

AMÉLIORATION DE LA TOLÉRANCE DU BLÉ TENDRE AU STRESS HYDRIQUE PAR APPORT DE LA PROLINE

BEKKA Selma^{1,2*}

1. Laboratoire Alimentation, Transformation, Contrôle et Valorisation des Agro-ressources, Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires. Avenue Ahmed Hamidouche, Beaulieu Oued Smar 16200 Alger, Algérie.

2. Laboratoire de physiologie végétale, Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, Bab Ezzouar, Alger, Algérie..

Reçu le 21/08/2021, Révisé le 26/11/2021, Accepté le 18/12/2021

Résumé

Description du sujet : L'implication de la proline dans la tolérance des plantes aux stress a attiré l'attention des chercheurs sur son utilisation afin de maintenir une bonne production végétale en conditions de déficit hydrique.

Objectifs : Le présent travail, s'inscrit dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes de tolérance et/ou de résistance du blé tendre par rajout de proline en conditions de stress hydrique.

Méthodes : Les plantes de blé tendre variété HD1200 sont traitées par la proline exogène (à une concentration de 6 mM) en situation de stress hydrique sévère simulé par le polyéthylène glycol (PEG-6000) à 30% correspondant à -1,027 MPa. Les plantes traitées par la proline en solution, en conditions stressantes et non stressantes ont été comparées à des témoins.

Résultats : Les résultats obtenus ont démontré que le stress hydrique a affecté négativement la croissance et la physiologie du blé tendre, en conduisant à une baisse de la teneur relative en eau (TRE) et la conductance stomatique. *A contrario*, il a été enregistré une accumulation accrue en sucres ethanolo-solubles, en acides aminés totaux et en proline libre endogène au niveau des feuilles et des racines du blé tendre, ce qui peut atténuer les effets de ce stress. La contrainte hydrique a également entraîné une augmentation significative de l'activité de l'enzyme pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS). Nos résultats ont par ailleurs, montré que l'apport de la proline en conditions stressantes a amélioré la croissance des plantes de blé tendre comparativement aux mêmes conditions hydriques sans apport de proline. Cet effet bénéfique sur la croissance est accompagné par une TRE plus élevée et une forte accumulation de proline libre endogène.

Conclusion : A travers cette étude, l'intérêt de l'application de la proline exogène dans l'amélioration la tolérance de blé tendre au stress hydrique est bien démontré.

Mots clés : Stress hydrique, blé tendre, proline exogène, proline endogène, P5CS.

TOLERANCE IMPROVEMENT OF BREAD WHEAT TO WATER STRESS BY ADDITION OF PROLINE

Abstract

Description of the subject: The involvement of proline in plant stress tolerance has drawn the attention of many studies due to its use in maintaining a good plant production under water-deficit conditions.

Objectives: The present contribution aims to bring a clear understanding of the tolerance and/or resistance mechanisms of the common wheat by adding proline under water stress condition.

Methods: The HD1200 variety bread wheat plants are treated with exogenous proline (at a concentration of 6 mM) in a situation of water stress simulated by polyethylene glycol (PEG-6000) at 30% (-1.027 MPa). Plants treated with proline solution under stressful and non-stressful conditions have been compared to controls.

Results: The obtained results demonstrated that water stress negatively affected the growth and physiology of bread wheat, leading to a decrease in the relative water content (RWC) and stomatal conductance. In contrast, it has been noticed the presence of accumulation in terms of soluble sugars, total amino acids and endogenous free proline, which takes place in the leaves and roots of bread wheat. All these facts, may reduce the effects of the stress presence. Additionally, water stress, activated pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS). Our results showed that the supply of proline under stressful conditions improved the growth of bread wheat plants compared to the same water conditions without proline. This later beneficial effect is accompanied by a higher RWC and a strong accumulation of endogenous free proline.

Conclusion: The present study, highlights the importance and benefit of exogenous proline in improving the tolerance of common wheat to water stress.

Keywords: Drought, bread wheat, exogenous proline, endogenous proline, P5CS.

* Auteur correspondant: BEKKA Selma, E-mail: bekka.selma@live.fr

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, les météorologistes constatent des modifications des conditions climatiques, allant vers un réchauffement de la planète. Ce changement climatique entraîne des conditions de sécheresse estivale prononcée, provoquant un stress hydrique important sur les plantes [1]. La sécheresse est l'une des principales contraintes limitant la productivité des récoltes à l'échelle mondiale. Elle peut entraîner une diminution du rendement des plantes de grandes cultures *via* des altérations morphologiques et physiologiques [1]. Le stress hydrique est multidimensionnel dans sa nature et affecte les plantes à différents niveaux de leur organisation. Un déficit en eau peut entraîner une série de perturbations anatomiques, morpho-physiologiques. Le degré de sensibilité au déficit hydrique dépend du stade de développement de la plante mais aussi de la sévérité du stress [2]. De ce fait, la compréhension des mécanismes sous-jacents pour améliorer la tolérance des plantes à ces stress constituent un enjeu économique majeur. La tolérance des plantes au stress hydrique est un phénomène complexe tant au niveau de la plante entière qu'au niveau cellulaire [3, 4]. L'un des principaux caractères physiologiques de tolérance aux contraintes du milieu est l'ajustement osmotique. Celui-ci est réalisé grâce à une accumulation active de composés osmorégulateurs conduisant à un ajustement du potentiel osmotique permettant ainsi le maintien du potentiel de turgescence [5]. La proline est citée comme l'osmotictum le plus largement distribué et accumulé sous diverses conditions de stress dont la sécheresse. L'accumulation de cet acide aminé est souvent corrélée avec la tolérance des plantes au stress hydrique [4]. Bien que beaucoup d'espèces végétales accumulent de la proline, certaines d'entre elles ne l'accumulent pas à des quantités significatives pour protéger la plante contre les dommages du stress. La proline est un acide aminé multifonctionnel impliqué dans l'adaptation des plantes aux contraintes environnementales [6]. Elle est impliquée dans l'ajustement du potentiel osmotique chez de nombreuses plantes soumises à des conditions déficitaires [7]. La proline étant un soluté compatible important, elle joue un rôle crucial dans l'osmorégulation et l'osmotolérance [8]. Elle est utilisée comme technique de sélection des cultivars résistants au stress hydrique tels que le maïs et le blé dur [9, 10]. L'application exogène de solutés compatibles tels que la

proline, a attiré l'attention de nombreux chercheurs sur son efficacité. Ainsi, son apport a été mis en évidence sur plusieurs espèces végétales. En effet, des augmentations significatives dans la croissance et le rendement des cultures du blé tendre, lentille, maïs, l'orge, fenouil, l'oignon et le riz en présence de proline exogène et en conditions de stress hydrique, ont été rapportées par Mosaada et *al.* [11] ; Abdelaal et *al.* [12] ; Samota et *al.* [13] ; Bekka et *al.* [14] ; Zali & Ehsanzadehn [15] et Semida et *al.* [16]. Kamran et *al.* [17] ont rapporté que la pulvérisation foliaire de proline améliore le statut nutritionnel et la croissance du blé tendre soumis à un stress hydrique. La proline exogène régule positivement l'expression des gènes impliqués dans la tolérance des plantes en conditions de stress hydrique [18].

Par référence à l'important rôle de la proline dans l'ajustement osmotique et son implication dans d'autres processus de tolérance à la sécheresse. Nous avons étudié les conséquences de son apport sur la réponse morpho-physiologique et biochimique de blé tendre soumis à un stress hydrique sévère. Ces conséquences ont été évaluées sur la base de la croissance, du statut hydrique, de la conductance stomatique, des teneurs sucres ethanolo-solubles et en acides aminés dont la proline. Ce qui va nous permettre de mieux comprendre les mécanismes engagés dans l'implication de la proline exogène dans la tolérance de la plante au stress hydrique. Dans un second temps, nous avons cherché à mieux comprendre sa régulation métabolique sous la contrainte hydrique et l'apport de proline en mesurant la Δ^1 pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS), enzyme clé, impliquée dans sa biosynthèse de la proline endogène.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Notre travail s'est porté sur les semences du blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Il s'agit d'une variété locale, connue par les agricultures sous le nom Hiddab ou HD1200. Elle est obtenue par l'institut national de la recherche agronomique (INRA-Baraki). Cette variété est très appréciée par les agriculteurs, elle est la plus cultivée à cause de son potentiel de rendement élevé [19].

2. Culture des plantes

Après germination des graines dans des boîtes de Petri, les jeunes plantules âgées de 72 h, sont transférées dans des pots de 160 g contenant du terreau (Tab.1).

La croissance se déroulera pendant 1 mois dans une chambre de culture, sous une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité et une température de l'ordre de 24°C.

Tableau I : Les caractéristiques physico-chimiques du substrat (terreau).

Paramètres	Sol
Conductivité électrique (EC)	450 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
Pentaoxyde de phosphore (P_2O_5)	150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Azote (N)	270 $\text{of}\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Potassium (K_2O)	300 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
pH	6

3. Application des différents traitements

Le stress hydrique est appliqué au 7^{ème} jour après repiquage. Les jeunes plantules sont arrosées avec 50 mL d'eau distillée ou de 50 mL solution selon le traitement : **Témoin 1** : Arrosé avec de l'eau distillée (**T1**) ; **Témoin 2** : Arrosé avec solution de proline (6 mM) (**T2**) ; **Stressé 1** : Arrosé avec de l'eau distillée additionnée de PEG-6000 à 30 % (**S1**) et **Stressé 2** : Arrosé avec de l'eau distillée additionnée de PEG-6000 à 30% + solution de proline (6 mM) (**S2**).

4. Méthodes

4.1. Mesures biométriques

-*Mesure de la croissance linéaire* : La longueur des feuilles et racines des plantes témoins et stressées est mesurée au 30^{ème} jour de la mise en croissance.

-*Mesure de la biomasse* : Les parties aériennes et souterraines de chaque plante ont été pesées séparément à l'état frais (poids de matière fraîche, PMF), puis à l'état sec (poids de matière sèche, PMS), après passage à l'étuve à 80°C pendant 48 h.

4.2. Paramètre physiologiques et biochimiques

- *TRE* : La TRE est mesurée selon la méthode décrite par Barrs [20]. Elle représente l'état de turgescences des cellules. Des segments foliaires de 1cm sont prélevés et directement pesés (poids de la matière fraîche). Ils sont, ensuite, placés dans des tubes à essais contenant de l'eau distillée pendant 24 h à l'obscurité et au réfrigérateur, puis pesés de manière à obtenir le poids à la turgescence. Le fragment est finalement placé dans une étuve à 80°C pendant 48 h, puis pesé pour obtenir le poids de la matière sèche. La TRE est calculée selon la relation suivante : $TRE (\%) = \frac{(PF - PS) \times 100}{(PT - PS)}$; Avec PF : Poids frais, PS : Poids sec, PT : Poids de turgescence.

-*Mesure de la conductance stomatique* : La conductance stomatique à la vapeur d'eau au niveau des feuilles, qui exprime le niveau de fermeture a été mesurée à l'aide d'un Poromètre type *leaf porometer Model SC*. Cette mesure, est basée sur une équation utilisant deux paramètres : La température et l'humidité relative. La conductance stomatique est exprimée en $\text{mmoles}\ \text{H}_2\text{O}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

-*Extraction et dosage des sucres éthanolo-solubles totaux* : Le dosage des glucides se fait par colorimétrie selon la méthode à l'antrone de Mc Cready [21]. Environ 100 mg de matière fraîche (MF) feuilles et racines sont mélangés séparément avec 2 mL d'éthanol bouillant à 80 %. Le mélange est broyé et centrifugé à 5000 tours/mn pendant 20 min. Le culot subit une deuxième extraction avec 2 mL d'éthanol bouillant à 80 % puis le mélange est centrifugée à 5000 tours/min pendant 20 min. A 500 μL d'extrait glucidique sont ajoutés 2 mL de réactif à l'antrone. Les tubes sont placés au bain marie à 100°C pendant 10 min. La teneur en sucres totaux exprimée en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MF a été mesurée à une longueur d'onde de 630 nm au spectrophotomètre.

-*Extraction et dosage des acides aminés totaux* : La technique employée est celle mise au point par Yemm & Cocking [22] et modifiée par Rosen [23]. Environ 100 mg de matière sèche (MS) feuilles et racines sont broyés séparément dans 1 mL d'eau distillée et placés par la suite dans un bain marie bouillant (100°C) pendant 1 h, le mélange est ensuite centrifugé à 5000 tours/min pendant 10 min. Le culot subit une deuxième extraction avec 1 mL d'éthanol. 200 μL d'extrait sont mélangés à 500 μL de tampon citrate. 1 mL du mélange réactionnel ninydrine-acide ascorbique est ajouté au broyat. La teneur en acides aminés totaux exprimée en $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de MS a été mesurée à une longueur d'onde de 570 nm au spectrophotomètre.

-*Extraction et dosage de la proline libre endogène* : La méthode suivie pour le dosage de la proline est celle de Bates [24] modifiée par Magné & Larher [25]. Environ 50 mg de MS feuilles et racines sont broyés séparément dans 1mL d'eau distillée. Ces tubes sont placés dans un bain-marie à 95°C pendant 30 min. Ensuite, une centrifugation de 10 minutes à 13000 tours/minutes est réalisée. 1 mL du réactif à la ninhydrine est ajouté à 500 μL d'extrait de proline. Les tubes sont placés dans un bain marie à 95°C pendant 20 min. Après refroidissement, 3 mL de toluène sont ajoutés.

La teneur en proline exprimée en mg.g^{-1} de MVS a été mesurée à une longueur d'onde de $\lambda=520$ nm au spectrophotomètre.

- *Mesure de l'activité P5CS* : Cette enzyme a été extraite et dosée suivant le protocole décrit par Gracia-Rios et al. [26]. Environ 100 mg de MF foliaire sont broyés dans la glace dans 1 mL de tampon (0,1 M Tris-HCl, pH=7,2). Après une centrifugation de 20 min à 15000 tours, à 4°C, 200 μL de surnageant sont prélevés puis 2 mL de tampon réactionnel contenant (100 mM Tris-HCl pH=7,2, 25 mM MgCl_2 et 25 mM ATP) sont ajoutés. L'ajout de 0,4 mM NADPH, permet d'initier la réaction. L'oxydation du NADPH est suivie pendant 10 min au spectrophotomètre à 340 nm (coefficient d'extinction du NADPH oxydés à 600 nm est de $6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). La P5CS est exprimée en $\mu\text{moles NADPH oxydés min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de protéines.

5. Test statistique

Chaque expérimentation a été réalisée au minimum cinq fois et les erreurs standards sont données (M \pm ES). Les analyses statistiques, basées le test de Student, ont été réalisées à l'aide du logiciel MS-EXCEL 2007.

Tableau 2 : Effets des différents traitements sur la croissance linéaire et la biomasse des plantes de blé tendre au 30^{ème} jour de croissance

Traitements	Croissance (cm)		Poids de la matière fraîche (mg)		Poids de la matière sèche (mg)	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
T1	24,94 \pm 2,04 b	33,76 \pm 1,75 a	305,40 \pm 14,28 a	234,15 \pm 19,06 a	30,20 \pm 1,96 b	29,43 \pm 3,89 a
T2	30,33 \pm 0,77 a	29,38 \pm 0,50 a	350,20 \pm 15,73 b	203,97 \pm 6,42 b	39,93 \pm 0,76 a	22,60 \pm 1,20 b
S1	16,51 \pm 0,54 d	23,92 \pm 1,11 c	198,23 \pm 1,96 d	168,65 \pm 16,13 d	17,65 \pm 1,05 d	16,90 \pm 0,73 d
S2	22,97 \pm 0,11 c	27,33 \pm 0,11 b	241,07 \pm 1,64 c	212,25 \pm 8,43 c	27,54 \pm 2,24 c	20,60 \pm 1,15 c

Avec T1 : L'eau distillée ; T2 : Proline ; S1 : PEG-6000 et S2 : PEG-6000+proline

Les résultats ont été évalués statistiquement en utilisant le test t de Student à $p \leq 0,05$. Les lettres alphabétiques différentes indiquent les groupes homogènes du test post-hoc.

2. Teneur relative en eau (TRE)

Le déficit hydrique induit par le PEG-6000 a entraîné une chute significative ($p \leq 0,05$) de la TRE qui passe de $93,60 \pm 0,33$ % chez le témoin (T1) à $69,79 \pm 3,24$ % chez le stressé (S1) (Fig. 1). En absence de stress, la proline n'a pas exercé aucun effet sur la TRE. En conditions stressantes, la proline a atténué la diminution de la TRE.

Les différences sont considérées significative $p \leq 0,05$.

RESULTATS

1. Croissance linéaire et la biomasse

Les effets du stress hydrique et de la proline exogène sur la croissance ont été évalués après 30 jours de croissance, par une mesure de la longueur de la partie aérienne et souterraine ainsi que le poids de la matière fraîche et sèche des feuilles et des racines. D'après les résultats illustrés dans le tableau 2, le stress hydrique a réduit de manière significative ($p \leq 0,05$) la croissance linéaire des feuilles et racines des plantes stressées (S1) par rapport au témoin (T1) (-39,12%) pour les feuilles et (-19,33%) pour les racines. Le stress hydrique induit par le PEG-6000 a également induit une forte réduction du poids de la matière fraîche et sèche des feuilles et racines des plantes (S1) comparativement au témoin (T1). Néanmoins, la présence de proline exogène a augmenté sensiblement aussi bien la croissance des feuilles stressées (+26,62%) que celle des racines (+26,92%). Ainsi, une différence significative ($p \leq 0,05$) a été notée entre les stressés (S1) et (S2).

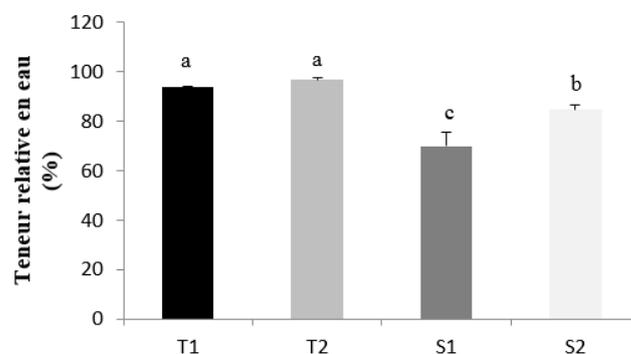


Figure 1: Effets des différents traitements sur la teneur relative en eau des plantes de blé tendre au 30^{ème} jour de croissance. Avec T1 : L'eau distillée ; T2 : Proline ; S1 : PEG-6000 et S2 : PEG-6000+proline. Les lettres alphabétiques différentes indiquent les groupes homogènes du test post-hoc.

3. Conductance stomatique

La conductance stomatique du blé s'est affectée par le PEG-6000, avec une réduction significative ($p \leq 0,05$), -63,97% par rapport au témoin (T1) (Fig. 2). Un effet positif de la proline est observé sur la conductance stomatique en conditions de stress. Ainsi, nous avons noté une augmentation de 83,90 % par rapport au stressé non traité (S1).

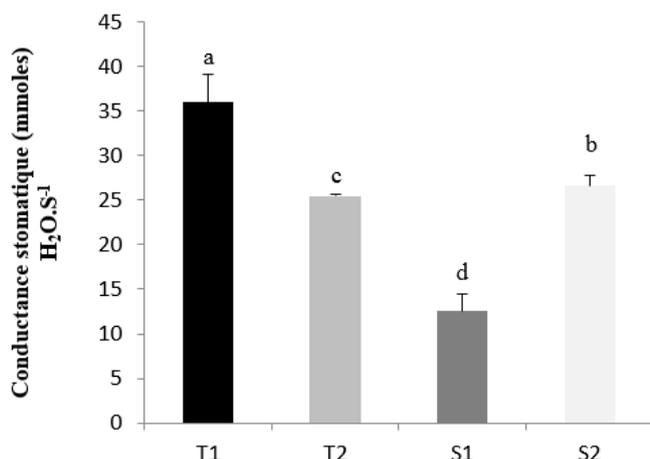


Figure 2: Effets des différents traitements sur la conductance stomatique des plantes de blé tendre au 30^{ème} jour de croissance. Avec T1 : L'eau distillée ; T2 : Proline ; S1 : PEG-6000 et S2 : PEG-6000+proline. Les lettres alphabétiques différentes indiquent les groupes homogènes du test post-hoc

Tableau 3 : Effets des différents traitements sur les teneurs en solutés compatibles et en acides aminés totaux des plantes de blé tendre au 30^{ème} jour de croissance.

Traitements	Teneur en sucres solubles totaux (mg.g ⁻¹ de MVS)		Teneur en acides aminés totaux (mg.g ⁻¹ de MVS)		Teneur en proline libre endogènes (mg.g ⁻¹ de MVS)	
	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	Racines
T1	57,21±3,25a	0,69±0,03a	3,17± 0,13a	1,08 ±0,19a	1,67±0,22a	0,051±0,004a
T2	77,90±4,02b	1,40±0,33b	5,3±0,32b	1,5 ±0,46a	2,33±0,36a	0,055±0,01a
S1	104,23±6,25c	1,48 ±0,17b	6,6± 0,87c	2,39 ±1,24a	2,91± 0,27b	0,065± 0,007a
S2	92,67±2,95d	0,36 ±0,01c	4,54± 0,2d	1,03 ±0,3a	4,05±0,29c	0,089±0,008b

T1 : L'eau distillée ; T2 : Proline ; S1 : PEG-6000 et S2 : PEG-6000+proline.

Les résultats ont été évalués statistiquement en utilisant le test t de Student à $p \leq 0,05$ Les lettres alphabétiques différentes indiquent les groupes homogènes du test post-hoc.

L'accumulation de la proline libre foliaire a augmenté sensiblement sous l'effet du stress hydrique. En effet, l'analyse statistique a montré que l'action de PEG-6000 sur l'accumulation de la proline libre endogène est significative ($p \leq 0,05$) dans les feuilles stressées (S1) (+74,25%) comparativement au témoin (T1), alors qu'aucune différence n'a été enregistrée au niveau des racines (Tab. 3). En conditions stressantes, l'ajout de la proline a provoqué une augmentation plus importante de la teneur en proline libre au niveau des feuilles

4. Solutés compatibles et les acides aminés totaux

La contrainte hydrique simulée par le PEG-6000 dans sa globalité a induit une augmentation significative ($p \leq 0,05$) des teneurs en sucres totaux au niveau des feuilles et racines des plantes stressées (S1), entraînant, ainsi, une augmentation au niveau des feuilles (+82,18%) et au niveau des racines (+113,66%) par rapport aux témoins (T1). Cependant, La teneur en sucres (feuilles et racines) est moindre en présence de proline en milieu stressant comparée à celle des stressés sans proline. En effet, une réduction significative ($p \leq 0,05$) de la teneur en sucres a été enregistrée de 11,09% au niveau des feuilles et 75,57 % au niveau des racines des stressés (S2) par rapport aux stressés (S1) (Tab. 3).

L'effet du stress hydrique s'est traduit par une augmentation significative ($p \leq 0,05$) de la teneur en acides aminés totaux, de l'ordre de 108,2 % pour les feuilles et 121,29% pour les racines comparativement au témoin (T1) (Tab. 3). La présence de proline en conditions de stress a causé une baisse de la teneur en acides aminés au niveau des racines et feuilles des stressées (S2) comparativement aux stressés non traités (S1). Cette diminution est de 31,33 % pour les feuilles et 56,90 % pour les racines (Tab. 3).

(+39,17%) et racines (+55,17%) comparativement au stressé (S2) (Tab. 3).

5. Pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS)

Le stress hydrique a engendré une augmentation significative de l'activité de l'enzyme pyrroline-5-carboxylate synthétase (P5CS), elle passe de 0,183±0,07 chez le témoin (T1) à 5,67±0,9 µmoles NADPH oxydés min⁻¹.mg⁻¹ prot chez le stressé (S1) (Fig. 3). Néanmoins, son niveau a décliné en présence de la proline exogène par rapport au stressés sans proline, avec un taux de réduction de 35,25 %.

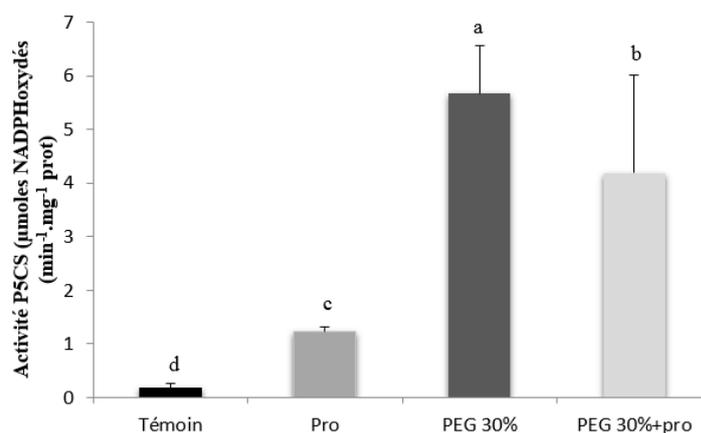


Figure 3 : Effets des différents traitements sur l'activité P5CS au niveau des feuilles des plantes de blé tendre au 30^{ème} jour de croissance. Avec T1 : L'eau distillée ; T2 : Proline ; S1 : PEG-6000 et S2 : PEG-6000+proline. Les lettres alphabétiques différentes indiquent les groupes homogènes du test post-hoc.

DISCUSSION

1. Effets du stress hydrique

Le premier symptôme provoqué par le stress hydrique est l'inhibition rapide de la croissance aérienne et racinaire, suivie par la fermeture des stomates avec une réduction de la transpiration et de l'assimilation du CO₂ pour la photosynthèse [27]. La diminution de la croissance de l'appareil végétatif observée chez les plantes de blé tendre pourrait être expliquée par le fait que le polyéthylène glycol (PEG-6000) agit par augmentation de la pression osmotique du milieu, ce qui empêche l'absorption de l'eau par le système racinaire. Ceci entraîne par conséquent une réduction au niveau de la croissance de l'appareil végétatif. Nos résultats ont démontré que le stress hydrique imposé ; a affecté négativement et significativement le poids de la matière fraîche et sèche des feuilles et racines des plantes. Cette diminution de la croissance est liée à la baisse de la turgescence cellulaire qui se traduit par une baisse de la teneur relative en eau. Les résultats obtenus, ont montré également que le stress a réduit de manière significative la conductance stomatique. Toutes ces modifications au niveau du métabolisme cellulaire peuvent contribuer, en plus de la TRE, à la diminution de la croissance observée chez les plantes traitées par le PEG-6000. En réponse au déficit hydrique induit par le PEG-6000, les sucres éthanolo-solubles totaux foliaires et racinaires, ont connu une augmentation significative chez les stressés (S1). Les sucres sont considérés par plusieurs auteurs comme de bons osmorégulateurs [28], qui peuvent jouer un rôle important dans l'ajustement osmotique et, ainsi, l'adaptation des plantes au stress [29].

Selon nos résultats, sous l'action de la contrainte hydrique, une augmentation élevée de la teneur en acides aminés foliaire chez les stressés (S1) a été enregistrée par rapport au témoin (T1). En revanche, aucune différence n'a été signalée au niveau des racines. Les concentrations des acides aminés libres, des amides et des amines dans les plantes soumises à un stress sont souvent modifiées. Leur accumulation sous l'effet du stress hydrique semble résulter de la combinaison de deux phénomènes principaux, à savoir, une stimulation de la protéolyse et un ralentissement de la synthèse protéique [30].

L'effet du stress hydrique s'est traduit par une hausse significative de la teneur en proline libre endogène chez les stressés (S1) au niveau des feuilles. Il a été signalé que des variétés de blé tendre résistantes au stress hydrique simulé par le PEG-6000 accumulaient des concentrations en proline libre significativement plus élevées que les variétés sensibles [31]. Il est connu que la proline est impliquée dans divers processus physiologiques et biochimiques de la plante, en particulier l'osmo-ajustement et l'osmoprotection. En effet, la proline est un osmotica qui s'accumule dès que la plante est soumise à une contrainte qui perturbe le fonctionnement de son cycle tel que la contrainte hydrique [32-33]. Le stress hydrique imposé, a provoqué une augmentation remarquable de l'activité P5CS chez les stressés (S1). Ce résultat est en relation avec la forte accumulation de proline libre endogène observée. En effet, il a été déjà démontré que l'activité de cette enzyme est régulée par le stress hydrique [34].

2. Effets de la proline exogène

L'apport de la proline a amélioré considérablement la croissance (augmentation de la taille, du poids de la matière fraîche et sèche des parties aériennes et racinaires). Ceci traduit l'intervention de la proline exogène dans la lutte contre les effets inhibiteurs de la croissance provoqués par le stress hydrique. Ces mêmes résultats sont démontrés par plusieurs chercheurs notamment, Verslues & Sharp [35] ; Alam et al. [36] et Semida et al. [16]. Cette amélioration de la croissance serait liée à une meilleure turgescence cellulaire, une meilleure activité photosynthétique et/ou une bonne nutrition minérale [37].

D'après les résultats obtenus, les plantes stressées traitées avec de la proline sont parvenues à maintenir une TRE élevée sous conditions de stress. Ce résultat est conforme à ceux obtenus par Zouari et al. [38], ces derniers ayant conclu à la capacité de la proline à maintenir une forte teneur en eau sous conditions de stress grâce à son rôle dans l'ajustement osmotique. Il est admis que la proline est impliquée dans le mécanisme d'osmorégulation. Son accumulation augmente l'osmolarité cellulaire et réduit la transpiration via son effet régulateur sur l'ouverture/fermeture des stomates [39]. Sous traitement de proline exogène, les plantes stressées (S2) se sont montrées les plus performantes en terme d'augmentation de la conductance stomatique par rapport aux stressés non traités.

Chez les stressés additionnés de proline exogène, la teneur en sucres solubles foliaires et racinaires reste inférieure à celles des plantes stressées sans proline. Ce résultat corrobore ceux de Ben Ahmed et al. [40] et Osman [41], qui ont supposé que la diminution des sucres solubles en conditions de stress et en présence de proline exogène est due à l'importance du rôle d'osmoprotectant joué par la proline exogène. Cette dernière va limiter le besoin des plantes stressées en sucres solubles.

L'apport de proline a entraîné une réduction du contenu foliaire et racinaire en acides aminés sous l'effet du PEG-6000. Il a été montré que l'apport de proline a réprimé de manière significative plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de certains acides aminés chez les plantes d'*Arabidopsis* [42].

D'après nos résultats, l'apport de proline a induit une augmentation significative de la quantité de proline libre endogène dans les feuilles et racines des stressés (S2). Ces observations rejoignent ceux de Medeiros et al.

[43] et Noreen et al. [44]. L'accumulation de proline suite un apport exogène de cet acide aminé suggère que la proline ajoutée est absorbée par les racines, transportée et distribuée vers les feuilles. Il a été démontré l'existence de transporteurs assurant le transport et la translocation de la proline au niveau des racines de plusieurs espèces végétales telles que la tomate, le riz et l'orge [45-46]. Ainsi, l'augmentation du niveau de la proline endogène au niveau des feuilles et racines des témoins (T2) et stressés (S2) pourrait être expliquée par l'absorption de cet acide aminé ce qui va dans le sens des conclusions des travaux de Igarashi et al. [46] et Ueda et al. [47] ; Schwacke et al. [48].

En conditions stressantes, l'ajout de proline a réduit le niveau de l'activité P5CS. Ce résultat corrobore ceux de Zheng et al. [49]. Ceci est en adéquation avec le fait que la rétro-inhibition de l'activité P5CS est déclenchée par la proline exogène [50].

CONCLUSION

Dans l'ensemble, le niveau de stress hydrique auquel ont été soumises les plantes de blé tendre a un effet significatif sur les paramètres morpho-physiologiques et biochimiques étudiés. Compte tenu des résultats obtenus dans notre étude, il a été montré que dans les conditions stressantes, la proline exogène a amélioré considérablement la croissance aérienne. Il semble en effet, que l'apport de proline en conditions de déficit hydrique soit efficace dans l'amélioration de la tolérance au stress hydrique. Cet effet bénéfique sur la croissance est accompagné par une TRE plus élevée et une forte accumulation de proline libre endogène. Les résultats obtenus, laissent entrevoir la possibilité de l'utilisation de la proline exogène dans l'amélioration de la tolérance des plantes au stress hydrique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Salehi-Lisar, S.Y., Bakhshayeshan-&Agdam, H. (2016). Drought Stress in Plants: Causes, Consequences, and Tolerance. *Springer International Publishing Switzerland*. 1 (1): 1-16.
- [2]. Larcher, W. (1995). *Physiological plant ecology* (3rd edition). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 528.
- [3]. Foolad, M.R., Subbiah, P., Kramer, C., Hargrave, G. & Lin, G.Y. (2003). Genetic relationships among cold, salt and drought tolerance during seed germination in an interspecific cross of tomato. *Euphytica*, 130: 199-206.
- [4]. Ashraf, M. & Foolad, M.R. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot*, 59: 206-216.

- [5]. Shao, H.B., Chen, X., Chu, L.Y., Zhao, X.N., Wu, G., Yong, Y.B., Zhao, C.X. & Hu Z.M. (2006). Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits. *Colloids Surf. B: Biointer*, 53: 113–119.
- [6]. Szabados, L. & Saviouré, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, 15: 89–97.
- [7]. Verbruggen, N. & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753–759.
- [8]. Delauney, A.J. & Verma, D.P.S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*, 4 (2): 215–223.
- [9]. Zadebagheri, M., Azarpanah, A. & Shorangiz Javanmardi, S. (2014). Proline Metabolite Transport an Efficient Approach in corn Yield Improvement as Response to Drought Conditions. *Intl J Farm and Alli Sci*, 3 (5): 453–461.
- [10]. Chahbar, S. & Belkhdja, M. (2016). Effet du déficit hydrique sur certains osmolytes chez cinq variétés de blé dur (*Triticum durum*). *Int. J. Innov. Sci*, 17 (3): 757–767.
- [11]. Mosaada, I.S.M., Seraga, A.H.I., Faragb, M.M. & Seadaa, A.K. (2019). Effect of exogenous proline application on maize yield and the optimum rate of mineral nitrogen under salinity stress. *J. Plant Nutr*, 43 (3): 354–370.
- [12]. Abdelaal, K.A.A., Attia, K.A., Alamery, S.F., El-Afry, M.M., Ghazy, A.I., Tantawy, D.S., Al-Doss, A.A., El-Shawy, E.E., Abu-Elsaoud, A.M. & Hafez, Y.M. (2020). Exogenous Application of Proline and Salicylic Acid can Mitigate the Injurious Impacts of Drought Stress on Barley Plants Associated with Physiological and Histological Characters. *Sustainability*, 12: (5) :1–15.
- [13]. Samota, M.K., Sasi, M. & Singh. A. (2017). Impact of Seed Priming on Proline Content and Antioxidant Enzymes to Mitigate Drought Stress in Rice Genotype. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 6 (5): 2459–2466.
- [14]. Bekka, S., Djebbar, R. & Abrous, O. (2018). Effects of exogenous proline on the physiological characteristics of *Triticum aestivum* L. and *Lens culinaris* Medik. under drought stress. *Acta Agric. Slov*, 111 (2): 477– 491.
- [15]. Zali, A.G & Ehsanzadeh, P. (2018). Exogenous proline improves osmoregulation, physiological functions, essential oil, and seed yield of fennel. *Ind Crops Prod*, 111:133–140.
- [16]. Semida, W.M., Abdelkhalika, A., Mohamed, O.A., Rady, M.O.A. & Abd El-Mageed, T.A. (2020). Exogenously applied proline enhances growth and productivity of drought stressed onion by improving photosynthetic efficiency, water use efficiency and up-regulating osmoprotectants. *Sci Hortic*, 272: 109580.
- [17]. Kamran, M., Shahbaz, M., Ashraf, M. & Akram, N.A. (2009). Alleviation of drought-induced adverse effects in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) using proline as a pre-sowing seed treatment. *Pak. J. Bot*, 41 (2): 621–632.
- [18]. Moustakas, M., Sperdoui, I., Kouna, T., Antonopoulou, C.I. & Therios, I. (2011). Exogenous proline induces soluble sugar accumulation and alleviates drought stress effects on photosystem II functioning of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Growth Regul*, 65:35–325.
- [19]. ITGC (Institut technique des grandes cultures). (1995). Statistiques agricoles. Algérie. Les principales variétés de céréales cultivées en Algérie. 114 pages.
- [20]. Barrs, H.D. (1968). Determination of water deficit in plant tissues. In: Water Deficit and Plant Growth (T.T. Kozlowski, ed.). *Academy Press, New York*, pp.235–368.
- [21]. Mc Cready, R. M., Guggolz, J., Silviera, V. & Owes, H.S. (1950). Determination of starch and amylase in vegetables. Application to peas. *Ann. Chem*, 22: 156–1158.
- [22]. Yemm, E.W. & Cocking, E.C. (1955). The determination of amino acids with ninhydrin. *Analyst*, 80: 209–213.
- [23]. Rosen, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys*, 67: 10–15.
- [24]. Bates, S. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205–207.
- [25]. Magné, C. & Larher, F. (1992). High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acid and free proline. *Anal. Biochem*, 200: 115–118.
- [26]. Garcia-Rios, M., Fujita, T., LaRosa, P.C., Locy, R.D., Clithero, J.M., Bressan, R.A. & Csonka, L.N. (1997). Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding g-glutamyl kinase and g-glutamyl phosphate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 8249–8254.
- [27]. Akcay, U.C., Ercan, O., Kavas, M., Yildiz, L., Yilmaz, C., Oktem, H.A. & Yucel, M. (2011). Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. *Plant Growth Regul*, 61: 21–28.
- [28]. Kameli, A. & Losel, D.M. (1996). Growth and sugar accumulation in durum wheat plants under water stress. *New Phytol*. 132: 57–62.
- [29]. Korn, M., Peterek, S., Mock, H.P., Heyer, A.G. & Hincha D.K. (2008). Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance. *Plant Cell and Environ*, 31: 813–827.
- [30]. Stewart, G.R. & Larher, F. (1980). Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress. In: (B.J. Mifflin ed.). The biochemistry of plants v5. *Phytochem*, 16 : 447–453.
- [31]. Nayyar, H. & Walia, D.P. (2003). Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. *Biol.Plant*, 46: 275–279.
- [32]. Cechin, I., Rossi, S.C., Oliveira, V.C. & Fumis, T.F. (2006). Photosynthetic responses and proline content of mature and young leaves of sunflower plants under water deficit. *Photosynthetica*, 44 (1): 143–146.
- [33]. Chun, S.C., Paramasivan, M. & Chandrasekaran, M. (2018). Proline Accumulation Influenced by Osmotic Stress in *Arbuscular Mycorrhizal* Symbiotic Plants. *Front. Microbiol*, 9: 2525.
- [34]. Yoshiba, Y., Kiyosue, T., Katagiri, T., Ueda, H. Mizoguchi, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., Harada, Y. & Shinozaki, K. (1995). Correlation between the induction of a gene for delta1- pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *Plant J*, 7: 751–760.

- [35]. Verslues, P.E. & Sharp, R.E. (1999). Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials. 11. Metabolic source of increased proline deposition in the elongation zone. *Plant Physiol*, 119:1349-1360.
- [36]. Alam, R., Das, D.K., Islam, M.R., Murata, Y. & Hoque, M.A. (2016). Exogenous proline enhances nutrient uptake and confers tolerance to salt stress in maize (*Zea mays* L.). *Progress. Agric*, 27 (4): 409-417.
- [37]. Raza, S.H., Athar, H.R., Ashraf, M. & Hameed, A. (2007). Glycinebetaine-induced modulation of antioxidant enzymes activities and ion accumulation in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Environ Exp Bot*, 60: 368-376.
- [38]. Zouari, M., Ben Ahmed, C., Elloumi, N., Bellassoued, K., Delmail, D., Labrousse, P., Ben Abdallah, F. & Ben Rouina, B. (2016). Impact of proline application on cadmium accumulation, mineral nutrition and enzymatic antioxidant defense system of *Olea europaea* L. cv Chemlali exposed to cadmium stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 128:195-20.
- [39]. Kavi Kishore, P.B., Sangam, S., Amrutha, R.N. Laxmi, P.S., Naidu, K.R., Rao, K.R.S.S., Rao, S. Reddy, K.J., Theriappan, P. & Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr. Sci*, 88: 424-438.
- [40]. Ben Ahmed, C.S. Magdich, S., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhris, M. & Ben Abdullah, F. (2010). Exogenous proline effects on water relations and ions contents in leaves and roots of young olive. *Amino Acids*, 40 (2): 565-573.
- [41]. Nanjo, T., Fujita, M., Seki, M., Kato, T., Tabata, S. and Shinozaki, K. (2003). Toxicity of free proline revealed in an arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol*, 44 (5):541-548.
- [42]. Osman, H.S. (2015). Enhancing antioxidant–yield relationship of pea plant under drought at different growth stages by exogenously applied glycine betaine and proline. *Ann. Agric. Sci*, 60 (2): 389-402.
- [43]. Medeiros, M.J.L., De A-Silva, M.M., Granja, M.M., Júnior, D.Z.S., Camara, T. & Willadino, L. (2015). Effect of exogenous proline in two sugarcane genotypes grown *in vitro* under salt stress. *Acta Biolo Colomb*, 20 (2):57-63.
- [44]. Noreen, S., Akhter, M.S., Yaamin, T. & Arfan, M. (2018). The ameliorative effects of exogenously applied proline on physiological and biochemical parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.) crop under copper stress condition. *J Plant Interact*. 13 (1): 221–230.
- [45]. Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E. and Frommer, W.B. (1996). Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell*, 8 (8): 1437-1446.
- [46]. Igarashi, Y., Yoshida, Y., Takeshita, T., Nomura, S., Otomo, J., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2000). Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding proline transporter in rice. *Plant Cell Physiol*, 41:750-756.
- [47]. Ueda, A., Yamamoto-Yamane, Y. & Takabe, T. (2007). Salt stress enhances proline utilization in the apical region of barley roots. *Biochem Biophys Res Commun*, 355: 61-66.
- [48]. Schwacke, R., Grallath, S., Breitzkreuz, K.E., Stransky, E., Stransky, H. Frommer, W.B. & Rentsch, D. (1999). LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine and γ -amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell*, 11: 377-391.
- [49]. Zheng, J.L., Zhao, L.Y., Wu, C.W., Shen, B. & Zhu, A.I. (2015). Exogenous proline reduces NaCl-induced damage by mediating ionic and osmotic adjustment and enhancing antioxidant defense in *Eurya emarginata*. *Acta Physiol Plant*, 37 (181):1-10.
- [50]. Hu, C.A.A., Delauney, A.J. & Verma, D.P.S. (1992). A bifunctional enzyme (D1- pyrroline- 5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 89: 9354–9358.