity tolerant cultivars of rice. *Front. Plant Sci.* 6:712. doi: 10.3389/fpls.2015.00712
67. **Datta DB, Triplett EW, Newcomb EH (1991)** Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4700–4702
68. **Datta J K, Kundu A, Dilwar H S, Banerjee A and Mondal N K. (2011)** study on the impact of micronutrient (molybdenum) on germination, seedling growth and physiology of bengal gram (*Cicer arietinum*) under laboratory conditions. *Asian Journal of Crop Science* 3 (2): 55-67
69. **Debouba M , Maaroufi-Dghimi H , Suzuki A., Ghorbel M H And Gouia H. (2007).** Changes in Growth and Activity of Enzymes Involved in Nitrate Reduction

- and Ammonium Assimilation in Tomato Seedlings in Response to NaCl Stress. *Annals of Botany* 99: 1143–1151.
70. **Dekkers B.J.W., Willems L., Bassel G.W., van Bolderen-Veldkamp R.P., Ligterink W., Hilhorst H.W. Bentsink L. 2012.** Identification of Reference Genes for RT-qPCR Expression Analysis in Arabidopsis and Tomato Seeds *Plant Cell Physiol.* 53(1): 28–37 .doi:10.1093/pcp/pcr113
71. **Del Rio LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jimenez A, Lopez- Huertas E, Hernandez JA (1998)** The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiol* 116:1195–1200
72. **Diaw NF (2002)** Utilisation des inoculums de rhizobium pour la culture du haricot (*Phaseolus vulgaris*) au Sénégal. Thèse doctorat. Université Cheikh Anta Diop. Dakar, 97 p.
73. **Dionisio-Sese, M. L., and Tobita, S. (2000).** Effects of salinity on sodium content and photosynthetic responses of rice seedlings differing in salt tolerance. *J. Plant Physiol.* 157, 54–58.
74. **Diouf A (1997)** Caractérisation et utilisation des souches rhizobium isolées du haricot vert (*Phaseolus vulgaris* L.) dans la zone des Niayes au Sénégal. Thèse doctorat, UCAD. Dakar, 96p.
75. **Dita M.A., Rispail N., Prats E., Rubiales D. & Singh K.B. (2006).** Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147: 1-24.
76. **Doyle J J, Luckow M A. 2003.** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900–10.
77. **Doyle J J. 2011.** Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. *Molecular Plant- Microbe Interactions.* 24: 1289–1295.
78. **Duke J.A., 1981-**Handbook legumes of world economic importance Ed .Plenum press, New-York and London, 25p
79. **Duranti M., Gius C., 1997.** Legume seeds: Protein content and nutritional value. *Field Crops Res.*, 53: 31-45.
80. **Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. Curr Opin Plant Biol 2:369–374** Noritake T, Kawakita K, Doke N (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol* 37:113–116

81. **Eckardt NA. 2005.** Moco mojo: crystal structure reveals essential features of Eukaryotic assimilatory nitrate reduction. *The Plant Cell* **17**, 1029–1031. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.032326>
82. **Edje OT, Mughogho LK, Rao YP. Msuku WAB. 1980.** Bean production in Malawi. In Potential for field beans in Eastern Africa. Proceedings of a Regional Workshop held in Lilongwe, Malawi, pp: 9-14
83. **Eilers T, Schwarz G, Brinkmann H, Witt C, Richter T, Nieder J, Koch B, Hille R, Hansch R, Mendel RR (2001)** Identification and biochemical characterization of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase. A new player in plant sulfur metabolism. *J Biol Chem* **276**:46989–46994
84. **El Midaoui M., Benbella M., Aït Houssa A., Ibriz M., Talouizte A. (2007):** Contribution à l'étude de quelques mécanismes d'adaptation à la salinité chez le tournesol cultivé (*Helianthus annuus* L.). *Revue HTE* N° 136, pp.29-34.
85. **Enstone, J. E., Peterson, C. A., and Ma, F. S. (2003).** Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. *J. Plant Growth Regul.* **21**, 335–351.
86. **Evans H. J and Nason A. (1952)** The effect of reduced triphosphopyridine nucleotide on nitrate reduction by purified nitrate reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **39**, 234-235
87. **FAO STAT (2010)** Agricultural production, crop primary database. Food and agricultural organization of the United Nations, Rome. <http://faostat.fao.org/faostat/>.
88. **FAO. (2009).** FAO Statistical Databases. Available at: <http://faostat.fao.org/>.
89. **FAO. 2012.** Cadre Programmation par Pays Algérie (2013 – 2016). République Algérienne Pour l'Alimentation et l'Agriculture Démocratique et Populaire, FAO (organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).
90. **FAOstat, 2011:** base de données de l'organisation mondiale de l'agriculture et de l'alimentation www.faostat.org/chickpea/stat.cal.
91. **FAO Stat, 2013.** Statistical database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.
92. **Farooq M., Wahid A and Siddique K H M. (2012)** Micronutrient application through seed treatments – a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, **12** (1), 125-142
93. **Flowers, T. J. (2004).** Improving crop salt tolerance. *J. Exp. Bot.* **55**, 307–319.

94. **Gama P. B. S., Inanaga S., Tanaka K., Nakazawa R. (2007):** Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (2), pp. 079-088
95. **Gao Z., Sagi M., Lips S.H. 1996.** Assimilate allocation priority as affected by nitrogen compounds in the xylem sap of tomato. Plant Physiol. Biochem., 34:807-815.
96. **Garg N, Singla R. 2009.** Variability in the response of chickpea cultivars to short-term salinity, in terms of water retention capacity, membrane permeability and osmo-protection. Turkish Journal of Agriculture and Forestry **33**, 57-63.
97. **Girard C ., 1985** - L'installation du pois chiche de printemps. In - Bulletin FNAMS semences : 25-27
98. **Gonzalez-Guzman M, Abia D, Salinas J, Serrano R, Rodriguez PL (2004)** Two new alleles of the abscisic aldehyde oxidase 3 gene reveal its role in abscisic acid biosynthesis in seeds. Plant Physiol 135:325–333
99. **Goodwin, M. 2005.** Profil de la culture de pois chiche au Canada. Ed. AAFC (Agriculture et Agri-Food Canada), Ottawa, Ontario, Canada. 28p.
100. **Gouia, H.; Ghorbal, M. H. & Touraine, B. 1994.** Effects of NaCl on Flows of N and Mineral Ions and on NO₃- Reductase Rate within Whole Plants of Salt-Sensitive Bean and Salt-Tolerant Cotton. Plant Physiology, 105:1409-1418.
101. **Gracey, A. Y., and Cossins, A. R. (2003).** Application of microarray technology in environmental and comparative physiology. Annu. Rev. Physiol. 65, 231–259.
102. **Graham RD, Stangoulis JRS. 2005.** Molybdenum and disease. In: Mineral nutrition and plant diseases (Dantoff L, Elmer W, Huber D. Eds) St Paul, MN: APS Press.
103. **Grimaldi A, Tettamanti G, Acquati F, Bossi E, Guidali ML, Banfi S, Monti L, Valvassori R, de Eguileor M. 2008.** A hedgehog homolog is involved in muscle formation and organization of *Sepia officinalis* (mollusca) mantle. Dev Dyn 237:659–671.
104. **Gruenewald S, Wahl B, Bittner F, Hungeling H, Kanzow S, Kotthaus J, Schwering U, Mendel RR, Clement B (2008)** The fourth molybdenum containing enzyme mARC: cloning and involvement in the activation of N-hydroxylated prodrugs. J Med Chem 51:8173–8177

- 105. Gupta DK, Tripathi RD, Rai UN, Dwivedi S, Mishra S, Inouhe M. (2006)** Changes in amino acid profile and metal content in seeds of *Cicer arietinum* L. (chickpea) grown under various fly-ash amendments. *Chemosphere*, **65**, 939–945.
- 106. Gupta, Y.P. 1987.** Studies on chemical and nutritional changes in Bengal gram (*Cicer arietinum*) during storage caused by the attack of pulse beetle (*Callosobruchus macuatus* Fab.). *Plant Food Nutr.* 37: 201-28.
- 107. Hairmansis, A., Berger, B., Tester, M., and Roy, A. J. (2014).** Image-based phenotyping for non-destructive screening of different salinity tolerance traits in rice. *Rice* 7, 16.
- 108. Hakim, M. A., Juraimi, A. S., and Hanafi, M. M. (2014).** The effect of salinity on growth, ion accumulation and yield of rice varieties. *J. Anim. Plant Sci.* 24, 874–885.
- 109. Halperin ST, Gilroy S, Lynch JP. 2003.** Sodium chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH, in root hairs of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany* **54**, 1269-1280. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erg134>
- 110. Hansch R, Lang C, Riebeseel E, Lindigkeit R, Gessler A, Rennenberg H, Mendel RR (2006)** Plant sulfite oxidase as novel producer of H₂O₂ : combination of enzyme catalysis with a subsequent nonenzymatic reaction step. *J Biol Chem* 281:6884–6888
- 111. Haq A U, Vamil R, Agnihotri, R. K., Dar S H and Sharma R. 2012.** Growth Performance Of Lens Culinaris Medik Under Nacl Induced Salt Stress. *International Journal of Current Research*, Vol. 4, Issue, 12- 15
- 112. Hassan F. 2006.** Heterologous expression of a recombinant chitinase from *Streptomyces olivaceoviridis* ATCC 11238 in Transgenic Pea (*Pisum sativum* L.). Doctorate thesis, University of Damas, Syria.
- 113. Havemeyer A, Bittner F, Wollers S, Mendel R, Kunze T, Clement B (2006)** Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. *J Biol Chem* 281:34796–34802
- 114. Havemeyer, A., Lang, J., and Clement, B. (2011)** The fourth mammalian molybdenum enzyme mARC: current state of research. *Drug Metabolism Reviews.* **43**, 524–539

- 115. Heidenreich T, Wollers S, Mendel RR, Bittner F (2005)** Characterization of the NifS-like domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J Biol Chem* 280:4213–4218
- 116. Hernandez J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F., del Rio L.A. 1995.** Salt-induced oxidative stress in chloroplast of pea plants. *Plant Sci.*,105: 151-167.
- 117. Hesberg C, Hansch R, Mendel RR, Bittner F (2004)** Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: differential gene expression and enzyme activities. *J Biol Chem* 279:13547–13554
- 118. Hille R (2005)** Molybdenum-containing hydroxylases. *Arch Biochem Biophys* 433:107–116
- 119. Hille, R., Nishino, T., and Bittner, F. (2011)** Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord. Chem. Rev.* 255, 1179–1205
- 120. Hirai, M. Y., Yano, M., Goodenowe, D. B., Kanaya, S., Kimura, T., Awazuhara, M., et al. (2004).** Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10205–10210.
- 121. Hollywood, K., Brison, D. R., and Goodacre, R. (2006).** Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* 6, 4716–4723. doi: 10.1002/pmic.200600106
- 122. Hristoskova MV, Geneva M, Stancheva I. 2006.** Response of pea plant (*Pisum sativum* L.) to reduce supply with molybdenum and copper. *International Journal of Agriculture and Biology* 08 (2), 218-220.
- 123. ITCMI. 2010.** Fiches techniques valorisées des cultures maraîchères et Industrielles ; La culture du HARICOT. P3.
- 124. Jabeen N, Ahmad R. 2011.** Foliar Application of Potassium Nitrate Affects the Growth and Nitrate Reductase Activity in Sunflower and Safflower Leaves under Salinity. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **39(2)**,172-178
- 125. Jacques J. 2014.** Réactivité De La Nitrate Réductase Périplasmique Étudiée Par Spectroscopie Rpe Et Électrochimie Directe. Thèse de Doctorat. Aix-Marseille Université. France
- 126. Jansen, M., Pinto, F., Nagel, K. A., Dusschoten, D., Fiorani, F., Rascher, U., et al. (2014).** “Non-invasive phenotyping methodologies enable the accurate characterization of growth and performance of shoots and roots,” in *Genomics of*

- Plant Genetic Resources, eds R. Tuberosa, A. Graner, and E. Frison (Dordrecht: Springer), 173–206.
- 127. Jeschke, W. D. (1984).** “K + -Na + exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance,” in Salinity Tolerance in Plant. Strategies for Crop Improvement, eds R. C. Staple and G. H. Toenniessen (New York: Wiley- Interscience Publication), 33–76.
- 128. Johnson, H. E., Broadhurst, D., Goodacre, R., and Smith, A. R. (2003).** Metabolic fingerprinting of salt-stressed tomatoes. *Phytochem* 62, 919–928.
- 129. Johnson, M. K., Johnson, E. J., MacElroy, R. D., Speer, H. L., and Bru, B. S. (1968).** Effects of salts on the halophilic alga *Dunaliella viridis*. *J. Bacteriol.* 95, 1461–1468.
- 130. Kadi A, 2008.** Etude de la régulation de la production de l’oxyde nitrique, dans les cellules endothéliales, en réponse à un β bloquant de troisième génération à action antihypertensive. Thèse de doctorat. Université Nancy. France.
- 131. Kandil H., Gad N., and Abdelhamid M T. 2013.** Effects of Different Rates of Phosphorus and Molybdenum Application on Two Varieties Common Bean of (*Phaseolus vulgaris* L.. *J. Agric. Food. Tech.*, 3(3)8-16, 2013
- 132. Kanez F, Nazir H, Pir FA, Mohd M. (2013).** Effect of nitrogen and phosphorus on growth and yield of Lentil (*Lens culinaris*). *Elixir Applied Botany* 57, 14323-14325
- 133. Kaplan, F., Kopka, J., Haskell, D. W., Zhao, W., Schiller, K. C., Gatzke, N., et al. (2004).** Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 136, 4159–4168.
- 134. Khadri M., Pliego L. Soussi M., Lluch C., Ocana A. (2001) :** Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Agronomy.* 21, 635-643.
- 135. Khan M.G., Siiberbush M., Lips S.H. 1995.** Physiological studies on salinity and nitrogen interaction in alfalfa plants: III. Nitrate reductase activity. *J. Plant Nutr.*, 18: 2495-2500.
- 136. Kim, H. K., Choi, Y. H., and Verpoorte, R. (2010).** NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc. U.S.A.* 5, 536–549.
- 137. Kisker C, Schindelin H, Pacheco A, Wehbi WA, Garrett RM, Rajagopalan KV, Enemark JH, Rees DC (1997)** Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 91:973–983

- 138. Koiwai, H., Akaba, S., Seo, M., Komano, T. and Koshiha, T. (2000):** Functional expression of two Arabidopsis aldehyde oxidases in the yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* 127, 659-664.
- 139. Komatsu, S., Yamamoto, R., Nanjo, Y., Mikami, Y., Yunokawa, H., and Sakata, K. (2009).** A comprehensive analysis of the soybean genes and proteins expressed under flooding stress using transcriptome and proteome techniques. *J. Proteom. Res.* 8, 4766–4778. doi: 10.1021/pr900460x
- 140. Koshiha, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. and Sato, M. (1996)** Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiology*, 110, 781-789.
- 141. Kosov K, Vtmvs P, Prsil IT, Renaut J. (2011) "Plant proteome changes under abiotic stress - contribution of proteomics studies to understanding plant stress response" J. Proteomics 74, 1301 – 1322**
- 142. Kotthaus, J., Wahl, B., Havemeyer, A., Kotthaus, J., Schade, D., Garbe-Schoenberg, D., Mendel R.R, Bittner F, Clement B. (2011).** Reduction of N(ω)-hydroxy-L-arginine by the mitochondrial amidoxime reducing component (mARC). *Biochem. J.* 433, 383–391.
- 143. Kozmin SG, Leroy P, Pavlov YI, Schaaper RM (2008)** YcbX and yiiM, two novel determinants for resistance of *Escherichia coli* to N-hydroxylated base analogues. *Mol Microbiol* 68:51–65
- 144. Krishnamurthy, P., Ranathunge, K., Franke, R., Prakash, H. S., Schreiber, L., and Mathew, M. K. (2009).** The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 230, 119–134.
- 145. Krompholz, N., Krischkowski, C., Reichmann, D., Garbe-Schoenberg, D., Mendel, R. R., Bittner, F., Clement B., Havemeyert A. (2012).** The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 2443–2450
- 146. Kumari, S., Sabharwal, V. P., Khushwaha, H. R., Sopory, S. K., Singla-Pareek, S. L., and Pareek, A. (2009).** Transcriptome map for seedling stage specific salinity stress response indicates a specific set of genes as candidate for saline tolerance in *Oryza sativa* L. *Funct. Integr. Genomics.* 9, 109–123.

147. **Kuper J., Llamas A., Hecht H.J., Mendel R.R., Schwarz G. (2004):** Structure of the molybdopterine-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature* (430), 803-806.
148. **Ladizinsky, G., Braun, D., Goshen, D. and Muehlbauer, F. J. 1989.** The biological species in the genus *Lens* L. *Bot. Gaz.* 145:253-261
149. **Laumonier R (1979)** Cultures légumières et maraichères. Ed. J.B. Baillière, Paris, 276 p.
150. **Lauter D.J and Munns D.N .1986.** Salt resistance of chickpea genotypes in solutions salinized with NaCl or Na₂ SO₄, *Plant Soil.* 95: 271–279.
151. **Lebas G. 2012.** Etude du métabolisme carboné et azoté de *Miscanthus x giganteus*. Thèse de doctorat. Université Jule verne. France.
152. **Lehrke, M., Rump, S., Heidenreich, T., Wissing, J., Mendel, R. R., and Bittner, F. (2012)** Identification of persulfide-binding and disulfide-forming cysteine residues in the NifS-like domain of the molybdenum cofactor sulfurase ABA3 by cysteine-scanning mutagenesis. *Biochem. J.* 441, 823–832
153. **Leon-Kloosterziel KM, Gil MA, Ruijs GJ, Jacobsen SE, Olszewski NE, Schwartz SH, Zeevaart JAD, Koorneef M (1996)** Isolation and characterization of abscisic acid-deficient *Arabidopsis* mutants at two new loci. *Plant J* 10:655–661
154. **Levigneron A., Lopez F., Vansuyt G., Berthomieu P., Fourcroy P et Casse-Delbart F. (1995).** Les plantes face au stress salin. *Cahier d'études et de recherches Francophones/Agricultures.* 4.263-273
155. **Lewis, N. J., Hurt, P., Sealy-Lewis, H. M., and Scazzocchio, C. (1978)** The genetic control of the molybdoflavoproteins in *Aspergillus nidulans*. IV. A comparison between purine hydroxylase I and II. *Eur. J. Biochem.* 91, 311–316
156. **Lips SH, Leidi EO, Silberbush M. 1990.** Nitrogen assimilation of plants under stress and high CO₂ concentrations. In: *Inorganic nitrogen metabolism.* Berlin: Springer-Verlag, 341–8.
157. **Liu, J. X., and Bennett, J. (2011).** Reversible and irreversible drought-induced changes in the anther proteome of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes IR64 and moroberekan. *Mol. Plant* 4, 59–69.
158. **Lobato AKS, Costa RCL, Oliveira Neto CF, Santos Filho BG, Alves GAR, Freitas JMN, Cruz FJR, Marochio CA, Coimbra GK. (2009).** Responses of the pigments and carbon metabolism in *Vigna unguiculata* cultivars submitted to water deficit. *Research Journal of Biological Sciences* ;4 593-598.

- 159. Luga, R., Niogret, M. F., Leport, L., Guegan, J. P., Larher, F. R., Savoure, A., et al. (2010).** Metabolome and water homeostasis analysis of *Thellungiella salsuginea* suggests that dehydration tolerance is a key response to osmotic stress in this halophyte. *Plant J.* 64, 215–229.
- 160. Ma, N. L., Rahmat, Z., and Lam, S. S. (2013).** A review of the “Omics” approach to biomarkers of oxidative stress in *Oryza sativa*. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 7515–7541.
- 161. Maathuis FJM, Filatov V, Herzyk P, Krijger GC, Axelsen KB, Chen S, Green BJ, Li Y, Madagan KL, Sánchez-Fernández R, Forde BG, Palmgren MG, Rea PA, Williams LE, Sanders D, Amtmann A. (2003)** Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *The Plant Journal* 35675–692.
- 162. Mbarek K., 2011.** Comportement du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) du type kabuli vis-à-vis du stress hydrique et identification de génotypes tolérants la sécheresse. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Université de Sousse Chott-Mariem, Tunisie ; 247p.
- 163. Magalon, A., Fedor, J. G., Walburger, A., and Weiner, J. H. (2011)** Molybdenum enzymes in bacteria and their maturation. *Coord. Chem. Rev.* 255, 1159–1178
- 164. Maillard J. (2001).** Le point sur l’Irrigation et la salinité des sols en zone aride : Risques et Recommandations. Handicap International. Novembre 2001. 35p
- 165. Mansour N. (2014).** Enhancement Vegetative Growth and Leaf Mineral Content of Manzanillo Olive Transplants Using Different Levels of Nitrogen and Molybdenum. *J. Hort. Sci. & Ornamen. Plants*, 6 (2): 41-49
- 166. Marschner H. (1995).** Functions of Mineral Nutrition: Macronutrients. In: *Mineral Nutrition of Higher Plants*, eds. by Marschner H. Academic Press, London.
- 167. Martinez, V. & Cerda, A. 1989.** Nitrate reductase activity in tomato and cucumber leaves as influenced by NaCl and N source. *Journal Plant Nutrition*, 12:1335-1350.
- 168. Massey V, Edmondson DE (1970)** On the mechanism of inactivation of xanthine oxidase by cyanide. *J Biol Chem* 245:6595–6598
- 169. Mauch-Mani B, Mauch F (2005)** The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8:409–414

- 170. McKinney C. 1941.** Absorption of light by chlorophyll solution. *Journal of Biological Chemistry* 140, 315-322
- 171. McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C. (2003)** Opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *J Neurosci.* ;23:5674–5683.
- 172. MADR, 2014.** Annuaire statistiques du Ministère de l’Agriculture et du Développement Rural.
- 173. Melakhessou, Z. 2007.** Etude de la nuisibilité directe des adventices sur la culture de pois chiche d'hiver (*Cicer arietinum* L.) variété ILC 3279, cas de *Sinapis arvensis* L. . Thèse de Magister en sciences agronomiques. Univ. El-hadj Lakhdar de Batna. 72p.
- 174. Meloni DA, Gulotta MR, Martínez CA, Oliva MA. 2004.** The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. *Brazilian Journal of Plant Physiology.* 16(1), 39-46. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202004000100006>
- 175. Mendel R R, Bittner F. (2006)** Cell biology of molybdenum. *Biochim Biophys Acta.*;1763(7):621-35.
- 176. Mendel R.R. (2007):** Biology of the molybdenum cofactor. *Journal of Experimental*
- 177. Mendel R.R. (2013).** The Molybdenum Cofactor. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 288, NO. 19, pp. 13165–13172.
- 178. Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., Appel, T. 2001.** Principles of Plant Nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 179. Ministère de l’Agriculture . 1993-2002 -** Statistiques d'Agricultures d'Algérie .Ed- M. A .P .Alger, 46P
- 180. Misra, N. & Dwiverdi, U. N. 1990.**Nitrogen assimilation in germinating *Phaseolus aureus* seeds under saline stress. *Journal Plant Physiology,* 135:719-724.
- 181. Mohan, M., Narayanan, M., S. L., and Ibrahim, S. M. (2000).** Chlorophyll stability index (CSI): its impact on salt tolerance in rice. *Int. Rice Res. Notes* 25, 38–39.
- 182. Monneveux P. (1989).** Quelles stratégies pour l’amélioration génétique de la tolérance au déficit hydrique des céréals d’hiver ? Journées scientifiques de l’AUPELF : « Amélioration es plantes pour l’adaptation au milieu aride » Tunis

- 183. Montalbini P (1992)** Inhibition of hypersensitive response by allopurinol applied to the host in the incompatible relationship between *Phaseolus vulgaris* and *Uromyces phaseoli*. *J Phytopathol* 134:218–228
- 184. Montalbini P (1998)** Purification and some properties of xanthine dehydrogenase from wheat leaves. *Plant Sci* 134:89–102
- 185. Montalbini P (2000)** Xanthine dehydrogenase from leaves of leguminous plants: purification, characterization and properties of the enzyme. *J Plant Phys* 156:3–16
- 186. Montalbini P, Della Torre G (1996)** Evidence of a two-fold mechanism responsible for the inhibition by allopurinol of the hypersensitive response induced in tobacco by tobacco necrosis virus. *Phys Mol Plant Pathol* 48:273–287
- 187. Munn R (1993).** Physiological process limiting plant growth in saline soil : some dogmas and hypothesis. *Plant cell. Environ.* 16: 15-24
- 188. Munns, R., and James, R. A. (2003).** Screening methods for salinity tolerance: a case study with tetraploid wheat. *Plant Soil.* 253, 201–218.
- 189. Munns, R., and Tester, M. (2008).** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 651–681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- 190. Naman F, Zaoui D., Ouaaka A, Chraïbi A. 1997.** Mesures in vivo et in vitro de l'activité nitrate réductase dans les feuilles de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* var. *Maghribel*). *Actes Institut Agronomique et vétérinaire* 17 (2), 95-101
- 191. Nowak K, Luniak N, Witt C, Wustefeld Y, Wachter A, Mendel RR, Hansch R (2004)** Peroxisomal localization of sulfite oxidase separates it from chloroplast-based sulfur assimilation. *Plant Cell Physiol* 45:1889–1894
- 192. Nyabyenda, P (2005)** Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : Généralités, Légumineuses alimentaires, Plantes à tubercules et racines, Céréales. Gembloux : Presses Agronomiques de Gembloux.
- 193. Okazaki, Y., and Saito, K. (2012).** Recent advances of metabolomics in plant biotechnology. *Plant Biotechnol. Rep.* 6, 1–15.
- 194. Omarov R.T, Sagi M and Lips S.H. 1998.** Regulation of aldehyde oxidase and nitrate reductase in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen source and salinity. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 49, No. 322, pp. 897–902.
- 195. Pachmayr, F. (1960)** Vorkommen und Bestimmungen von Schwefel in Mineralwasser. Dissertation, München.

- 196. Parida AK, Das AB. 2004.** Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorus metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture. *Journal of Plant Physiology* 161: 921–928.
- 197. Parida A K., Das A B. (2005)** Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3), 324–49
- 198. Perez-Vicente R, Alamillo JM, Cardenas J, Pineda M (1992)** Purification and substrate inactivation of xanthine dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1117:159–166
- 199. Pilbeam DJ, Kirkby EA. 1992.** Some aspects of the utilization of nitrate and ammonium by plants. In: Mengel K, Pilbeam DJ, eds. *Nitrogen metabolism of plants*. Oxford: Clarendon Press, 55–70.
- 200. Plitzko B, Ott G, Reichmann D, Henderson C. J, Wolf C. R, Mendel R, Bittner F, Clement B, and Havemeyer A. (2013)** The Involvement of Mitochondrial Amidoxime Reducing Components 1 and 2 and Mitochondrial Cytochrome *b₅* in *N*-Reductive Metabolism in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 288(28): 20228–20237.
- 201. Pochon N (1981)** La prairie permanente à base de trèfle blanc. Ed. Institut technique de l'élevage bovin. Paris, 104p.
- 202. Pujola M, Farreras A, Casanas F (2007)** Protein and starch content of raw, soaked and cooked beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 102: 1034–1041.
- 203. Rahmoune C, Ben Naceur M, Cheikh-M'Hamed H, Maalam S .2008.** Les indicateurs précoces de tolérance à la salinité chez les blés durs. *Biotech2008*. XIes Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie. Rennes, France. p.151
- 204. Rahmoune C., Maâlem S., Redjel F., Hioun S. Bennaceur M. (2001):** Physiological and biochemical responses of two precocious varieties of wheat to phosphate rocks and TSP fertilisation in semi-arid land. Proc XIVth. International Plant Nutrition Colloquium, July 27- August 03-2001, Hannover, Germany.
- 205. Rahmoune C., Seridi R., Paul R., Dreze P. (2000):** Influence of Zinc Concentration in Solution Applied to Leaves and Roots on the Absorption and Translocation of Cd by Leaves. *Agricultural sciences*. Vol.7, N° 1. pp,72-77.

- 206. Raven J-A., Wollenweber B., Handley L-L. (1992).** A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. *New Phytologist* 121, 19-32.
- 207. Reddy ASN, Ali GS, Celesnik H, Day IS. (2011)** "Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression" *The Plant Cell* 23, 2010 - 2032
- 208. Reynolds, M. P., Ortiz-Monasterio, J. I., and Mc Nab, A. (2001).** Application of Physiology in Wheat Breeding. Mexico, DF: CIMMYT.
- 209. Richharia A., Shah K., Duhey R.S. 1997.** Nitrate reductase from rice seedlings: Partial purification, characterization and the effects of *in situ* and *in vitro* NaCl salinity. *J. Plant Physiol.*, 151: 316-322.
- 210. Rodríguez-Trelles, F., Tarrío, R., and Ayala, F. J. (2003).** Convergent neofunctionalization by positive darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13413–13417.
- 211. Rothe GM. 1974.** Aldehyde oxidase isoenzymes (EC 1.2.3.1) in potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell Physiology* 15,493±499.
- 212. Royuela, M., Gonzalez, A., Gonzalez, E. M., Arrese-Igor, C., Aparicio-Tejo, P.M., and Gonzalez-Murua, C. (2000).** Physiological consequences of continuous, sublethal imazethapyr supply to pea plants. *J. Plant Physiol.* 157, 345–354. doi: 10.1016/S0176-1617(00)80057-7
- 213. Sagi M, Scazzocchio C, Fluhr R (2002)** The absence of molybdenum cofactor sulfuration is the primary cause of the flacca phenotype in tomato plants. *Plant J* 31:305–317
- 214. Sagi M., Omarov R.T., Lips S.H. 1998.** The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci.*, 135: 125-135.
- 215. Sagi M., Savidov N.A., L'vov N.P., Lips S.H. 1997.** Nitrate reductase and molybdenum cofactor in annual ryegrass as affected by salinity and nitrogen source. *Physiol. Plant.*, 99: 546-553.
- 216. Sahi, C., Singh, A., Blumwald, E., and Grover, A. (2006).** Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiol. Plant.* 127, 1–9.

- 217. Sandalio LM, Fernandez VM, Ruperez FL, del Rio LA (1988)** Superoxide free radicals are produced in glyoxysomes. *Plant Physiol* 127:1–4
- 218. Saskatchewan Pulse Growers. 2000.** Pulse production manual. Saskatchewan Pulse Growers, Saskatoon SK.
- 219. Sauer P, Frebortova J, Sebela M, Galuszka P, Jacobsen S, Pec P, Frebort I (2002)** Xanthine dehydrogenase of pea seedlings: a member of the plant molybdenum oxidoreductase family. *Plant Physiol Biochem* 40:393–400
- 220. Saxena M. C et Singh K B., 1987-** The chickpea. Ed- CAB internat., 399 p.
- 221. Schrader N, Kim EY, Winking J, Paulukat J, Schindelin H, Schwarz G (2004)** Biochemical characterization of the high affinity binding between the glycine receptor and gephyrin. *J Biol Chem* 279:18733–18741
- 222. Schreiber, L., Hartmann, K., Skrabs, M., and Zeier, Jr. (1999).** Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J. Exp. Bot.* 50, 1267–1280.
- 223. Senguttuvel, P., Vijayalakshmi, C., Thiyagarajan, K., Kannanbapu J. R., Kota, S., Padmavathi, G., et al. (2014).** Changes in photosynthesis, chlorophyll fluorescence, gas exchange parameters and osmotic potential to salt stress during early seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *SABRAO J. Breed. Genet.* 46, 120–135.
- 224. Seo M, Koshiba T (2002)** The complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci* 7:41–48
- 225. Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaart JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T (2000)** The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12908–12913
- 226. Seo, M., and Koshiba, T. (2011).** Transport of ABA from the site of biosynthesis to the site of action. *J. Plant Res.* 124, 501–507.
- 227. Sepehr M F., Ghorbanly M., Amini F. (2012).** effect of water stress on nitrate reductase activity and nitrogen and phosphorus content in *Cuminum cyminum* L. *Pak. J. Bot.*,44(3): 899-903.
- 228. Shannon M, Crieve M, Francois LE. 1994.** Whole-plant response to salinity. In *Plant Environment Interactions*, Ed. R.E. Wilkinson, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 199-244

- 229. Sidari M, Muscolo A, Anastasi U, Preiti G and Santonoceto C. 2007.** Response of four genotypes of lentil to salt stress conditions. *Seed Science and Technology* **35**, 497-503. <http://dx.doi.org/10.15258/sst.2007.35.2.24>
- 230. Sikuku, P. A., Netondo, G. W., Onyango, J. C., and Musyimi, D. M. (2010).** Chlorophyll fluorescence, protein and chlorophyll content of three NERICA rainfed rice varieties under varying irrigation regimes. *ARPJ. Agr. Biol. Sci.* **5**, 19–25.
- 231. Silué S. 2009.** Mécanismes génétiques de l'embryogenèse chez *Phaseolus* et application en hybridation interspécifique. **Thèse de doctorat.** Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. 171p
- 232. Silveira JAG, De Cardoso B, Melo ARB, De Viegas RA.1999.** Salt-induced decrease in nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **11(2)**, 77-82.
- 233. Singla R, Garg N. 2005.** Influence of salinity on growth and yield attributes in chickpea cultivars. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **29**, 231-235.
- 234. Skipper L, Campbell WH, Mertens JA, Lowe DJ (2001)** Pre-steady-state kinetic analysis of recombinant Arabidopsis NADH:nitrate reductase: rate-limiting processes in catalysis. *J Biol Chem* **276**:26995–27002
- 235. Skrypetz, S. 2006.** Pois chiches: Situation et perspectives. *Bulletin Bimensuel.* Ed. DAM & DPS & DPC & AAC. Canada. 4p
- 236. Soda,N., Kushwaha, H. R., Soni, P., Singla–Pareek, S. L., and Pareek, A. (2013).** A suite of new genes defining salinity stress tolerance in seedlings of contrasting rice genotypes. *Funct. Integr. Genomics.* **13**, 351–365.
- 237. Solomonson, L. P. & Barber, M. J. 1990.** Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. - *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi.* **41**: 225-253.
- 238. Soussi M, Ocana A, Lluch C. 1998.** Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Experimental Botany* **49**, 1329-1337.
- 239. Staal, M., Maathuis, F. J. M., Elzenga, J. T. M., Overbeek, J. H. M., and Prins, H. B. A. (1991).** Na⁺ /H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol. Plant.* **82**, 179–184.

- 240. Subba Rao N S, Venka Taraman G S And Kannaiyan S (1993)** Biological Nitrogen Fixation. P8 .Publications And Information Division Indian Council Of Agricultural Research Krishi Anusandhan Bhavan, Pusa, New Delhi
- 241. Summerfield R. J., Minchin F .R., Roberts E. H. et Hadley P., 1979-** The effects of photoperiod and air temperature on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L). Proceedings international workshop on chickpea improvement. Ed. ICRISAT (international center for agricultural research in the dry areas):121-144
- 242. Tejera NA, Soussi M, Lluch C. 2006.** Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environmental and Experimental Botany* **58**, 17–24.
- 243. Terao M, Kurosaki M, Marini M, Vanoni MA, Saltini G, Bonetto V, Bastone A, Federico C, Saccone S, Fanelli R, Salmona M, Garattini E (2001)** Purification of the aldehyde oxidase homolog 1 (AOH1) protein and cloning of the AOH1 and aldehyde oxidase homolog 2 (AOH2) genes. Identification of a novel molybdo-flavoprotein gene cluster on mouse chromosome 1. *J Biol Chem* **276**:46347–46363
- 244. Tester M and Davenport R. (2003)** Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany* **91**:503–527.
- 245. Tharanathan R.N, Mahadevamma S. (2003)** Legumes—a boon to human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, **14**, 507–518.
- 246. Thompson, G. A., and Goggin, F. L. (2006).** Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *J. Exp. Bot.* **57**, 755–766. doi: 10.1093/jxb/erj135
- 247. Turk MA, Tawaha ARM, Lee KD. 2004.** Seed germination and seedling growth of three lentil cultivars under moisture stress. *Asian Journal of Plant Sciences* **3**, 394-397. <http://dx.doi.org/10.3923/ajps.2004.394.397>
- 248. Urano, K., Maruyama, K., Ogata, Y., Morishita, Y., Takeda, M., Sakurai, N., et al. (2009).** Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in Arabidopsis by metabolomics. *Plant J.* **57**, 1065–1078.
- 249. Van Hoorn J W, Katerji N, Hamdy A, Mastrorilli M .2000.** Effect of salinity on yield and nitrogen uptake of four grain legumes and on biological nitrogen contribution from the soil. *Agricultural Water Management* **51**, 87-98. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3774\(01\)00114-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3774(01)00114-7)

- 250. Van Oss, H., Aron, Y. and Ladizinsky, G. 1997.** Chloroplast DNA variation and evolution in the genus *Lens* Mill. *Theor. Appl. Genet.* 94:452-457.
- 251. Vandenberg A, Slinkard AE. 1990.** Genetics of seed coats color and pattern in lentil. *Journal of Heredity.* 81: 484–488.
- 252. Vandenberg, A. and Slinkard, A. E. 1990.** Genetics of seed coats color and pattern in lentil. *J. Hered.* 81:484-488.
- 253. Vander Maessen L. J.C., 1972-** *Cicer* L, a monograph of the genus, with special reference to the chickpea (*Cicer arietinum* L) , its ecology and cultivation. Meddling land bouw bog school wagenigen, Nederland, 72 p
- 254. Ventura Y, Wuddineh WA, Ephrath Y, Shpigel M, Sagi M .2010.** Molybdenum as an essential element for improving total yield in seawater-grown *Salicornia europaea* L. *Scientia Horticulturae* **126**,395–401
- 255. Verret F ., 1982-** Etude de quelques légumineuses à gousses graines adaptées au semis de printemps dans la zone méditerranéenne. Mémoire D .A. A . ENSA Montpellier, 72p
- 256. Verslues PE, Zhu JK (2005)** Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem Soc Trans* 33:375–379
- 257. Viegas RA, Melo ARB, Silveira JAG.** Nitrate reductase activity and proline accumulation in cashew (*Anacardium occidentale* L.) in response to salt (NaCl) shock. *Brazilian Journal of Plant Physiology.*1999;11:21–28.
- 258. Vincent R .2006.** Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l’algue brune *Laminaria digitata*. Thèse de doctorat. Biologie. Université de Rennes 1. 237p. France
- 259. Wahl RC, Rajagopalan KV (1982)** Evidence for the inorganic nature of the cyanolyzable sulfur of molybdenum hydroxylases. *J Biol Chem* 257:1354–1359
- 260. Wahl, B., Reichmann, D., Niks, D., Krompholz, N., Havemeyer, A., Clement, B., Messerschmidt, T., Rothkegel, M., Biester, H., Hille, R., Mendel, R. R. et Bittner, F. (2010).** Biochemical and spectroscopic characterization of the human mitochondrial amidoxime reducing components hmARC-1 and hmARC-2 suggests the existence of a new molybdenum enzyme family in eukaryotes. *J. Biol. Chem.*, 285(48):37847–37859.

- 261. Wahl, R. C., Hageman, R. V., and Rajagopalan, K. V. (1984)** The relationship of Mo, molybdopterin, and the cyanolyzable sulfur in the Mo cofactor. *Arch. Biochem. Biophys.* 230, 264–273
- 262. Walia, H., Wilson, C., Zeng, L., Ismail, A. M., Condamine, P., and Close, T. J. (2007).** Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed japonica and indica rice genotypes during panicle initiation stage. *Plant Mol. Biol.* 63, 609–623.
- 263. Walker-Simmons, M., Kudra, D.A. and Warner, R.L. (1989)** Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiology*, 90, 728-733. doi:10.1104/pp.90.2.728
- 264. Wang, W. X., Vinocur, B., and Altman, A. (2003).** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218, 1–14.
- 265. Welfare K, Yeo AR, Flowers TJ. 2002.** Effects of salinity and ozone, individually and in combination, on the growth and ion contents of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. *Environmental Pollution* **120**, 397-403.
- 266. Weng BQ, Huang DF, Xiong DZ, Wang YX, Luo T, Ying ZY, Wang HP. 2009.** Effects of Molybdenum Application on Plant Growth, Molybdoenzyme Activity and Mesophyll Cell Ultrastructure of Round Leaf Cassia in Red Soil. *Journal of Plant Nutrition* 32 (11),1941 – 1955.
- 267. Wohlbach D. J., Quirino B. F., Sussman M. R. (2008).** Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell* 20 1101–1117
- 268. Wollers, S., Heidenreich, T., Zarepour, M., Zachmann, D., Kraft, C., Zhao, Y., Mendel, R. R., and Bittner, F. (2008)** Binding of sulfurated molybdenum cofactor to the C-terminal domain of ABA3 from *Arabidopsis thaliana* provides insight into the mechanism of molybdenum cofactor sulfuration. *J. Biol. Chem.* 283, 9642–9650
- 269. Wortmann CS, Kirkby RA, Eledu CA, Allen DJ (1998)** Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Africa. CIAT, Cali, Colombia.
- 270. Xiong L, Lee H, Ishitani M, Zhu J.K (2002)** Regulation of osmotic stress-responsive gene expression by the *LOS6/ABA1* locus in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 277: 8588-8596

- 271. Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK. (2001)** The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell*. 13(9):2063-83.
- 272. Xiong, L., and Zhu, J. K. (2002).** Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ*. 25, 131–139. doi: 10.1046/j.1365-3040.2002.00782.x
- 273. Yadav. S.S., Stevenson, P.C., Rizvi, A. H., Manohar, M., Gailing, S. and Mateljan, G. (2007).** Uses and consumption In: Lentil. An ancient crop for modern times (eds S.S. Yadav, D.L McNeil, & P.C. Stevenson). Springer, Dordrecht, The Netherlands
- 274. Yamasaki H, Sakihama Y (2000)** Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett* 468:89–92
- 275. Yeo, A. R., Caporn, S. J. M., and Flowers, T. J. (1985).** The effect of salinity upon photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.): gas exchange by individual leaves in relation to their salt content. *J. Exp. Bot.* 36, 1240–1248.
- 276. Yeo, A. R., Yeo, M. E., and Flowers, T. J. (1987).** The contribution of an apoplastic pathway to sodium uptake by rice roots in saline conditions. *J. Exp. Bot.* 38, 1141–1153. doi: 10.1093/jxb/38.7.1141
- 277. Yesbergenova Z, Yang G, Oron E, Soffer D, Fluhr R, Sagi M (2005)** The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *Plant J* 42:862–876
- 278. Yu M, Hu CX, Wang YH. 2006.** Effect of Molybdenum on the intermediate of chlorophyll biosynthesis of winter wheat cultivars under low temperature. *Agricultural Sciences in China* **5(9)**, 670-677.
- 279. Zahran H.H. (1999)** Rhizobium legume symbiosis and nitrogen under severe conditions in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Review* 63: 968-989.
- 280. Zdunek E, Lips S.H. 2001.** Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *J. Exp. Bot.*, 52: 1269-1276.

- 281. Zdunek E. 2002.** Mo-enzymes from leaves and roots of pea plants (*Pisum sativum* L.) as affected by salinity and different N₂ source. Doctoral dissertation, Warsaw Agricultural University, Warsaw, Poland.
- 282. Zdunek-Zastocka E and Lips H.S. (2003)** . Plant molybdoenzymes and their response to stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. Vol. 25. No. 4. :437-452
- 283. Zeng, L., Poss, J., Wilson, C., Draz, A.-S., Gregorio, G., and Grieve, C. (2003).** Evaluation of salt tolerance in rice genotypes by physiological characters. *Euphytica*. 129, 281–292.
- 284. Zhao J, Bai QY (2001).** Alleviation of nitrate accumulation in vegetables by application of molybdenum. *Agro-environ. Prot.*, 20: 238-239.
- 285. Zhu H, Choi H-K, Cook DR, Shoemaker RC (2005)** Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology* 137: 1189–1196
- 286. Zimmer W, Mendel R.** 1999. Molybdenum Metabolism in Plants. *Plant biology* 1, 160-168. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-978502>
- 287. Zohary D. 1972.** The wild progenitor and the place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Economic Botany*. 26: 326–332.
- 288. Zurayk R, Adlan M, Baalbaki R, Saxena MC.**1998. Interactive effects of salinity and biological nitrogen fixation on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth. *Journal of Agronomy and Crop Science* **180**, 249-258.

Webographie

Anonyme 1: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>).

Anonyme 2: http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apect_techniques/rtpcr/frames_rtpcr.htm

Anonyme 3: http://www.mapageweb.umontreal.ca/bruneau/simon/chapitre11_1egumineuses2.pdf

Anonyme 4: <http://www.made-in-algeria.com/news/recolte-de-lentilles-6421.html>

Anonyme 5: <http://www.vulgaris-medical.com/actualite-sante/les-legumes-secs-0>

USDA, 2008; https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2008/

Anonyme 6: <http://www.campbellsfert.com.au/potassium-nitrate-ghg.aspx>

Les annexes

Table des matières des annexes

Annexe 1	II
Annexe 2	IX
Annexe 3	X
Annexe 4	XI
Annexe 5	XV
Annexe 6	XXII

ANNEXE 1 (Chapitre 2)

Les tableaux d'analyse ANOVA

1. La biomasse fraîche aérienne (BFA)

1.1. *Phaseolus vulgaris* L.

N.M.S	BFA <i>P.vulgaris</i>	Groupement
N+M-S6	4,170	A
N+M+S3	4,1150	A
N-M+S6	3,6400	A B
N-M-S6	3,050	B C
N+M+S9	2,930	B C D
N-M+S9	2,910	B C D
N-M+S3	2,730	C D E
N+M+S6	2,7250	C D E
N+M-S9	2,340	C D E F
N+M+S0	2,300	D E F
N-M-S9	2,135	E F
N+M-S0	1,710	F G
N-M-S0	1,365	G H
N-M+S0	1,310	G H
N-M-S3	1,2600	G H
N+M-S3	0,817	H

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	46,017	3,0678	15,59	0,000
Erreur	32	6,298	0,1968		
Total	47	52,315			

1.2 *Cicer arietinum* L.

N.M.S	BFA <i>C.arietinum</i>	Groupement
N-M-S3	1,5800	A
N-M+S0	1,435	A B
N-M+S6	1,4133	A B C
N+M+S3	1,3100	A B C D
N+M-S6	1,310	A B C D
N-M-S9	1,277	A B C D
N+M-S9	1,200	A B C D
N-M+S3	1,177	A B C D
N-M+S9	1,157	A B C D
N+M-S0	1,135	A B C D
N+M+S6	1,1300	A B C D
N-M-S6	0,980	B C D E
N+M-S3	0,817	C D E
N-M-S0	0,7900	D E
N+M+S9	0,7400	D E
N+M+S0	0,4900	E

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	3,800	0,2533	1,95	0,056
Erreur	32	4,161	0,1300		
Total	47	7,961			

1.3. *Lens culinaris M.*

N.M.S	BFA <i>L.culinaris</i>	Groupement
N-M+S3	0,7800	A
N+M+S6	0,5600	B
N-M+S6	0,4300	C
N+M-S6	0,3800	D
N-M-S9	0,3600	D
N-M+S9	0,2800	E
N-M-S6	0,2700	E F
N+M-S9	0,2500	F
N-M-S3	0,2500	F
N+M+S3	0,1600	G
N+M+S9	0,1000	H
N+M-S3	0,1000	H
N+M-S0	0,0900	HI
N-M+S0	0,0850	HI
N+M+S0	0,0650	IJ
N-M-S0	0,0550	J

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	1,84496	0,122997	471,37	0,000
Erreur	32	0,00835	0,000261		
Total	47	1,85331			

2. La chlorophylle (a+b)

2.1. *Phaseolus vulgaris L.*

N.M.S	Chl <i>P.vulgaris</i>	Groupement
N+M-S3	3,85683	A
N+M-S0	1,72632	B
N-M+S0	1,67873	C
N+M+S0	1,35189	D
N-M-S3	1,15772	E
N-M-S0	1,1056	F
N-M-S6	1,09477	F
N-M+S3	1,07258	G
N+M-S6	0,98685	H
N+M+S3	0,969046	I
N-M+S9	0,964193	I
N+M-S9	0,95866	I
N+M+S6	0,83398	J
N+M+S9	0,56619	K
N-M-S9	0,549007	L
N-M+S6	0,515903	M

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	27,7917	1,85278	28820,85	0,000
Erreur	32	0,0021	0,00006		
Total	47	27,7938			

2.2. Cicer arietinum L.

N.M.S	Chl <i>C.arietinum</i>	Groupement
N+M+S3	4,07001	A
N-M+S3	4,07001	A
N+M-S3	3,85683	B
N-M-S3	3,58345	C
N-M-S6	3,4567	D
N+M-S0	3,0818	E
N-M-S9	2,67013	F
N-M+S6	2,6277	G
N+M-S6	2,50457	H
N+M+S6	2,47150	H
N+M+S9	2,43225	I
N+M-S9	2,02408	J
N-M+S0	1,72901	K
N-M+S9	1,50245	L
N-M-S0	0,35073	M
N+M+S0	0,16862	N

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	63,2924	4,21949	8392,02	0,000
Erreur	32	0,0161	0,00050		
Total	47	63,3085			

2.3. Lens culinaris M.

N.M.S	Chl <i>L.culinaris</i>	Groupement
N-M+S3	1,84425	A
N+M-S0	1,20122	B
N+M+S6	1,18174	B
N+M-S6	1,01070	C
N-M+S6	0,8624	D
N-M+S0	0,767644	E
N-M-S9	0,74187	E F
N-M-S6	0,720556	F G
N-M-S3	0,70073	G
N-M+S9	0,69676	G
N+M-S3	0,46759	H
N+M+S3	0,412718	I
N+M-S9	0,406677	I
N+M+S0	0,302634	J
N+M+S9	0,179618	K
N-M-S0	0,11893	L

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	8,70117	0,580078	2164,24	0,000
Erreur	32	0,00858	0,000268		
Total	47	8,70975			

3. La chlorophylle a/b

3.1. Phaseolus vulgaris

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	0,138	0,009	92,060	< 0,0001
Erreur	32	0,003	0,000		
Total corrigé	47	0,142			

Modalité	Moyennes estimées	Groupes								
N+M+S0	0,267	A								
N-M-S0	0,257	A								
N+M-S9	0,256	A								
N+M-S0	0,227		B							
N-M+S0	0,216		B							
N-M+S3	0,195			C						
N+M-S3	0,185			C	D					
N-M+S9	0,175				D	E				
N-M-S9	0,166					E	F			
N-M+S6	0,166					E	F	G		
N+M-S6	0,158						F	G		
N-M-S6	0,155						F	G		
N-M-S3	0,149							G		
N+M+S6	0,111								H	
N+M+S3	0,105								H	
N+M+S9	0,080									I

3.2. Cicer arietinum

Analyse de la variance (Ch a/b) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	9,553	0,637	392,205	< 0,0001
Erreur	32	0,052	0,002		
Total corrigé	47	9,605			

Modalité	Moyennes estimées	Groupes			
N-M-S6	1,013	A			
N-M-S0	0,270			B	
N-M+S0	0,228			B	C
N-M-S9	0,197				C
N+M+S9	0,195				C
N-M-S3	0,188				C
N+M-S0	0,186				C
N+M-S3	0,185				C
N+M+S6	0,184				C
N+M-S9	0,184				C
N+M+S0	0,182				C
N+M-S6	0,182				C
N-M+S6	0,181				C
N-M+S9	0,181				C
N+M+S3	0,180				C
N-M+S3	0,180				C

3.3. Lens culinaris

Analyse de la variance (Ch a/b) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	0,293	0,020	99,829	< 0,0001
Erreur	32	0,006	0,000		
Total corrigé	47	0,299			

Modalité	Moyennes estimées	Groupes							
N+M+S9	0,456	A							
N+M+S3	0,344		B						
N+M-S9	0,324		B	C					
N+M-S3	0,313			C					
N-M+S9	0,305			C					
N-M-S9	0,262				D				
N-M+S6	0,259				D				
N-M-S6	0,254				D	E			
N-M-S3	0,247				D	E			
N+M-S0	0,235					E	F		
N-M+S0	0,231					E	F		
N+M-S6	0,221						F		
N+M+S6	0,216						F		
N-M+S3	0,213						F		
N-M-S0	0,140							G	
N+M+S0	0,114								H

4. L'activité de la nitrate réductase

4.1. Phaseolus vulgaris L.

N.M.S	ANR <i>P.vulgaris</i>	Groupement
N-M-S9	49,8013	A
N+M+S6	48,8808	B
N+M+S9	48,4489	C
N-M+S6	48,4135	C
N-M-S6	48,1020	D
N-M+S9	47,7692	E
N+M-S6	47,6275	E
N+M-S9	47,5143	E
N-M-S3	46,0698	F
N+M+S3	44,5758	G
N+M-S3	43,7119	H
N-M+S3	43,301	I
N+M+S0	41,4461	J
N-M+S0	40,851	K
N+M-S0	39,810	L
N-M-S0	3,254	M

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	5519,04	367,936	11583,29	0,000
Erreur	32	1,02	0,032		
Total	47	5520,06			

4.2. Cicer arietinum L.

N.M.S	ANR <i>C.arietinum</i>	Groupement
N-M+S6	49,57	A
N+M-S9	48,3569	B
N+M+S9	48,2011	B C
N-M-S9	47,9533	C
N-M+S9	47,6134	D
N+M-S6	47,5992	D
N-M-S6	47,1319	E
N+M+S6	46,8133	F
N+M+S3	46,1194	G
N-M+S3	46,1194	G
N-M-S3	43,9456	H
N+M-S3	43,7119	H
N-M-S0	43,3650	I
N-M+S0	40,554	J
N+M-S0	40,1008	K
N+M+S0	32,772	L

Les annexes

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	821,464	54,7643	2240,64	0,000
Erreur	32	0,782	0,0244		
Total	47	822,246			

4.3. *Lens culinaris M.*

N.M.S	ANR <i>L.culinaris</i>	Groupement
N-M-S0	49,74	A
N+M-S0	47,953	B
N-M-S9	47,03	C
N-M+S9	45,88	D
N-M+S0	45,879	D
N-M+S6	45,45	DE
N+M+S3	45,39	E
N+M+S6	44,77	F
N+M-S9	44,6395	F
N-M+S3	44,37	F
N+M+S0	44,363	F
N+M-S3	43,84	G
N-M-S6	43,82	G
N+M+S9	43,80	G
N+M-S6	43,46	G
N-M-S3	37,79	H

Analyse de variance

Source	DL	SomCar ajust	CM ajust	Valeur F	Valeur de p
Azote molybdène NaCl	15	289,905	19,3270	263,89	0,000
Erreur	32	2,344	0,0732		
Total	47	292,248			

ANNEXE 02 (Chapitre 2)

- Réactif de GRIESS I :

acide sulfanilique 0,5 g
acide acétique 50 ml
eau distillée q.s.p. 100 ml

Faire dissoudre l'acide sulfanilique dans l'eau distillée à chaud, ajouter 50 ml d'acide acétique et compléter à l'eau distillée.

- Réactif de GRIESS II :

alpha-naphtylamine 0,2 g
acide acétique 50 ml
eau distillée q.s.p. 100 ml

Il se dissout par agitation.

- Milieu d'incubation pour la nitrate réductase

nitrate de potassium 150 mM
propanol-1 3% (v/v) - tampon phosphate 100 mM
pH 7,5

- Milieu d'incubation pour la nitrite réductase

Nitrite de sodium 1,5 mM
propanol-1 3% (v/v) - tampon phosphate 100 mM
pH 7,5

- Tampon phosphate 100 mM, pH 7,5

16 ml de phosphate monosodique 200 mM
84 ml de phosphate disodique 200 mM
100 ml d'eau distillée

- Solution-mère de nitrite de sodium 1,5 g.l⁻¹

Dans propanol-1 3% (v/v) - tampon phosphate.

Expression des résultats

En utilisant les valeurs de D.O. obtenues avec les solutions d'étalonnage, tracer la courbe-étalon en plaçant en abscisses les concentrations en NO₂⁻ exprimées en µg.ml⁻¹ et en ordonnées les D.O. correspondantes.

Reporter sur cette courbe les valeurs de D.O. obtenues avec les solutions expérimentales préparées et calculer l'équation de la courbe-étalon et le coefficient de corrélation; en déduire les concentrations en NO₂⁻ des différents lots.

Exprimer l'activité de la nitrate réductase en µg de NO₂⁻ produit par g de matière fraîche et par heure (µg NO₂⁻ . (gMF)⁻¹ . h⁻¹) et en µmoles de NO₂⁻ produit par gramme de matière fraîche et par heure (µmoles NO₂⁻ . (g MF)⁻¹ . h⁻¹; PM NO₂⁻ = 46).

ANNEXE 3 (Chapitre 3)

La formule : concentration de protéine (DO*2 µl/ml)/0,1, et comme on a pris 5 µl donc ;
[Protéines totales] µg/µl = [(DO*2 µl/ml)/0,1]/5, et on prend un volume qui correspond à 80 µg de protéines. (Bradford, 1976)

Solutions pour gel polyacrylamide natifs:

- (Tris L) Lower Tris (4x): 36.34 g Tris in 200 ml, adjust with HCl to pH 8.8, filtrate
- (Tris U) Upper Tris (4x): 6.06 g Tris in 100 ml, adjust with HCl to pH 6.8, filtrate
- 10 x Tris/Glycin-running puffer: 35g Tris + 360 g Glycine in 2.5 liters, pH 8.8
- APS = ammonium persulfate
- native loading buffer: 2 M sucrose; 1% bromophenol blue

Staining of AO and XDH activities in native gels:

- equilibrate gel for 10-15 min in 250 mM Tris/HCl-buffer pH 8.5 for XDH staining
- alternatively equilibrate in 100 mM K-phosphate buffer pH 7.5 for AO staining (in plastic boxes, while gently shaking)
- during equilibration prepare staining solutions:

We usually prepare 10 ml of staining-solution for each gel of the given size (of course the volume depends on the size of the box used for staining)

XDH staining solution AO staining solution

3 mg 1-Naphthylaldehyde (final 1 mM)

5 mg Hypoxanthine 3 mg Indole-3-(carb)aldehyde (final 1 mM)

4 – 8 mg MTT 4 – 8 mg MTT

50 µl PMS (stock 10 mg/ml) 50 µl PMS (stock 10 mg/ml)

10 ml 250 mM Tris/HCl pH 8.5 10 ml 100 mM K-phosphate buffer pH 7.5

Solution d'induction: 0,5Mm sulfite de sodium dans le Tris

Solution stop: 3,2% formaldéhyde dans H₂O et 0.7 mM fuchsine dans 12% H₂SO₄ **Ajouter**

ANNEXE 4 (Chapitre 3)**Les tableaux d'analyse ANOVA****1. La concentration des protéines totales**

Modalité	Moyennes estimées	Erreur standard	Groupes
Shoots	2,535	0,112	A
Roots	0,869	0,129	B

Modalité	Moyennes estimées	Groupes
L.c	1,970	A
C.a	1,673	A B
P.v	1,463	B

1.1 Phaseolus vulgaris (P.v)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Organes	1	19,587	19,587	17,984	0,000
Traitement	3	0,723	0,241	0,221	0,881
organes*traitement	3	0,379	0,126	0,116	0,950

1.2. Cicer arietinum (C.a)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
organes	1	31,525	31,525	62,895	< 0,0001
traitement	3	0,173	0,058	0,115	0,950
organes*traitement	3	0,813	0,271	0,541	0,660

1.3. Lens culinaris (L.c)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
organes	1	9,277	9,277	26,283	< 0,0001
traitement	3	0,105	0,035	0,099	0,960
organes*traitement	3	0,204	0,068	0,192	0,900

2. L'activité de la xanthine déshydrogénase

Analyse Type I Sum of Squares (XDH) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
espèces	2	179271556,918	89635778,459	8,979	0,016
organe	1	136627819,199	136627819,199	13,687	0,010
traitement	3	1479623070,537	493207690,179	49,407	0,000
espèces*organe	2	81465036,143	40732518,072	4,080	0,076
espèces*traitement	6	231431765,378	38571960,896	3,864	0,062
organe*traitement	3	209397588,430	69799196,143	6,992	0,022

3. L'activité de l'aldéhyde oxydase

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
espèces	2	5333001,716	2666500,858	0,019	0,981
organe	1	2873086,429	2873086,429	0,021	0,890
traitement	3	162859672,098	54286557,366	0,392	0,763
espèces*organe	2	33939313,334	16969656,667	0,123	0,887
espèces*traitement	6	388944693,635	64824115,606	0,468	0,811
organe*traitement	3	327424346,511	109141448,837	0,789	0,543

4. L'activité de la sulfite oxydase

4.1 Phaseolus vulgaris (P.v)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
organes	1	10,359	10,359	219,427	< 0,0001
traitement	3	0,130	0,043	0,918	0,470
temps	4	16,538	4,134	87,581	< 0,0001
organes*traitement	3	0,094	0,031	0,664	0,595
organes*temps	3	2,108	0,703	14,884	0,001
traitement*temps	12	0,658	0,055	1,161	0,420

4.2. *Cicer arietinum* (C.a)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
organes	1	6,259	6,259	92,743	< 0,0001
traitement	3	0,444	0,148	2,193	0,159
temps	4	17,469	4,367	64,713	< 0,0001
organes*traitement	3	0,722	0,241	3,567	0,060
organes*temps	3	0,996	0,332	4,920	0,027
traitement*temps	12	0,997	0,083	1,231	0,385

4.3. *Lens culinaris* (L.c)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
organes	1	4,341	4,341	57,785	< 0,0001
traitement	3	0,075	0,025	0,333	0,802
temps	4	17,434	4,358	58,017	< 0,0001
organes*traitement	3	0,094	0,031	0,418	0,744
organes*temps	3	1,196	0,399	5,306	0,022
traitement*temps	12	0,473	0,039	0,525	0,852

5. L'activité de la nitrate réductase**5.1 *Phaseolus vulgaris* (P.v)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Traitement	3	0,003	0,001	6,327	0,002
temps	3	0,000	0,000	0,715	0,550
traitement*temps	9	0,000	0,000	0,336	0,956

5.2. *Cicer arietinum* (C.a)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	0,023	0,002	3,968	0,001
Erreur	32	0,012	0,000		
Total corrigé	47	0,035			

5.3. *Lens culinaris* (L.c)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	0,044	0,003	6,765	< 0,0001
Erreur	32	0,014	0,000		
Total corrigé	47	0,057			

Modalité	Moyennes estimées	Groupes	
L.c	0,099	A	
C.a	0,089		B
P.v	0,080		B

6. L'activité du molybdène cofacteur

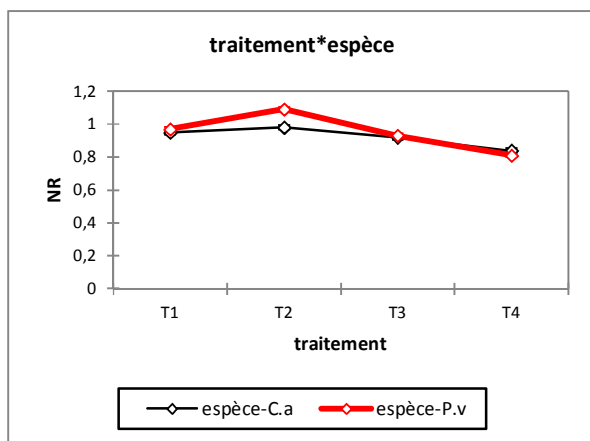
Analyse Type I Sum of Squares (act Nit1) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
espèces	2	0,127	0,063	30071,252	< 0,0001
traitement	3	0,421	0,140	66611,314	< 0,0001
espèces*traitement	6	1,074	0,179	84869,750	< 0,0001

Modalité	Moyennes estimées	Groupes		
P.v	0,455	A		
C.a	0,344		B	
L.c	0,318			C

ANNEXE 5 (Chapitre 5)

1. Expression des gènes NIA1 chez les deux espèces *P.vulgaris* et *C.arietinum*



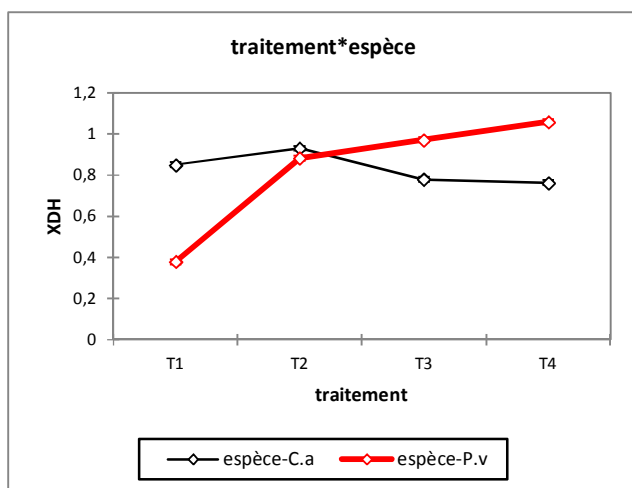
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
c.a	3	0,119	0,040	394,262	< 0,0001

P.v	Moyennes estimées	Groupes			
T2	1,089	A			
T1	0,969	B			
T3	0,929	C			
T4	0,810	D			

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
c.a	3	0,033	0,011	95,667	< 0,0001

C.a	Moyennes estimées	Groupes			
T2	0,980	A			
T1	0,950	B			
T3	0,918	C			
T4	0,838	D			

2. Expression des gènes XDH1 chez les deux espèces *P.vulgaris* et *C.arietinum*



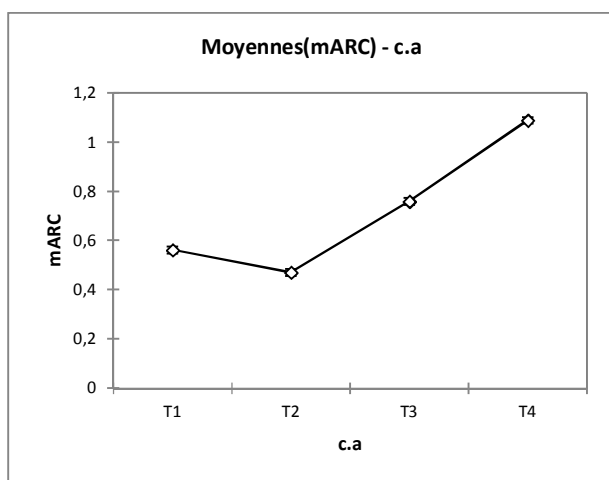
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
P.v	3	0,836	0,279	3218,049	< 0,0001

P.v	Moyennes estimées	Groupes			
T4	1,059	A			
T3	0,971	B			
T2	0,882	C			
T1	0,378	D			

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
c.a	3	0,053	0,018	152,048	< 0,0001

C.a	Moyennes estimées	Groupes			
T2	0,930	A			
T1	0,850	B			
T3	0,778	C			
T4	0,762	C			

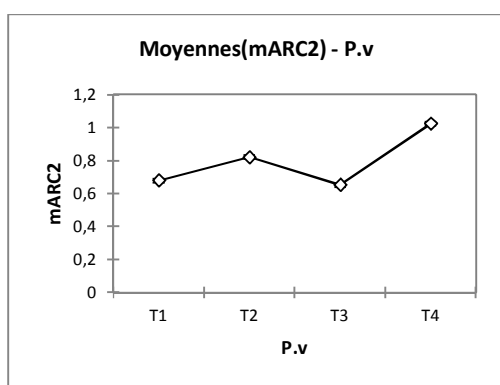
3. Expression des gènes mARC chez *C.arietinum*



Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
c.a	3	0,674	0,225	2268,773	< 0,0001

Modalité	Moyennes estimées	Groupes			
T4	1,088	A			
T3	0,759		B		
T1	0,561			C	
T2	0,471				D

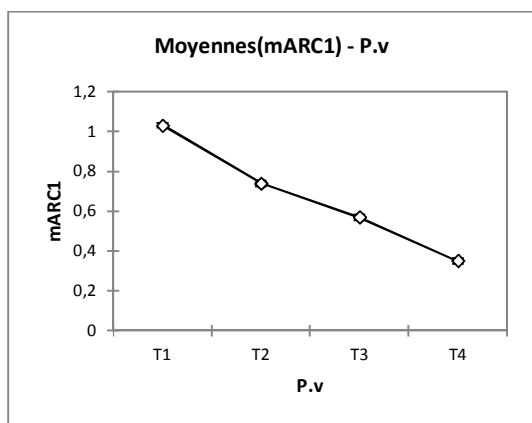
4. Expression des gènes mARC2 chez *P.vulgaris*



Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
P.v	3	0,258	0,086	1054,982	< 0,0001

Modalité	Moyennes estimées	Groupes		
T4	1,021	A		
T2	0,820		B	
T1	0,678			C
T3	0,651			D

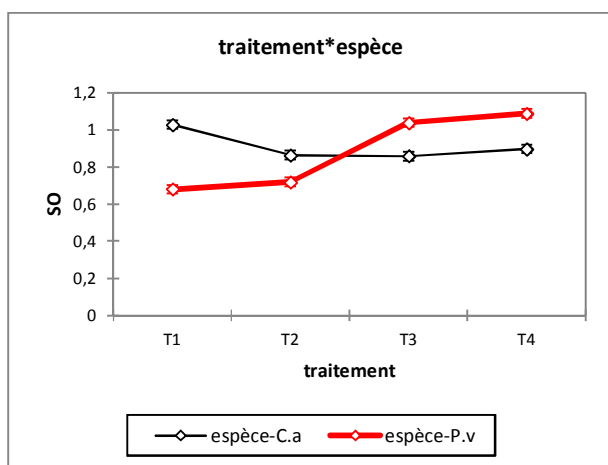
5. Expression des gènes mARC1 chez *P.vulgaris*



Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
P.v	3	0,742	0,247	2492,672	< 0,0001

Modalité	Moyennes estimées	Groupes		
T1	1,031	A		
T2	0,739		B	
T3	0,569			C
T4	0,350			D

6. Expression des gènes SO chez les deux espèces *P.vulgaris* et *C.arietinum*



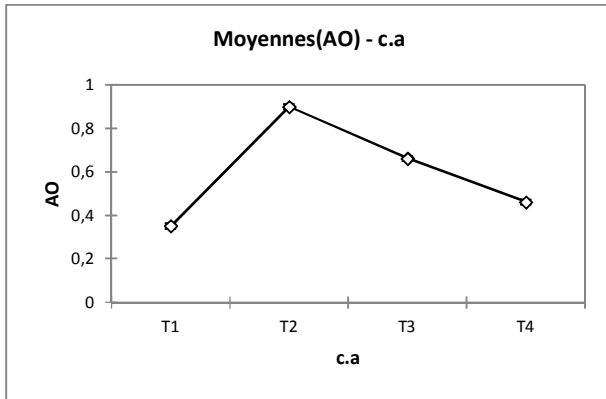
Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
P.v	3	0,405	0,135	1381,653	< 0,0001

P.v	Moyennes estimées	Groupes
T4	1,090	A
T3	1,039	B
T2	0,719	C
T1	0,680	D

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
c.a	3	0,056	0,019	28,936	0,000

C.a	Moyennes estimées	Groupes
T1	1,028	A
T4	0,898	B
T2	0,865	B
T3	0,858	B

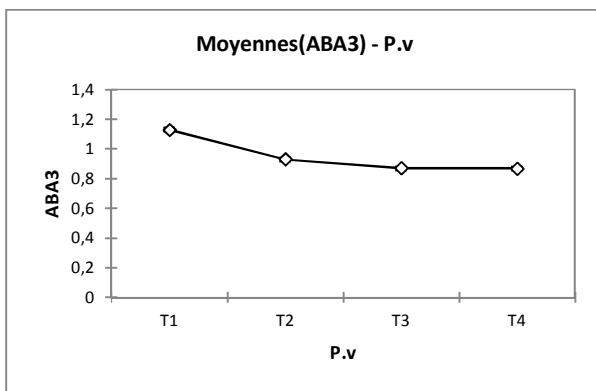
7. Expression des gènes AO chez *C.arietinum*



Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
c.a	3	0,523	0,174	2107,647	< 0,0001

AO	Moyennes estimées	Groupes
T2	0,900	A
T3	0,661	B
T4	0,462	C
T1	0,351	D

8. Expression des gènes ABA3/LOS5 chez *P.vulgaris*



Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
P.v	3	0,136	0,045	458,515	< 0,0001

ABA3	Moyennes estimées	Erreur standard	Groupes	
T1	1,130	0,006	A	
T2	0,929	0,006		B
T3	0,871	0,006		C
T4	0,870	0,006		C

Tampon de transfert - 25 mM Tris, 192 mM Glycin 10% Methanol

Tampon de migration pour gel SDS - 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, 2 mM EDTA

Tampon de migration pour native - 25 mM Tris, 192 mM Glycin

Appareil de western blot - BioRad TransBlot Turbo

Appareil d'électrophorèse - Hoefer MIGHTY SMALL SE250

le logiciel de camera pour les photo des gels: intas - intas science imaging GDS

Appareil de PCR thermocycler et Analytic jena FlexCycler

TAE - 0,04 M Trisacetat 0,001 M EDTA

ANNEXE 6**L'analyse de composante principale (ACP)****1. Activité enzymatique chez *Lens culinaris***

Variables	NR	[prot]	SO	MoCo	AO	XDH
NR	1	0,847	-0,313	-0,096	0,883	0,977
[prot]	0,847	1	-0,360	-0,497	0,555	0,928
SO	-0,313	-0,360	1	0,744	0,065	-0,430
MoCo	-0,096	-0,497	0,744	1	0,382	-0,302
AO	0,883	0,555	0,065	0,382	1	0,765
XDH	0,977	0,928	-0,430	-0,302	0,765	1

2. Expression des gènes chez *P.vulgaris*

Matrice de corrélation (Pearson (n)) :

Variables	NIA1	XDH1	SO	ABA3/LOS5	mARC1	mARC2
NIA1	1	-0,355	-0,801	0,349	0,659	-0,490
XDH1	-0,355	1	0,788	-0,995	-0,935	0,552
SO	-0,801	0,788	1	-0,807	-0,915	0,408
ABA3/LOS5	0,349	-0,995	-0,807	1	0,922	-0,473
mARC1	0,659	-0,935	-0,915	0,922	1	-0,674
mARC2	-0,490	0,552	0,408	-0,473	-0,674	1

3. Expression des gènes chez *C. arietinum*

Matrice de corrélation (Pearson (n)) :

Variables	NIA1	SO	XDH1	AAO3	mARC
NIA1	1	0,267	0,891	0,550	-0,993
SO	0,267	1	0,220	-0,622	-0,352
XDH	0,891	0,220	1	0,617	-0,850
AAO3	0,550	-0,622	0,617	1	-0,455
mARC	-0,993	-0,352	-0,850	-0,455	1

4. ACP activité enzymatique et expression des gènes***Phaseolus vulgaris***

Variables	NR	[prot]	SO	MoCo	AO	XDH	NIA1	XDH1	SO gène	ABA3/LOS5	mARC1	mARC2
NR	1	0,859	0,465	0,951	0,126	0,876	0,823	-0,807	-0,919	0,787	0,964	-0,733
[prot]	0,859	1	0,802	0,689	-0,328	0,833	0,971	-0,392	-0,744	0,363	0,692	-0,676
SO	0,465	0,802	1	0,171	-0,818	0,345	0,693	0,080	-0,201	-0,145	0,234	-0,685
MoCo	0,951	0,689	0,171	1	0,426	0,879	0,698	-0,911	-0,967	0,914	0,985	-0,550
AO	0,126	-0,328	-0,818	0,426	1	0,208	-0,217	-0,595	-0,387	0,659	0,355	0,325
XDH	0,876	0,833	0,345	0,879	0,208	1	0,910	-0,607	-0,966	0,628	0,810	-0,349
NIA1	0,823	0,971	0,693	0,698	-0,217	0,910	1	-0,355	-0,801	0,349	0,659	-0,490
XDH1	-0,807	-0,392	0,080	-0,911	-0,595	-0,607	-0,355	1	0,788	-0,995	-0,935	0,552
SO gène	-0,919	-0,744	-0,201	-0,967	-0,387	-0,966	-0,801	0,788	1	-0,807	-0,915	0,408
ABA3/LOS5	0,787	0,363	-0,145	0,914	0,659	0,628	0,349	-0,995	-0,807	1	0,922	-0,473
mARC1	0,964	0,692	0,234	0,985	0,355	0,810	0,659	-0,935	-0,915	0,922	1	-0,674
mARC2	-0,733	-0,676	-0,685	-0,550	0,325	-0,349	-0,490	0,552	0,408	-0,473	-0,674	1

Cicer arietinum

Variables	NR	[prot]	SO	MoCo	AO	XDH	NIA1	Gène SO	XDH1	AAO3	mARC
NR	1	0,870	-0,290	0,876	0,905	0,848	0,601	0,903	0,618	-0,231	-0,651
[prot]	0,870	1	0,217	0,901	0,839	0,622	0,238	0,996	0,156	-0,662	-0,330
SO	-0,290	0,217	1	-0,025	-0,203	-0,516	-0,779	0,149	-0,930	-0,850	0,704
MoCo	0,876	0,901	-0,025	1	0,984	0,863	0,580	0,890	0,374	-0,361	-0,666
AO	0,905	0,839	-0,203	0,984	1	0,939	0,710	0,840	0,531	-0,198	-0,781
XDH	0,848	0,622	-0,516	0,863	0,939	1	0,908	0,640	0,767	0,150	-0,944
NIA1	0,601	0,238	-0,779	0,580	0,710	0,908	1	0,267	0,891	0,550	-0,993
SO gène	0,903	0,996	0,149	0,890	0,840	0,640	0,267	1	0,220	-0,622	-0,352
XDH1	0,618	0,156	-0,930	0,374	0,531	0,767	0,891	0,220	1	0,617	-0,850
AAO3	-0,231	-0,662	-0,850	-0,361	-0,198	0,150	0,550	-0,622	0,617	1	-0,455
mARC	-0,651	-0,330	0,704	-0,666	-0,781	-0,944	-0,993	-0,352	-0,850	-0,455	1

Production scientifique

ISWEE'11

Enhancement of Saline Water for Irrigation of *Phaseolus vulgaris* L. Species in Presence of Molybdenum

Salha Bouzid*, Chaabane Rahmoune

*Ecotoxicology and Abiotic Stress laboratory, Department of Biology and Ecology,
SNV faculty, Mentouri University Constantine, Algeria*

Abstract

Salinity constitutes a major obstacle in the production and plant growth especially in the Mediterranean region where water quality plays a major role. In the Maghreb more than 30% of water for irrigation is loaded with salt, and it induces the reduction of growth and yield of sensitive varieties. So, research for plants adapted to high levels of salinity becomes an imperative for agricultural production.

The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important source of dietary protein in many developing countries but is considered as sensitive species to salinity compared to other vegetables. Molybdenum (Mo) is a trace element in soil, it is involved in the biosynthesis of several enzymes necessary for growth of most biological organisms, plants and animals.

We tried in our work to elucidate the effect of different concentrations of molybdenum (M0: 0, M1: 0.1ppm, M2: 0.2ppm and M3: 0.4ppm) by the addition of ammonium molybdate ((NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O) on seedlings of *Phaseolus vulgaris* Var. Djedida subjected to salt stress by providing five NaCl treatments (T0: 0, T1: 3g/l, T2: 6g/l, T3: 9g/l and T4: 12g/l) in water of irrigation.

To highlight the response of these seedlings we conducted an assay of total chlorophyll (Chl (a+b)) by spectrophotometer, and determination of the morphological parameters such as length and biomass of shoots and roots.

The bean plants are able to maintain an optimum level of total chlorophyll and their morphological parameters under the condition of mild salt stress (3g/l) but in the presence of molybdenum, it could alleviate the negative effect of NaCl. We concluded that the presence of molybdenum in concentrations of 0.1 and 0.2ppm in the culture medium of *Phaseolus vulgaris* irrigated with saline water increased the chlorophyll content and the plant biomass yield.

© 2012 Published by Elsevier Ltd. Selection and peer-review under responsibility of ISWEE'11

Open access under [CC BY-NC-ND license](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Keywords: saline water; *Phaseolus vulgaris*; molybdenum; chlorophyll; yield.

1. Introduction

Salinity constitutes a major obstacle in the production and plant growth especially in the Mediterranean region where water quality plays a major role. In the Maghreb more than 30% of water for irrigation is loaded with salt,

*Corresponding author. Tel.: +213 555 10 83 86; fax: +213 31 63 02 03

and it induces the reduction of growth and yield of sensitive varieties [1]. So research for plants adapted to high levels of salinity becomes an imperative for agricultural production [2].

The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an important source of dietary protein in many developing countries but is considered as sensitive species to salinity compared to other legumes [3].

Molybdenum is a trace element in soil; it is involved in the biosynthesis of several enzymes necessary for growth of most biological organisms plants and animals [4].

Molybdenum itself seems to be catalytically inactive in biological systems until is linked in a complex consisting of a unique pterin named Molybdenum cofactor (Moco). Molybdenum deficiency leads to a decrease in chlorophyll content in spinach leaves, Gupta (1997) reported chlorosis in plants due to the inability of plants to form chlorophyll caused by Mo deficiency [5].

2. Materials and methods

To illustrate the effect of molybdenum on plant bean yield submitted to salt stress, we used different concentrations of molybdenum (M0: 0, M1: 0.1ppm, M2: 0.2ppm and M3: 0.4ppm) by the addition of ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) on seedlings of *Phaseolus vulgaris* Var. djedida subjected to five NaCl treatments (T0: 0, T1: 3g/l, T2: 6g/l, T3: 9g/l and T4: 12g/l) in water of irrigation.

To highlight the response of these seedlings we conducted an assay of total chlorophyll (Chl(a+b)) by spectrophotometer, and determination of the morphological parameters such as length and biomass of shoots and roots.

3. Results and discussion

Abiotic stresses are responsible for yield losses estimated at 50% for most crops [6]. These stresses result in changes in morphological, physiological, biochemical and molecular level that affects negatively plant growth and productivity [7], [8], [9] and [10].

The bean is a sensitive species to salinity that reduces plant growth by 25% [11]. The bean is extremely sensitive to salinity and recorded yield losses in soils under 2 dsm-1 of salinity [12].

3.1. Dry shoot biomass (BSA)

Adding 0.4ppm of molybdenum to the soil in absence of salinity increased the dry biomass of shoot by 80%. The seedlings irrigated with (T1M2) give the highest average of dry shoot biomass with 0.562g which corresponds to 71% of increase compared to the control.

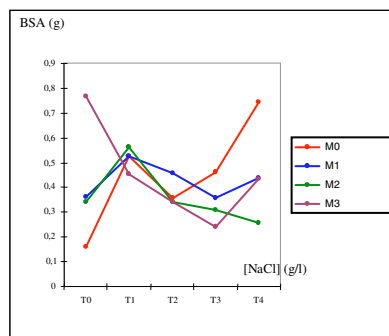


Fig. 1. Dry shoot biomass (BSA) of *Phaseolus vulgaris* treated with NaCl and Mo

3.2. Dry root biomass (BSR)

Salt stressed seedlings with 3g/l of NaCl have seen their root dry biomass (BSR) increased by 65% with value of 0.091g, and with 6g/l the BSR increased by 60% with a value of 0.088g, the treatments (M2T0) and (M2T1) give a mean BSR value of 0.078g which represents, an increase of 54% and 41% respectively compared to the control.

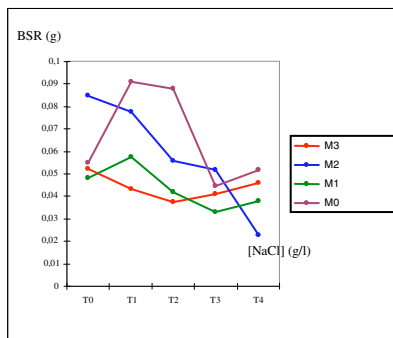


Fig. 2. Dry root biomass (BSR) of *Phaseolus vulgaris* treated with NaCl and Mo

3.3. Fresh shoot biomass (BPA)

In absence of salinity and the presence of 0.4 ppm of molybdenum, the fresh shoot biomass reaches the highest value of 5.257g which is five times higher compared to the control, and treatments (M1T1) give an average value of 4.511g of BPA which is four times higher compared to the control.

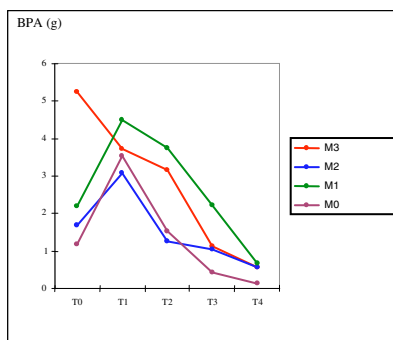


Fig. 3. Fresh shoot biomass (BPA) of *Phaseolus vulgaris* treated with NaCl and Mo

3.4. Fresh root biomass (BPR)

Seedlings irrigated with treatments (M0T2), give the highest mean of BPR with the value of 1.769g, that constitutes an increase of more than 100% compared to the control that is represented by the lowest value of 0.012g.

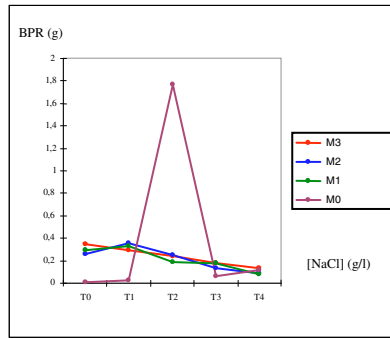


Fig. 4. Fresh root biomass (BPR) of *Phaseolus vulgaris* treated with NaCl and Mo

3.5. Shoot length (LPA)

Seedlings irrigated with treatments (M2T1) give a value of 18.833cm of shoot length, which constitutes an increase of 51%, compared to the control and it shows the positive effect of molybdenum on this species.

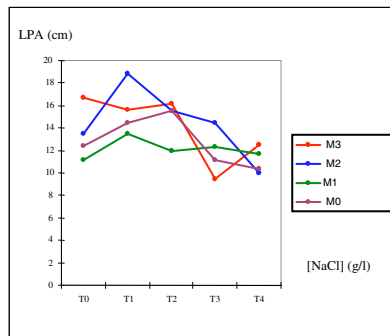


Fig. 5. Shoot length (LPA) of *Phaseolus vulgaris* treated with NaCl and Mo

3.6. Root length (LPS)

The first group dominating with a value of 16cm of root length is represented by seedlings treated by (M0T1) which represents an increase of 118% compared to the control which, with other treatments (M0T2 - M1T1), gave a mean of root length of 13cm and it constitutes an increase of 77% of the LPS. The presence of molybdenum in the soil culture of bean made and increase in root length to look for water in soil depth. This is one way for these plants to resist salinity.

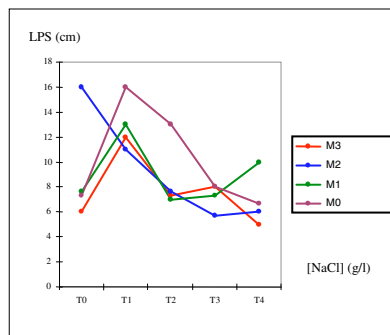


Fig. 6. Root length (LPS) of *Phaseolus vulgaris* treated with NaCl and Mo

The presence of 0.1ppm and 0.2ppm of molybdenum significantly increased shoot fresh biomass (BPA) of *Phaseolus vulgaris* Var. djedida, especially in the presence of salt stress with 3, 6 and 9g/l of NaCl. The root fresh biomass (BPR) takes the highest value in the absence of molybdenum and concentration of 6g/l of salt while the BPA decreased significantly under salt stress and increased by the presence of molybdenum that seems to match with other results [13]; the growth of clover shoot weight was reduced by 20% at 4g/l and 44% at 6g/l, and the development of root system was less sensitive [13].

The results we obtained show that the favorable effect of molybdenum on *Phaseolus vulgaris* Var. djedida seems obvious but we note that in some parameters such as (BSR, LPA and LPS), the addition of M3:0.4ppm would be toxic because it causes the decrease of these parameters Fig. 2, Fig 5, Fig 6. Other works about the action of molybdenum on bean and other plants show its positive effect.

Foliar fertilization of bean with molybdenum or molybdenum combined with boron in early flower bud formation resulted in an increase of 5% in seeds, compared with the control and increased 3% of seed weight per plant and seed yield [14].

The production of dry biomass and protein content in the *Trifolium pratense* L. species was significantly increased when the concentration of molybdenum increases in roots [15].

The combined application of P and Mo increased the root dry biomass. The application of Mo increased the concentration of Mo and P in the aerial part [16].

3.7. Total chlorophyll content ($chl(a+b)$)

The chlorophyll content of Seedlings treated with (M2T0) and (M1T2) reaches to 2.060 and 1.940 μ g/g MF respectively; this corresponds to an increase of 42% and 34% respectively compared to the control.

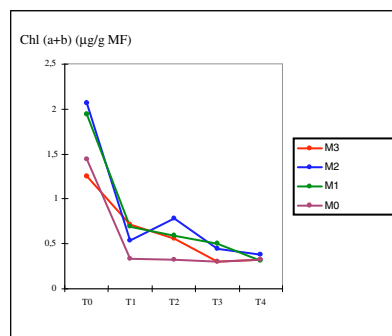


Fig.7. the chlorophyll (a+b) content of *Phaseolus vulgaris* treated with NaCl and Mo

The results obtained present the depressive effect of salt on the species with T3 and T4 concentrations that correspond to 9 and 12g/l NaCl, which matches with other studies [17], it was reported that under salinity conditions the chlorophyll content decreases and that decrease was significant in sensitive genotypes compared with tolerant ones [18]. In three cultivars of *Lycopersicon esculentum*, concentrations of chlorophyll a, b and total chlorophyll were reduced under salt stress [19].

It is shown that salinity (100 mM NaCl) of the medium reduces the photosynthetic capacity in leaves of *Phaseolus vulgaris* [20]. In our work the presence of molybdenum concentrations M1 and M2, which correspond to 0.1 and 0.2 ppm causes an increase in total chlorophyll, which is in concordance with other works.

The application of $(NH_4)_2MoO_4$ on plants of *Vicia faba* Var. major had increased the rate of total nitrogen, soluble sugars, chlorophyll content and photosynthesis rate. The growth of root nodules and nitrogen fixation were stimulated, and more assimilates were distributed to the seeds [21].

The application of Mo has a positive effect on the development of wheat, the yield of total plant nitrogen, saccharides, proteins, potassium and magnesium contents under severe water stress conditions [22].

4. Conclusion

The bean plants are able to maintain an optimum level of total chlorophyll and their morphological parameters under the condition of mild salt stress (3g/l) in the presence of molybdenum, it could alleviate the negative effect of NaCl.

We concluded that the presence of molybdenum in concentrations of 0.1 and 0.2ppm in the culture medium of *Phaseolus vulgaris* irrigated with saline water increased the chlorophyll content and the plant biomass yield.

References

- [1] Rahmoune C, Ben Naceur M, Cheikh-M'Hamed H, Maalam S. Les indicateurs précoces de tolérance à la salinité chez les blés durs. p.151. Biotech2008. XIes Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie. 30 juin-3 juillet 2008, Agrocampus Rennes. Rennes, France.2008. 215 p.
- [2] Arbaoui M, Benkhelifa M, Belkhouja M. Réponses physiologiques de quelques variétés de blé dur à la salinité au stade juvénile. *Option méditerranéenne* 2000. p.267-270.
- [3] Aydin A, Tusan M, Sezen Y. Effect of sodium salt on growth and nutrient uptake of spinach (*Spinacea oleracea*) and bean (*Phaseolus vulgaris*). 1997.
- [4] Kaiser B.N, Gridley K.L, Brady J.N, Phillips T, Tyerman S.D. The Role of Molybdenum in Agricultural Plant Production. *Annals of Botany* 2005;**96**: 745-754.
- [5] Hristoskova MV, Geneva M, Stancheva I. Response of pea plant (*Pisum sativum* L.) to reduce supply with molybdenum and copper. *International Journal of Agriculture & Biology* 2006; **8**: 218-220.
- [6] Vincent, R. Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune *Laminaria digitata*. Thèse de doctorat. Biologie. Université de Rennes I. 2006. 237p.
- [7] Ben Naceur M, Ben Salem M, Rahmoune C, Chrfi A, El Jaafari S, Paul R. Etude comparée du comportement de quelques variétés anciennes et quelques variétés nouvelles de blé dur (*Triticum durum* Defsf.) sous contrainte hydrique. *Annales de l'INRA* 1998;**71**: 251-273.
- [8] Ben Naceur M., Rahmoune C., Sdiri H., Maddah M., Selmi M. Effet du stress salin sur la germination, la croissance et la production en grains de quelques variétés maghrébines de blé. *Sécheresse* 2001;**12**: 167-174.
- [9] Semmadi A. et Rahmoune C. Influence de la pollution atmosphérique sur les rendements agricoles. *Rev. Sci. Technol* 1995;**6**: 31-41.
- [10] Wang W.X, Vinocur B, Shoseyov O. and Altman A. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort* 2001;**560**: 285-292
- [11] Khadri M, Pliego L, Soussi M, Lluich C, Ocana A. Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Agronomy* 2001;**21**: 635-643.
- [12] Gama P. B. S, Inanaga S, Tanaka K, Nakazawa R. Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. *African Journal of Biotechnology* 2007; **6**:079-088
- [13] Ben Khaled A, Morte Gomez A, Honrubia M, Oihabi A. Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le Rhizobium. *Agronomie* 2003;**23**:553-560.
- [14] Janeczek E, Kotecki A, Kozak m. effect of foliar fertilization with microelements on common bean (*phaseolus vulgaris*) development and seed yielding. *Electronic journal of polish agricultural universities* 2004;**7**:19 p.
- [15] Lopez R.S, Alvear M., Gianfreda L, De La Luz Mora M. Molybdenum availability in Andisols and its effects on biological parameters of soil and red clover (*Trifolium pratense* L.). *Soil science* 2007;**172**: 913-924.
- [16] Basak A, Mandal L. N, Haldar M. Interaction of phosphorus and molybdenum in relation to uptake and utilization of molybdenum, phosphorus, zinc, copper and manganese by rice. *Plant and Soil* 1982;**68**: 261-269
- [17] Ashraf M., Foolad M. R. Role of glycine betaine and protein in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* 2007;**59**:206-216.
- [18] Khan M.A, Shirazi M.U, Ali Khan M, Mujtaba S.M, Islam E, Mumtaz S, Shereen A, Yasin Ashraf M. Role of proline, K/Na ratio and chlorophyll content in salt tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Pak. J. Bot* 2009;**41**:633-638.
- [19] El-Ikhlil Y, Karrou M, Mrabet R, Benichou M. Effet du stress salin sur la variation de certains métabolites chez *Lycopersicon esculentum* et *Lycopersicon sheesmanii*. *Canadian journal of plant science* 2002;**82**:177-183.
- [20] Seemann J. R, Sharkey T. D. Salinity and nitrogen effects on photosynthesis, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant physiology* 1986;**82**:555-560.
- [21] Xia M. Z, Xiong F.Q. Interaction of molybdenum, phosphorus and potassium on yield in *Vicia faba*. *Journal of Agricultural Science* 1991;**117**:85-89.
- [22] Abd El Samad H.M, El Komy H.M, Shaddad M. A. K, Hetta A.M. Effect of molybdenum on nitrogenase and nitrate reductase activities of wheat inoculated with *Azospirillum brasilense* grown under drought stress. *Gen.Appl. Plant Physiology* 2005;**31**:43-54.



Effect of molybdenum and nitrogen on *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L. and *Lens culinaris* M. seedlings grown under salt stress

Bouزيد Salha*, Rahmoune Chaabane

Department of Plant Biology and Ecology, Faculty of Life and Nature Sciences, University of Mentouri Brothers, Constantine 1, Algeria

Key words: Molybdenum, Nitrogen, *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., *Lens culinaris* M., Nitrate Reductase.

<http://dx.doi.org/10.12692/ijb/8.6.34-42>

Article published on June 20, 2016

Abstract

The leguminous constitute an important food diet component especially in developing countries, they represent 90% of the global consumption, and they are very rich in proteins and relatively adapted to the Mediterranean climate. Soil nutrient deficiencies and salinity are the main factors which reduce plant production in the semi-arid and arid areas around the world. The plant material used is composed by three species from *Fabaceae*; *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L. and *Lens culinaris* M. seedlings that were grown in pots under different concentrations of NaCl (3 g/l, 6 g/l, 9 g/l), molybdenum (0,2 ppm) added as ammonium molybdate and nitrogen added as potassium nitrate (0,02 g/l). The fresh shoot, chlorophyll content and nitrate reductase activity were analyzed in order to estimate the effect of molybdenum (Mo) and nitrogen (N) on salt stressed plants. The effect of both molybdenum and nitrogen on lentil has not been well studied and especially for Algerian legumes This work shows the importance of molybdenum and nitrogen added to irrigation water to avoid the negative effect of sodium chloride and to enhance legume species tolerance to salt stress.

*Corresponding Author: Bouزيد Salha ✉ bouzidsalha@umc.edu.dz

Introduction

The availability of good quality of water is one of the major limiting factors for plant growth as irrigation water may often contain salts and ions that can have negative impacts on the plant growth and development. Salt water in the root zone induces osmotic changes and directly affect nutrient uptake as Na^+ reducing K^+ uptake or by Cl^- reducing NO_3^- uptake (Cornillon and Palloix 1997, Halperin *et al.*, 2003).

Soil salinity, resulting from natural processes or from crop irrigation with saline water, occurs in many arid to semi-arid regions of the world. (Lauchli and Epstein, 1990). In the Maghreb more than 30 % of irrigation waters are loaded in salt, and lead over time to an accumulation of toxins both in the rhizosphere and in the different parts of the plant. These toxins generate damage to cellular ultrastructures by contributing to the reduction of growth and yields of sensitive varieties. (Rahmoune *et al.*, 2008). In Algeria, 4/5 of the surface is desert and the 1/5 left is an arid and semi-arid region (Abdelguerfi and Ramdane, 2003).

The leguminous constitute an important food diet component especially in developing countries, they represent 90% of the global consumption (Hassan, 2006), they are very rich in proteins and complete often cereals in nutritional quality and they are relatively adapted to the Mediterranean climate. (Abdelguerfi and Ramdane, 2003).

Chickpea seeds are rich in proteins and minerals (Jain, 1977), common bean is a good source of energy, with high protein content, dietary fiber, complex carbohydrates and also provides folic acid (Edje *et al.*, 1980) and lentil is a major grain and widely distributed legume crop grown under a broad range of climates in many developing countries (Turk *et al.*, 2004)

The assimilatory nitrate reduction pathway is a vital biological process, as it is one of the principal routes by which inorganic nitrogen is incorporated into

organic compounds in higher plants, algae, and fungi. After uptake into cells by nitrate transporters, the first and rate-limiting step in this pathway is the reduction of nitrate to nitrite catalyzed by NAD(P)H:nitrate reductase (NR), a molybdenum cofactor (Moco) enzyme (Eckardt, 2005). Unavailability of Mo is lethal for the organism. But even if Mo is available for the cell, it seems to be biologically inactive until it becomes complexed to form Moco thus gaining biological activity. (Mendel and Bittner, 2006).

Mo and N may secondarily influence the growth and yield in legumes (Munns 1970; Bell *et al.*, 1989), Therefore, the molybdenum deficiency may show overall reductions in plant growth, poor pod and/or grain development as well as exposing the plant to pest damage (Graham and Stangoulis, 2005).

In literature there is a lack in studies about effect of both molybdenum and nitrogen on lentil and especially Algerian legumes submitted to salt stress, so we oriented our research in this way in order to evaluate the variations that occur on yield and on nitrate reductase activity in three leguminous species *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., and *Lens culinaris* M. the most cultivated food legumes species in Algeria (Abdelguerfi and Ramdane, 2003), in response to salt stress and with adding both molybdenum and nitrogen in water irrigation.

Materials and methods

Preparation of plant material

The plant material used is composed by three species from *Fabaceae* ; *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., and *Lens culinaris* M. seedlings, they were grown in pots under different concentrations of NaCl (So:0 g/l, S1:3 g/l, S2:6 g/l, S3:9 g/l), and with adding molybdenum (M+: 0,2 ppm, M-: 0 ppm) as Ammonium molybdate $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ and nitrogen as nitrate potassium (KNO_3) (N+: 0,02 g/l, N-: 0 g/l).

The treatments of sodium chloride (NaCl), molybdenum (Mo) and nitrogen (N) began after 3weeks of sowing the seeds and when they are all in the same development stage (the first leaves) and

lasted 5 weeks and then the seedlings are harvested.

Fresh shoot biomass

At the end of the 5 weeks treatment the fresh plants are harvested and then the areal parts biomass was measured with a balance

Chlorophyll content

The measurement of chlorophyll content (Chl) was realized according to McKinney, (1941), and it represents chlorophyll a plus chlorophyll b, the unit is ($\mu\text{g/g FM}$): microgram by gram of fresh material.

Nitrate reductase activity

The assay of estimation of in vivo nitrate reductase activity (NRA) on leaves were conducted according to a modified method of Ferrari and Varner (1981) and of Jaworski (1971) in Naman *et al.*,(1997), the unit is

$\mu\text{mol/h/g}$: micromole per hour by gram of fresh material.

Statistical analysis

The data obtained were assessed by one way anova, tables (1), (2) and (3) were obtained using the LSD of Fischer at the confidence level of 95%, using minitab system (se: standard error).

Results and discussion

Several biochemical processes are affected by salinity, particularly nitrate assimilation. Nitrate is the most significant source of nitrogen for crop plants, and frequently limits plant growth (Meloni *et al.*, 2004), the important molybdoenzymes, nitrate reductase (NR, EC 1.6.6.1) is catalyzing the initial step of the assimilatory nitrate reduction; (Koshiha *et al.*,1996 in Zimmer and Mendel, 1999).

Table 1. Fresh shoot biomass (FSB) of *Phaseolus vulgaris* (P.v), *Cicer arietinum* (C.a) and *Lens culinaris* (L.c) (Grp: statistical groups).

FSB (g)	P.v	se	Grp	C.a	se	Grp	L.c	se	Grp
N-M-S0	1.365	± 0.02	gh	0.79	± 0.05	de	0.055	± 0.04	j
N-M-S3	1.26	± 0.03	gh	1.58	± 0.15	a	0.25	± 0.07	f
N-M-S6	3.05	± 0.01	bc	0.98	± 0.07	bcde	0.27	± 0.06	ef
N-M-S9	2.135	± 0.19	ef	1.277	± 0.22	abcd	0.36	± 0.04	d
N-M+S0	1.31	± 0.31	gh	1.435	± 0.08	ab	0.085	± 0.01	hi
N-M+S3	2.73	± 0.51	cde	1.177	± 0.24	abcd	0.78	± 0.08	a
N-M+S6	3.64	± 0.16	ab	1.413	± 0.02	abc	0.43	± 0.04	c
N-M+S9	2.91	± 0.23	bcd	1.157	± 0.07	abcd	0.28	± 0.04	e
N+M-S0	1.71	± 0.34	fg	1.135	± 0.035	abcd	0.09	± 0.01	hi
N+M-S3	0.817	± 0.06	h	0.817	± 0.03	cde	0.11	± 0.02	h
N+M-S6	4.17	± 0.32	a	1.31	± 0.04	abcd	0.38	± 0.02	d
N+M-S9	2.34	± 0.21	cdef	1.2	± 0.07	abcd	0.25	± 0.03	f
N+M+S0	2.3	± 0.45	def	0.49	± 0.88	e	0.065	± 0.02	ij
N+M+S3	4.115	± 0.45	a	1.31	± 0.07	abvd	0.16	± 0.01	g
N+M+S6	2.725	± 0.75	cde	1.13	± 0.12	abcd	0.56	± 0.06	b
N+M+S9	2.93	± 0.96	bcd	0.74	± 0.07	de	0.1	± 0.02	h

Out of several nutrients provided to plants, nitrogen is a major and essential nutrient for better plant growth and yield. It is considered as most important nutrient for the crop to activate the metabolic activity and transformation of energy chlorophyll and protein synthesis and can constitute 40-50 of protoplasm of plant cell on dry weight basis and can be a limiting

factor under such condition (De, 1993, in Kaneez *et al.*, 2013)

Fresh shoot biomass

The important fresh biomass value for lentil is 0.78 g correspond to N-M+S3 treated plants; with molybdenum adding, which is more than 10 times

higher than the control plants that represent the lowest value.

Statistical results anova for chickpea showed that the difference between the mean values is not too much significant so we cannot define which element has the most important effect on fresh biomass seedlings (Table 1), it seems like neither molybdenum nor nitrogen have any specific effect on the fresh biomass for this species.

For common bean plants, results show a significant difference between the fresh shoot biomass values, the higher ones are 4.170 g and 4.115 g, which are 3times higher than control plants (N-M-So), these seedlings were submitted to these treatments N+M-S6 and N+M+S3 respectively, and which represent the same statistical group (a), these plants were grown on a medium containing nitrogen, 3 g/l and 6 g/l of NaCl.

Table 2. Chlorophyll content (Chl) of *Phaseolus vulgaris* (P.v), *Cicer arietinum* (C.a) and *Lens culinaris* (L.c).

Chl (µg/gFM)	P.v	se	Grp	C.a	se	Grp	L.c	se	Grp
N-M-So	1.106	± 0.021	f	0.351	± 0.004	m	0.119	± 0.003	l
N-M-S3	1.158	± 0.004	e	3.583	± 0.002	c	0.701	± 0.008	g
N-M-S6	1.095	± 0.001	f	3.457	± 0.069	d	0.721	± 0.001	fg
N-M-S9	0.549	± 0.001	l	2.67	± 0.001	f	0.742	± 0.002	ef
N-M+So	1.679	± 0.003	c	1.729	± 0.002	k	0.768	± 0.002	e
N-M+S3	1.073	± 0.002	g	4.08	± 0.004	a	1.844	± 0.003	a
N-M+S6	0.516	± 0.003	m	2.628	± 0.027	g	0.862	± 0.064	d
N-M+S9	0.964	± 0.001	i	1.502	± 0.001	l	0.697	± 0.004	g
N+M-So	1.726	± 0.006	b	3.082	± 0.048	e	1.201	± 0.003	b
N+M-S3	3.857	± 0.006	a	3.857	± 0.006	b	0.468	± 0.005	h
N+M-S6	0.987	± 0.013	h	2.505	± 0.001	h	1.011	± 0.005	c
N+M-S9	0.959	± 0.011	i	2.024	± 0.005	j	0.407	± 0.001	i
N+M+So	1.352	± 0.002	d	0.169	± 0.013	n	0.303	± 0.002	j
N+M+S3	0.969	± 0.004	i	4.07	± 0.004	a	0.413	± 0.001	i
N+M+S6	0.834	± 0.013	j	2.472	± 0.007	h	1.182	± 0.003	b
N+M+S9	0.566	± 0.003	k	2.432	± 0.001	i	0.18	± 0.002	k

Since these three plants have a higher biomass value in presence of sodium chloride salt in irrigation water, it lead us to say that these legumes are not so much sensitive to salt stress and they behave differently for bean it was the combination between molybdenum and nitrogen which gives the important shoot biomass, but for lentil adding only molybdenum enhance shoot biomass.

Chickpea which is known to be sensitive to salt stress (Tejera *et al.*, 2006) in this work chickpea seedlings behave as tolerant when grown under 3g/l of NaCl.

For bean plant biomass, adding nitrogen alone has no significant effect, but it seems that the combination of nitrogen and molybdenum has more positive effect and may adjust a damage that could caused by an

irrigation water moderately saline, abiotic stresses are responsible for yield losses estimated at 50% for most crops (Vincent, 2006). These stresses result in changes in morphological, physiological, biochemical and molecular level that affects negatively plant growth and productivity (Ben Naceur *et al.*, 1998), but the application of N fertilizers to growing plants under soil salinity conditions may increase their tolerance (Cordovilla *et al.*, 1994; Van Hoorn *et al.*,2000).

Sidari *et al.*,(2007) reported that four lentil (*Lens culinaris* M.) genotypes were treated with salt stress (0, 50, 100, 150 or 200 Mm NaCl), increasing NaCl concentration had reduced the germination percentage, the growth parameters and the relative water content. Since grain legumes especially lentil

are salt sensitive, farmers do not consider growing them in a saline environment, though; there is a considerable difference in salt tolerance among crops/accessions (Ahmed, 2009.), but for our lentil we observed that lentil could keep a higher level of shoot biomass at 3 g/l of sodium chloride but with molybdenum

Chlorophyll content

We observe that sodium chloride and molybdenum enhance chlorophyll content for the three species, for bean plants, the important chlorophyll content value was 3,857 $\mu\text{g/g}$ FM (Table 2) registered for seedlings submitted to these treatment N+M-S3 (Table 2) which is 3 times higher than control plants (1.106

$\mu\text{g/g}$ FM), we note that these seedlings were grown on a soil moderately saline and with nitrogen, for chickpea plants, the superior value is 4.070 $\mu\text{g/g}$ FM and 4.080 $\mu\text{g/g}$ FM (10 times higher than control plants with only 0.351 $\mu\text{g/g}$ FM) observed in plants grown on soil containing 3g/l and with the presence of molybdenum. Lentil plants recorded a higher value of chlorophyll content with 1.844 $\mu\text{g/g}$ FM (which is much more than 10 times the control plants), where there is a moderate salt stress (3 g/l) but when molybdenum is present in water irrigation also. We note that for lentil and chickpea adding molybdenum alone enhance considerably chlorophyll content, but for bean it was the nitrogen which gives the important one.

Table 3. Nitrate reductase activity (NRA) of *Phaseolus vulgaris* (P.v), *Cicer arietinum* (C.a) and *Lens culinaris* (L.c)s.

NRA($\mu\text{mol/h/g}$)	P.v	se	Grp	C.a	se	Grp	L.c	se	Grp
N-M-So	33.254	± 0.168	m	43.365	± 0.054	i	49.74	± 0.037	a
N-M-S3	46.07	± 0.153	f	43.946	± 0.169	h	37.79	± 0.053	h
N-M-S6	48.102	± 0.032	d	47.132	± 0.037	e	43.82	± 0.077	g
N-M-S9	49.801	± 0.025	a	47.953	± 0.032	c	47.03	± 0.496	c
N-M+So	40.851	± 0.59	k	40.554	± 0.466	j	45.879	± 0.22	d
N-M+S3	43.301	± 0.239	i	46.119	± 0.086	g	44.37	± 0.086	f
N-M+S6	48.414	± 0.032	c	49.57	± 0.042	a	45.45	± 0.075	de
N-M+S9	47.769	± 0.037	e	47.613	± 0.032	d	45.88	± 0.077	d
N+M-So	39.81	± 0.193	l	40.101	± 0.093	k	47.953	± 0.798	b
N+M-S3	43.712	± 0.085	h	43.712	± 0.085	h	43.84	± 0.074	g
N+M-S6	47.628	± 0.054	e	47.599	± 0.077	d	43.46	± 0.085	g
N+M-S9	47.514	± 0.077	e	48.357	± 0.032	b	44.64	± 0.013	f
N+M+So	41.446	± 0.075	j	32.772	± 0.295	l	44.363	± 0.687	f
N+M+S3	44.576	± 0.068	g	46.119	± 0.086	g	45.39	± 0.065	e
N+M+S6	48.881	± 0.08	b	46.813	± 0.112	f	44.77	± 0.064	f
N+M+S9	48.449	± 0.074	c	48.201	± 0.044	bc	43.8	± 0.032	g

Salinity is one of the most important environmental factors limiting production and biological N₂ fixation of chickpea which is considered to be sensitive to salt stress, in arid and semiarid regions. Several studies were carried out on chickpeas (Zurayk *et al.*, 1998, Soussi *et al.*, 1998, Welfare *et al.*, 2002, Singla and Garg 2005, Garg and Singla, 2009), but in this work chickpea seems to tolerate moderate salt stress (3g/l)

in presence of nitrogen and molybdenum, and another work realized on chlorosis, it showed that is due to incapacity of plants to form chlorophyll because of molybdenum deficiency (Gupta, 1997 in Hristoskova *et al.*, 2006), so molybdenum has a role in biosynthesis of chlorophyll, because under molybdenum deficiency, intermediates of chlorophyll biosynthesis decrease in winter wheat cultivar (Yu *et*

al., 2006), so adding molybdenum and nitrogen in a saline soil can avoid the negative effect of salt stress on chlorophyll biosynthesis for chickpea, bean and lentil plants.

Nitrate reductase activity

Table 3 shows that NR activity increases as NaCl concentrations in water irrigation increase for both chickpea and bean plants with 49.80 $\mu\text{mol/h/g}$ (N-M-S9) and 49.57 $\mu\text{mol/h/g}$ (N-M+S6) respectively, for lentil, the highest value of NRA is recorded for the control plants 49.74 $\mu\text{mol/h/g}$.

There are currently contradictory reports regarding salinity effects on NR activity and nitrate assimilation. Several study have shown that salinity decreases NR activity (Aslam *et al.*, 1984; Martinez & Cerda, 1989; Gouia *et al.*, 1994 in Silveira *et al.*, (1999)), whereas others have shown opposite results (Misra & Dwivedi, 1990; Sargi *et al.*, 1997 in Silveira *et al.*, (1999)) or have not observed significant effects on NR activity (Bourgeois- Chaillou *et al.*, 1992; Cramer & Lips, 1995 in Silveira *et al.*, (1999)). Most likely, the salinity effects depend on many other factors such as plant species, NO_3^- level, stress intensity, plant age etc. (Silveira *et al.*, 1999).

For our bean and chickpea plant, it seems that the expression of nitrate reductase activity in shoot is higher as the salt stress is the most pronounced which correspond to a work done on cumin, drought stress increased nitrate reductase activity in cumin root and shoot (Sepehr *et al.*, 2012), but for lentil plants it is completely opposite, the NRA level decrease when salt stress increases, several studies have reported that nitrate uptake and nitrate reductase activity (NRA) decrease in plants under salt stress (Rao and Gnaham 1990, Gouia *et al.*, 1994, in Meloni *et al.*, 2004). Drought tolerance of *S. aculeata* was found to be associated with a smaller reduction in number and mass of root nodules, a high activity of nitrate reductase in leaves and nodules, high accumulation of free proline in roots and nodules, and high glycine betaine content in nodules. (Ashraf and Iram, 2005). Molybdenum (Mo), a constituent of nitrogenase (NA)

and nitrate reductase (NR), is required for the assimilation of soil nitrates. (Bishop and Premakumar, 1992).

Mo application on a leguminous (*Chamaecrista rotundifolia* cv. 'Wynn') grown on red soil, could increase the number of chloroplasts and activities of nitrate reductase in leaf (Weng *et al.*, 2009), salinity induced by 100 mM NaCl in cowpea plants may have induced the decrease on leaf-NR activity (Silveira *et al.*, 1999), 600 mmol.L^{-1} NaCl caused a significant reduction in root and shoot growth, and nitrate reductase activity in leaves and roots were also decreased in *Prosopis alba*. (Meloni *et al.*, 2004), molybdenum application positively affected wheat growth and increased nitrate reductase activity (Abd El-Samad *et al.*, 2005). The supply of molybdenum to *Salicornia* grown in seawater enhances plant biomass accumulation by increasing the activities of nitrate reductase (Ventura *et al.*, 2010). The application of KNO_3 significantly increased leaf area, its fresh and dry weight per plant, and NR activity in leaves irrespective to the growth of plant under non saline or saline conditions (Jabeen and Ahmad, 2011).

These results (Table 1, Table 2, Table 3) indicate that bean, lentil and chickpea plants could be tolerant to a moderate salt stress (3g/l) but behave differently in presence of nitrogen and molybdenum, it corresponds to a previous work that showed that common bean plants are able to maintain an optimum level of morphological parameters and chlorophyll content under mild salt stress of (3g/l) in the presence of molybdenum, (Bouزيد and Rahmoune, 2012).

Conclusion

As concluding remarks, the presence of molybdenum and nitrogen together caused the increase of nitrate reductase activity in bean and chickpea plants grown under salt stress. Both molybdenum and nitrogen have a positive effect on yield and nitrate reductase activity for these three plant species that behave differently considering tolerance to salt stress, they could maintain a good yield level at 3 g/l of sodium chloride.

References

Abd El Samad HM, El Komy HM, Shaddad MAK, Hetta AM. 2005. Effect of molybdenum on nitrogenase and nitrate reductase activities of wheat inoculated with *Azospirillum brasilense* grown under drought stress. *General and Applied Plant Physiology* **31(1-2)**, 43-54.

Abdelaguerfi A, Ramdane SA. 2003. Evaluation Des Besoins En Matière De Renforcement Des Capacités Nécessaires A La Conservation Et L'utilisation Durable De La Biodiversité Importante Pour L'agriculture. Bilans des Expertises sur «La Biodiversité Importante pour l'Agriculture en Algérie» MATE-GEF/PNUD : Projet ALG/97/G31. P11.

Ahmed S. 2009. Effect of soil salinity on the yield and yield components of Mung bean. *Pakistan Journal of Botany* **4(1)**, 263-268.

Ashraf M, Iram A. 2005. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Flora* **200**, 535-546.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.flora.2005.06.005>

Bell W, Edwards DG, Asher CJ. 1989. External calcium requirements for growth and nodulation of six tropical food legumes grown in flowing solution culture. *Australian Journal of Agricultural Research* **40**, 85-96.

Ben Naceur M, Ben Salem M, Rahmoune C, Chorfi A, El Jaafari S, Paul R. 1998. Etude comparée du comportement de quelques variétés anciennes et quelques variétés nouvelles de blé dur (*Triticum durum* Desf.) sous contrainte hydrique. *Annales de l'INRA*, **71**, 251-273.

Bishop PE, Premakumar R. 1992. Alternative Nitrogen Fixation Systems. In *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G., Roberts, G.P. and D.J. Evans, (Eds.) New York: Chapman & Hill, 736-762.

Bortels H. 1930. Molybdän als Katalysator bei der

biologischen Stickstoffbindung. *Archiv für Mikrobiologie* **1**, 333-342.

Bouid S, Rahmoune C. 2012. Enhancement of Saline Water for Irrigation of *Phaseolus vulgaris* L. Species in Presence of Molybdenum. *Procedia Engineering* **33**, 168 – 173.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2012.01.1190>

Cordovilla MP, Ligerio F, Lluch C. 1994. The effect of salinity on nitrogen fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1483-1488.
<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/45.10.1483>

Cornillon P, Palloix A. 1997. Influence of sodium chloride on the growth and mineral nutrition of pepper cultivars. *Journal of Plant Nutrition* **20**, 1085-1094.
<http://dx.doi.org/10.1080/01904169709365320>

Eckardt NA. 2005. Moco mojo: crystal structure reveals essential features of Eukaryotic assimilatory nitrate reduction. *The Plant Cell* **17**, 1029-1031.
<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.105.032326>

Edje OT, Mughogho LK, Rao YP, Msuku WAB. 1980. Bean production in Malawi. In *Potential for field beans in Eastern Africa*. Proceedings of a Regional Workshop held in Lilongwe, Malawi, 9-14.

Garg N, Singla R. 2009. Variability in the response of chickpea cultivars to short-term salinity, in terms of water retention capacity, membrane permeability and osmo-protection. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **33**, 57-63.

Graham RD, Stangoulis JRS. 2005. Molybdenum and disease. In: *Mineral nutrition and plant diseases* (Dantoff L, Elmer W, Huber D. Eds) St Paul, MN: APS Press.

Halperin ST, Gilroy S, Lynch JP. 2003. Sodium chloride reduces growth and cytosolic calcium, but does not affect cytosolic pH, in root hairs of

Arabidopsis thaliana L. Journal of Experimental Botany **54**, 1269-1280.

<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erg134>

Hassan F. 2006. Heterologous expression of a recombinant chitinase from *Streptomyces olivaceoviridis* ATCC 11238 in Transgenic Pea (*Pisum sativum* L.). Doctorate thesis, University of Damas, Syria.

Hristoskova MV, Geneva M, Stancheva I. 2006. Response of pea plant (*Pisum sativum* L.) to reduce supply with molybdenum and copper. International Journal of Agriculture and Biology **08 (2)**, 218-220.

Jabeen N, Ahmad R. 2011. Foliar Application of Potassium Nitrate Affects the Growth and Nitrate Reductase Activity in Sunflower and Safflower Leaves under Salinity. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca **39(2)**, 172-178.

Jain HK. 1977. Centers of diversity, genetics variability and components of yield and plant type in chickpea. F.A.O. Plant protection and production, 9 p.) Journal of Experimental Botany **53(375)**, 1689-1698.

Kaneez F, Nazir H, Pir FA, Mohd M. 2013. Effect of nitrogen and phosphorus on growth and yield of Lentil (*Lens culinaris*). Elixir Applied Botany **57**, 14323-14325.

McKinney C. 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. Journal of Biological Chemistry **140**, 315-322.

Meloni DA, Gulotta MR, Martínez CA, Oliva MA. 2004. The effects of salt stress on growth, nitrate reduction and proline and glycinebetaine accumulation in *Prosopis alba*. Brazilian Journal of Plant Physiology **16(1)**, 39-46.
<http://dx.doi.org/10.1590/S167704202004000100006>

Mendel RR, Bittner F. (2006). Cell biology of

molybdenum. Biochimica Biophysica Acta **1763(7)**, 621-35.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.03.013>

Munns DN. 1970. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium and pH requirements during infection. Plant Soil **32**, 90-102.

Naman F, Zaoui D, Ouaka A, Chraïbi A. 1997. Mesures in vivo et in vitro de l'activité nitrate réductase dans les feuilles de la betterave à sucre (*Beta vulgaris* var. *Maghribel*). Actes Institut Agronomique et vétérinaire **17(2)**, 95-101.

Rahmoune C, Ben Naceur M, Cheikh-M'Hamed H, Maalam S. 2008. Les indicateurs précoces de tolérance à la salinité chez les blés durs. Biotech2008. XIes Journées Scientifiques du réseau "Biotechnologies végétales / Amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'Agence universitaire de la Francophonie. Rennes, France. p.151.

Sepehr MF, Ghorbanly M, Amini F. 2012. Effect of water stress on nitrate reductase activity and nitrogen and phosphorus content in *Cuminum cyminum* L. Pakistan Journal of Botany **44(3)**, 899-903.

Shannon M, Crieve M, Francois LE. 1994. Whole-plant response to salinity. In Plant Environment Interactions, Ed. R.E. Wilkinson, Marcel Dekker Inc., New York, 199-244.

Sidari M, Muscolo A, Anastasi U, Preiti G and Santonoceto C. 2007. Response of four genotypes of lentil to salt stress conditions. Seed Science and Technology **35**, 497-503.

<http://dx.doi.org/10.15258/sst.2007.35.2.24>

Silveira JAG, De Cardoso B, Melo ARB, De Viegas RA. 1999. Salt-induced decrease in nitrate uptake and assimilation in cowpea plants. Brazilian Journal of Plant Physiology **11(2)**, 77-82.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00095-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00095-8)

- Singla R, Garg N.** 2005. Influence of salinity on growth and yield attributes in chickpea cultivars. Turkish Journal of Agriculture and Forestry **29**, 231-235.
- Soussi M, Ocana A, Lluch C.** 1998. Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick-pea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Experimental Botany **49**, 1329-1337.
<http://dx.doi.org/10.1093/jxb/49.325.1329>
- Tejera NA, Soussi M, Lluch C.** 2006. Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. Environmental and Experimental Botany **58**, 17-24.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.007>
- Turk MA, Tawaha ARM, Lee KD.** 2004. Seed germination and seedling growth of three lentil cultivars under moisture stress. Asian Journal of Plant Sciences **3**, 394-397.
<http://dx.doi.org/10.3923/ajps.2004.394.397>
- Van Hoorn J W, Katerji N, Hamdy A, Mastrorilli M.** 2000. Effect of salinity on yield and nitrogen uptake of four grain legumes and on biological nitrogen contribution from the soil. Agricultural Water Management **51**, 87-98.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3774\(01\)00114-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-3774(01)00114-7)
- Ventura Y, Wuddineh WA, Ephrath Y, Shpigel M, Sagi M.** 2010. Molybdenum as an essential element for improving total yield in seawater-grown *Salicornia europaea* L. Scientia Horticulturae **126**, 395-401.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.015>
- Vincent R.** 2006. Recherche et étude de marqueurs moléculaires de la réponse au stress chez l'algue brune *Laminaria digitata*. Thèse de doctorat. Biologie. Université de Rennes 1. 237p. France.
- Welfare K, Yeo AR, Flowers TJ.** 2002. Effects of salinity and ozone, individually and in combination, on the growth and ion contents of two chickpea (*Cicer arietinum* L.) varieties. Environmental Pollution **120**, 397-403.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00109-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00109-4)
- Weng BQ, Huang DF, Xiong DZ, Wang YX, Luo T, Ying ZY, Wang HP.** 2009. Effects of Molybdenum Application on Plant Growth, Molybdoenzyme Activity and Mesophyll Cell Ultrastructure of Round Leaf Cassia in Red Soil. Journal of Plant Nutrition **32(11)**, 1941 - 1955.
<http://dx.doi.org/10.1080/01904160903242409>
- Yu M, Hu CX, Wang YH.** 2006. Effect of Molybdenum on the intermediate of chlorophyll biosynthesis of winter wheat cultivars under low temperature. Agricultural Sciences in China **5(9)**, 670-677.
- Zimmer W, Mendel R.** 1999. Molybdenum Metabolism in Plants. Plant biology **1**, 160-168.
<http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-978502>
- Zurayk R, Adlan M, Baalbaki R, Saxena MC.** 1998. Interactive effects of salinity and biological nitrogen fixation on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth. Journal of Agronomy and Crop Science **180**, 249-258.

Nom et Prénom : BOUZID Salha
Doctorat en sciences
Filière : Biologie Végétale
Option : Ecophysiologie et Biotechnologie Végétale

THEME
ETUDE DE L'EFFET DE L'INTERACTION DU MOLYBDENE AVEC L'AZOTE CHEZ
LES FABACEES CULTIVEES EN MILIEU SALIN

Résumé

En Algérie, les légumineuses constituent une importante composante d'aliments nutritifs, elles sont très riches en protéines. Le molybdène possède un rôle important dans plusieurs processus biologiques chez les plantes supérieures d'où l'intérêt de notre recherche sur les trois espèces de légumineuses (le haricot, le pois chiche et la lentille) en condition de stress salin et en présence du molybdène et de l'azote.

En condition de stress salin (3g/l de NaCl), la combinaison du molybdène et de l'azote conduit à une augmentation de la biomasse fraîche aérienne et le taux de la chlorophylle (a+b) chez les 3 espèces. Le molybdène et l'azote stimulent la synthèse des protéines totales chez le haricot mais chez les racines du pois chiche et la lentille, c'est le stress salin qui cause leur augmentation.

Dans la partie aérienne du haricot et du pois chiche, l'activité de la xanthine déshydrogénase est stimulée par l'apport du molybdène et de l'azote.

L'activité de l'aldéhyde oxydase est stimulée dans la partie aérienne du haricot par l'apport du molybdène et de l'azote, et dans les racines de la lentille en condition de stress salin.

La sulfite oxydase possède une activité qui diminue avec le temps et est affectée par le stress salin.

L'activité de la nitrate réductase augmente avec le temps mais elle est affectée par le stress salin.

L'activité du molybdène cofacteur diminue à cause du stress salin à part pour la lentille qui augmente. Pour le haricot, les gènes de la sulfite oxydase et la xanthine déshydrogénase possèdent un rôle dans l'adaptation au stress salin.

L'expression des gènes mARC chez le pois chiche et mARC2 chez le haricot est stimulée en condition de stress salin ce qui leur donne un rôle dans l'adaptation au stress salin.

Les mots clés : molybdène, azote, stress salin, *Phaseolus vulgaris* L., *Cicer arietinum* L., *Lens culinaris* M., molybdoenzymes, RT-PCR.

Devant le jury :

Présidente : Mme BOUDOUR Leila

Pr. Université Mentouri Constantine 1

Directeur de thèse : Mr RAHMOUNE Chaabane

Pr. Université Mentouri Constantine 1

Examineurs:

Mme MEKSEM Leila

Pr. Université Badji Mokhtar Annaba

Mme OUAHRANI Ghania

Pr. Université de Ferhat Abbas Sétif

Mr BRINIS Louhichi

Pr. Université Badji Mokhtar Annaba

Mr BAZRI Kamel Eddine

MCA. Université Frères Mentouri Constantine 1

2016 / 2017