



HAL
open science

Effets des rayonnements UV-C sur la réponse de la laitue romaine *Lactuca sativa* var *Claudius* aux contraintes biotiques et abiotiques

Chayma Ouhibi

► **To cite this version:**

Chayma Ouhibi. Effets des rayonnements UV-C sur la réponse de la laitue romaine *Lactuca sativa* var *Claudius* aux contraintes biotiques et abiotiques. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2014. Français. NNT : 2014AVIG0333 . tel-01203364

HAL Id: tel-01203364

<https://theses.hal.science/tel-01203364>

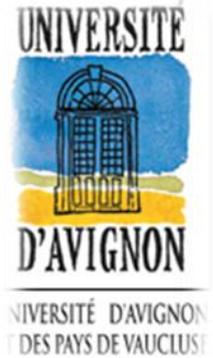
Submitted on 28 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE TUNIS EL MANAR
FACULTÉ DES SCIENCES DE TUNIS
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES



UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS
DE VAUCLUSE
POLE AGROSCIENCES D'AVIGNON

THÈSE EN CO-TUTELLE

Présentée pour l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Par

M^{lle} Chayma OUHIBI

Effets des rayonnements UV-C sur la réponse de la laitue romaine *Lactuca sativa* var *Claudius* aux contraintes biotiques et abiotiques

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2014 devant le jury composé de :

Mr. Ali RAYES

Président (FST)

Mr. Chedly ABDELLY

Rapporteur (CBBC)

Mr. Anis LIMAMI

Rapporteur (Université d'Angers)

Mr. Pierre BERTHOMIEU

Examineur (Supagro, Montpellier)

Mr. Laurent URBAN

Directeur de thèse (UAPV, France)

Mr. Mokhtar LACHAAL

Directeur de thèse (FST)

Le mot laitue donne une image de fraîcheur et ma romaine règne sur les laitues.

Chayma OUHIBI

La thèse a parfois été un moment difficile pour mes proches. Elle est très preneuse de temps ! Et j'avoue ne pas les avoir consacré le temps qu'ils le méritent.

C'est avec plein d'amour et de fierté que je dédie ce travail, fruit de longues années d'études, à :

La mémoire de mes grand parents

Baba Belgacem, Papa Mostapha, Dada Mihnia et Mama Sassia. C'est à vous que je dois ma fierté de mes origines. Là où vous êtes, j'espère que vous êtes fiers de votre petite fille.

Mes parents Mohamed Najem et Houda,

Merci Baba et Mama pour tout ce que vous avez fait pour moi, merci pour votre soutien incontournable, merci pour votre compréhension et votre patience. Merci pour cet amour. J'espère que travail sera le diadème qui couronne toutes les années que vous avez passé à mes cotés en me soutenant et en étant toujours là pour moi. Que Dieu tout puissant vous garde pour moi.

Mon frère, Mohamed Béchir

Que le grand Dieu puisse te réaliser tous tes rêves. Tu es notre fierté petit frère, je t'aime.

Ma sœur, Rabeb

merci Rabouba, aucun remerciement ne pourrait être à la hauteur de tout ce que tu as fait pour moi. Je te souhaite tout le bien et le bonheur de ce monde petite sœur. Merci Rabouba pour ton soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts. Tu n'as jamais cessé de me combler par ton amour et ta tendresse. Je t'adore petite sœur.

Mon Oncle Abderrazak

Merci cher Oncle pour toute votre confiance en moi et en mes compétences. Vous étiez le premier à me nommer Docteur avant même que j'entamais la thèse. Merci cher oncle pour votre soutien moral. Que Dieu vous protège.

Mon amie et sœur Rim

Merci pour toutes ces années de belle amitié, de fraternité et de soutien.

*La petite Mariouma
Je te souhaite tout le bonheur ma chérie.*

Mon Oncle Khaled

Je vois toujours en vous le modèle à suivre. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi durant mon séjour en France.

Mon Oncle Mohamed Nafti

Je vous remercie pour tout cher oncle. Vous avez toujours cru en moi et j'espère être à la hauteur de cette confiance.

Abdelkader

Merci pour ta présence dans ma vie, pour tout le bonheur que tu m'as apporté. Merci pour ta compréhension et ton soutien lors de la dernière ligne droite de mon chemin de thèse. Ce chemin qui n'était pas facile mais on arrivera bientôt à la fin. Je sais que je peux toujours compter sur toi. Que la belle vie commence.

*La mémoire de Tonton Mohamed
Que votre âme repose en paix cher Oncle.*

Oussama, Nouha et Basma

pour votre soutien, votre amour et votre compréhension. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi. Vous étiez toujours à mes côtés. Vous étiez formidables. Je vous souhaite tout le bien de ce monde. Je vous adore.

Toute la famille Ouhibi.

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à coeur.

Cette thèse doit beaucoup aux nombreuses personnes qui m'ont encouragé, soutenu et conforté au long de toutes ces années. Qu'elles trouvent dans ce travail l'expression de mes plus sincères remerciements.

Mon travail de thèse de Doctorat en Sciences Biologiques est réalisé dans le cadre d'une cotutelle internationale entre la Faculté des Sciences de Tunis et l'Université d'Avignon et des Pays de Vaulcuse sous la direction scientifique conjointe des messieurs les professeurs Mokhtar LACHAAL et Laurent URBAN.

Je remercie du fond du cœur mon directeur de thèse tunisien Mr Mokhtar LACHAAL, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis, et mon cher maître pour l'opportunité qu'il m'a offert en m'ouvrant les portes de son laboratoire et pour la confiance qu'il m'a donnée depuis que j'étais jeune étudiante en mastère. Il a toujours montré de l'intérêt pour mes travaux et répondu à mes sollicitations lorsque le besoin s'en faisait sentir surtout lors de la dernière ligne droite de mon long chemin de thèse. J'espère que ce mémoire sera un remerciement suffisant au soutien et à la confiance sans cesse renouvelée dont il a fait preuve en mon égard.

Je souhaite, remercier, aussi vivement mon directeur de thèse français Mr Laurent URBAN, Professeur à l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, pour avoir proposé cette thèse et pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je suis également reconnaissante pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise et sa vision critique. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela. J'espère que ce mémoire sera un témoignage de ma profonde reconnaissance.

Je suis très redevable à mon co-encadrant de thèse Dr Jawad AARROUF, Maître de Conférences à l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse. Je voudrais lui remercier pour tout ce qu'il a fait pour moi, pour tous les conseils avisés et pour son écoute qui ont été prépondérants pour la bonne réussite de cette thèse. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je n'oublierai jamais tout ce qu'il m'a appris.

Je tiens à remercier vivement Dr Houneida ATTIA HEDHILI, Maitre Assistante à l'Institut Supérieur des Cadres de l'Enfance. Je voudrais lui remercier pour le temps et la patience qu'elle m'a accordée et d'avoir cru en mes capacités. De plus, je n'oublierai jamais le soutien moral qu'elle m'a apporté tout au long de ces années écoulées. Elle était toujours là pour m'écouter. Merci madame.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait Monsieur Aly RAIES, Professeur à la faculté des sciences de Tunis en acceptant de présider mon jury. Je lui exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt porté à mon travail.

Je suis très sensible à l'honneur que m'a fait Mr Chedly ABDELLEY, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis et Directeur Général du Centre de Biotechnologie de Borj Cedria, en acceptant d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteur. Je tiens à lui exprimer mon respect et ma reconnaissance.

Je suis très sensible aussi à l'honneur que m'a fait Mr Anis LIMAMI, Professeur à l'Université d'Angers en acceptant la tâche d'évaluer mon travail de thèse. Je suis très reconnaissante pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail.

Je suis redevable à l'honneur que m'a fait Mr Pierre BERTHOMIEU, Professeur et directeur de l'équipe Adaptation des Plantes aux Métaux du Centre International d'Études Supérieures en Sciences Agronomiques Montpellier en acceptant d'assister à mon jury de thèse en tant qu'examineur. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Dr Philippe NICOT, chargé de recherche à l'Unité de Phytopathologie de l'INRA d'Avignon, équipe Mistral. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec lui. Je lui remercie pour son accueil et sa sympathie qu'il m'a fait preuve quand il a accepté de collaborer avec moi lors de la réalisation des mes travaux de thèse.

Je tiens à remercier Dr Florence CHARLES, Maitre de Conférences à l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. C'était un plaisir pour moi de travailler à ses côtés.

Je voudrais remercier du fond du cœur Dr Félicie LAURI-LOPEZ, Maitre des Conférences à l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse pour son aide incontournable dans la partie pratique en m'aidant à mettre au point tous les protocoles de dosage que j'ai utilisé lors de mon séjour à Avignon.

Je tiens à remercier Dr Véronique VIDAL, Ingénieur de recherche à l'Université d'Avignon, pour sa collaboration fructueuse.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Mme Catherine MAZOLLIER, responsable de l'équipe Expérimentation en maraichage au GRAB.

Je tiens aussi à exprimer ma sympathie à tous les membres de l'unité PSH de l'INRA St Paul d'Avignon spécialement Mr François LÉCOMPTE pour leur accueil et leur gentillesse.

Mes remerciements les plus sincères sont adressés à madame Najoua KARRAY BOURAOUI, Maitre de Conférences à la Faculté des Sciences de Tunis. Je vous remercie madame pour votre gentillesse.

Je voudrai adresser ma reconnaissance à Madame Zeineb OUERGHI, Professeur à la Faculté des Sciences de Tunis. Je tiens à lui exprimer tout mon respect.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent à toute l'équipe du laboratoire de Physiologie des Fruits et Légumes d'Avignon, Pr. Hugnette SALANON, directrice du laboratoire, Pr Mohamed ELMAATAOUI, Frank LACROIX, Ingénieur d'étude, Sandrine LAURENT, technicienne du laboratoire, Claude, Rolande, Myriam et Saad M'RAH.

Je suis très redevable à Mr Khaled ALOUINI, Maitre de conférences à la Faculté des Sciences de Tunis pour son soutien moral au fil des années de mes études universitaires.

Nul remerciement ne saurait exprimer mes sentiments de gratitude envers Mr Mustapha KSONTINI, Directeur de recherche à L'INRGREF. Ses conseils m'ont mis sur les rails dès mon inscription en Mastère.

Je remercie du fond du cœur tous mes amis de l'unité de Physiologie et Biochimie de la Tolérance des Plantes aux Contraintes Abiotiques de la Faculté des Sciences de Tunis, Dr Najoua MSILLINI, Fedia REBAH, Sonia ZAOUI, Thouraya AMDOUNI, Wissal ABIDI, Maha ZAGHDOUDI, Dr Olfa BAATOUR, Dr Imen TARCHOUN et Mohamed CHEBBI. Je vous remercie pour tout ce que vous avez pour moi lors de la dernière ligne droite de ce long chemin de la thèse. Je n'oublierai jamais les bons moments qu'on a passés ensemble. Merci aussi de m'avoir toujours remonté le moral. Je vous adore.

Une spéciale pensée aussi aux nouveaux arrivants au laboratoire, l'adorable Rabeb TEJ, Nesrine BENHAMIDA, Ghaya CHAABANI et Amel HAMDI. Je vous souhaite du courage pour le chemin que vous avez choisi.

Je remercie du fond du cœur tous mes collègues et amis du laboratoire d'Avignon, Benjamin LÉDUC, Majd DARWISH, Nabil ELDEBBEGH, Loubab ZEDAN, Sanders JUNGLEEE, Claire DOMISSE et Marc LÉBA, mon tout premier stagiaire.

Introduction Générale.....	1
CHAPITRE 1 Synthèse Bibliographique	
I. Les rayonnements UV	4
1. Définition et différents types de rayonnements UV	4
2. Les UV, la croissance des plantes et la machinerie photosynthétique...	4
3. Les UV et la synthèse des flavonoïdes	8
<i>Rappels sur la biosynthèse de quelques flavonoïdes</i>	<i>9</i>
<i>Répartition des flavonoïdes dans la plante</i>	<i>10</i>
<i>Rôles biologiques des flavonoïdes</i>	<i>11</i>
<i>Les flavonoïdes et la protection contre les UV</i>	<i>13</i>
II. Les défenses des plantes contre les pathogènes	14
1. Effet des UV-C sur la résistance des plantes aux pathogènes.....	15
2. Effet de la fertilisation azotée sur la résistance des plantes aux pathogènes.....	17
III. Les UV et le potentiel de conservation poste-récolte des fruits et légumes	19
IV. La salinité.....	21
1. Effets physiologiques de la salinité.....	21
2. Le stress oxydatif : réponse commune à toutes les contraintes.....	23
<i>Origine et conséquences du stress oxydatif.....</i>	<i>25</i>
<i>Les marqueurs du stress oxydatif.....</i>	<i>25</i>
3. Le «Priming» : Une stratégie d'amélioration de la réponse au sel.....	27
CHAPITRE 2 Matériel & Méthodes	
I. Matériel végétal : la laitue (<i>Lactuca sativa</i> L).....	30
1. Classification.....	30
2. Culture.....	32
3. Modèle d'étude.....	33
II. Conduite des expériences.....	33
1. Conditions des cultures.....	33

Sommaire

1.1. Culture sous serre: Travail réalisé en collaboration avec le GRAB (Groupe de Recherche en Agriculture Biologique).....	33
1.2. Culture sous serre en collaboration avec l'INRA Avignon.....	34
1.3. Culture hydroponique dans des conditions contrôlées du laboratoire ...	35
III. Expériences réalisées.....	36
<i>La première expérience est destinée au choix d'une dose d'UV-C non délétère pour l'aspect de la laitue.....</i>	36
<i>La seconde expérience a pour objectif d'étudier l'effet des UV-C sur la résistance de laitue Romaine à BC87 et SM.....</i>	37
<i>La troisième expérience est destinée à l'étude des effets combinés des UV-C et de la fertilisation azotée sur la résistance de la laitue Romaine à BC87 et SM....</i>	37
<i>Une quatrième expérience conduite sous serre a pour but d'étudier l'effet des rayonnements UV-C sur le potentiel de conservation après récolte de la laitue Romaine.....</i>	38
<i>Une cinquième expérience conduite dans des conditions contrôlées afin d'étudier l'effet du priming des graines de la laitue romaine par des UV-C sur sa capacité de croissance en condition de salinité</i>	39
IV. Techniques analytiques.....	40
1. Exposition aux radiations UV-C.....	40
2. Evaluation de l'état visuel des feuilles.....	40
3. Préparation des souches fongiques.....	40
4. Calcul de la surface de lésion.....	41
5. Quantification des pigments (chlorophylles et caroténoïdes).....	41
6. Mesure des paramètres de fluorescence chlorophyllienne par l'Handy PEA).....	42
7. Mesure de l'intensité respiratoire.....	43
8. Extraction et dosage des composés phénoliques par HPLC.....	43
8.1. Extraction.....	44
8.2. Principe de l'HPLC.....	45
9. Dosage des polyphénols totaux.....	45
10. Dosage des flavonoïdes.....	45

Sommaire

10.1. Principe.....	45
10.2. Manipulation.....	45
11. Détermination des teneurs en ascorbate et en déhydroascorbate	46
12. Détermination des indicateurs du stress oxydatif	46
12.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA).....	46
12.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	47
13. Mesure de l'activité anti radicalaire (contre le radical DPPH).....	48
14. Mesure de l'activité anti-oxydante totale.....	49
15. Extraction et dosage des éléments minéraux.....	49
16. Dosage des nitrites et des nitrates.....	50
16.1. Principe du dosage.....	50
16.2. Préparation de l'extrait à partir de la matière sèche broyée.....	50
17. Transformation de la laitue en produit 4 ^{ème} gamme.....	51
17.1. Définition.....	51
17.2. Etapes.....	51
* Le parage.....	51
* Le lavage.....	51
* L'essorage.....	52
* Le conditionnement.....	52
V. Analyses statistiques.....	53
CHAPITRE 3 Choix d'une dose non délétère d'UV-C	
Résumé.....	54
1. Introduction.....	54
2. Rappel du protocole expérimental.....	55
3. Résultats.....	55
3.1. Effet des UV-C sur l'aspect visuel des feuilles.....	55
3.2. Effet des différentes doses d'UV-C sur la fluorescence chlorophyllienne de la Romaine.....	55
3.3. Effet des différentes doses d'UV-C sur les teneurs en chlorophylle totale.....	58

Sommaire

4. Discussion.....	58
5. Conclusion.....	61

CHAPITRE 4 Effets des rayonnements UV-C sur la résistance de la laitue romaine à *BC87* et *SM*

<i>Résumé</i>	62
---------------------	----

1. Introduction.....	62
----------------------	----

2. Rappel du protocole expérimental.....	63
--	----

3. Résultats.....	64
-------------------	----

3.1. Effet d'un traitement des laitues romaines par des UV-C sur le développement des champignons, <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Sclerotinia minor</i> , sur leurs feuilles.....	64
--	----

3.2. Effet du traitement des feuilles par des UV-C sur leur état oxydatif après inoculation avec <i>BC87</i> et <i>SM</i>	64
---	----

3.3. Evaluation de la réponse antioxydante non enzymatique.....	66
---	----

<i>Pigments photosynthétiques</i>	66
---	----

<i>Polyphénols totaux</i>	68
---------------------------------	----

4. Discussion.....	69
--------------------	----

5. Conclusion.....	71
--------------------	----

CHAPITRE 5 Effet de la fertilisation azotée et des rayonnements UV-C sur la résistance de la laitue romaine à *Botrytis cinerea* (*BC87*) et à *Sclerotinia minor* (*SM*)

<i>Résumé</i>	72
---------------------	----

1. Introduction.....	73
----------------------	----

2. Rappel du protocole expérimental.....	73
--	----

3. Résultats.....	74
-------------------	----

3.1. Recherche d'une dose d'azote qui autorise une meilleure résistance aux champignons pathogènes.....	74
---	----

3.1.1. Fonctionnement photosynthétique des feuilles et fertilisation azotée.....	74
--	----

3.1.2. Etat oxydatif de la feuille de laitue romaine et fertilisation azotée.....	74
---	----

3.1.3. Effet de la fertilisation azotée sur les statuts en azote et en polyphénols de la feuille de laitue.....	77
---	----

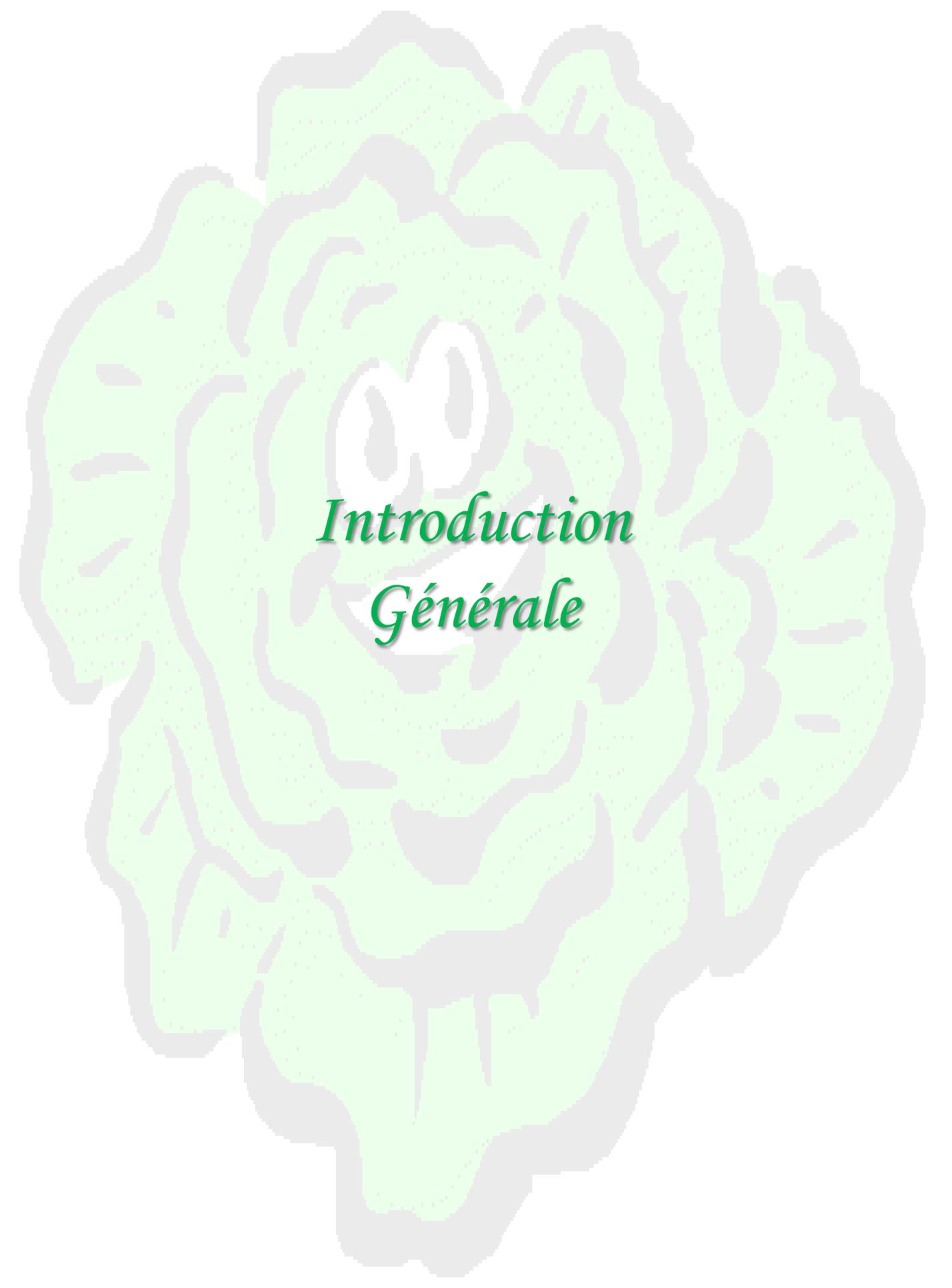
Sommaire

3.1.4. Effet de la fertilisation azotée sur la réponse de la laitue aux deux champignons, <i>Botrytis cinerea</i> et <i>Sclerotinia minor</i>	78
3.2. Effets des rayonnements UV-C sur la résistance de la laitue romaine à BC87 et SM.....	79
3.2.1. Effets de l'irradiation avec des UVC sur les teneurs en azote total et nitrique des feuilles avant inoculation.....	80
3.2.2. Effets des UV-C sur le comportement de la feuille de laitue vis-à-vis de l'inoculation avec BC87 et SM.....	80
Surface de lésion.....	81
Teneurs en pigments photosynthétiques.....	82
Teneurs en MDA et en H ₂ O ₂	85
Teneurs en poluphénols totaux	86
4. Discussion.....	88
5. Conclusion.....	91
CHAPITRE 6 Effet des rayonnements UV-C sur le potentiel de conservation après récolte de la laitue romaine	
Résumé.....	92
1. Introduction.....	92
2. Rappel du protocole expérimental.....	93
3. Résultats.....	93
3.1. Effet des UV-C sur l'aspect visuel des feuilles au cours du stockage... 93	
3.2. Effet des UVC sur l'indice de performance photosynthétique (PI)..... 94	
3.3. Effet des UV-C sur l'intensité respiratoire..... 95	
3.4. Effet des UV-C sur les teneurs en MDA et en H ₂ O ₂ 95	
3.5. Effet des UV-C sur les teneurs en chlorophylle totale..... 97	
3.6. Effet des UV-C sur les teneurs en Vitamine C..... 98	
3.7. Effet des UV-C sur les teneurs en caroténoïdes au cours du stockage. 98	
3.8. Effet des UV-C sur les teneurs en polyphénols au cours du stockage..99	
4. Discussion.....	100
5. Conclusion.....	102

Sommaire

CHAPITRE 7 Effet du priming aux UV-C sur la capacité de croissance de la laitue romaine en présence d'une contrainte saline

<i>Résumé</i>	104
1.Introduction	104
2. Rappel du protocole expérimental	105
3. Article	106
Conclusions générales et perspectives	115
Références bibliographiques	120
Annexes	152



*Introduction
Générale*

INTRODUCTION GENERALE

En Tunisie, les sols salins s'étendent sur 1,5 millions d'hectares soit environ 10% de l'ensemble du territoire et 30% des terres agricoles (Hachicha et Mtimet, 1994). De ce fait, la croissance et le développement des plantes cultivées peuvent être limités par cette contrainte. D'autre part, les feuilles tendres de la laitue sont aussi la cible de nombreuses attaques pendant leur croissance comme le mildiou et la pourriture grise causée par *Botrytis cinerea*. Afin de protéger les plantes, on recourt à l'usage des produits phytosanitaires. Ces derniers soulèvent des inquiétudes grandissantes auprès de la population avec pour effet un renforcement progressif des mesures réglementaires afin de réduire leur usage. Par ailleurs l'adaptation des bio-agresseurs à ces produits réduit l'efficacité des traitements.

Dans le contexte actuel du développement durable et du respect de l'environnement, l'application de traitements ne présentant pas les inconvénients des pesticides, utilisables pour stimuler la résistance des plantes contre les bio-agresseurs et leur capacité de croissance en présence d'une contrainte saline représente un enjeu majeur.

Parmi ces traitements innovants, les rayonnements UV-B apparaissent prometteurs par leur effet marqué sur la résistance des plantes contre les contraintes abiotiques et biotiques (Rozema et al, 1997). Les mécanismes d'action et les cibles moléculaires de ces radiations sont bien identifiés (Jansen et al, 1998). Toutefois, les UV-B doivent être appliqués pendant des périodes relativement longues pour être efficaces. C'est la raison pour laquelle il a été choisi d'étudier, dans le cadre de ce travail de thèse, les rayonnements UV-C, et leurs effets autres que les effets de désinfection (Siddiqui et al ,2011). Ces rayonnements renforcent la teneur en micronutriments et aussi la résistance des plantes aux pathogènes (Charles et al, 2008). Il a été bien démontré aussi qu'appliqués à fortes doses, les UV-C sont

délétères, alors qu'administrés à faibles doses, ces mêmes rayonnements élicitent des réponses bénéfiques. (Mercier et al, 2001).

C'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse dont l'objectif principal est de choisir une dose non délétère d'UV-C et d'étudier son effet sur la réponse de la laitue romaine aux contraintes biotiques et abiotiques. Nous avons choisi de travailler sur la laitue romaine (*Lactuca sativa* L.) parce que ce légume feuille est important pour la filière fruits et légumes tunisienne et mondiale, et comme composante du régime alimentaire par sa richesse en composés phénoliques et en caroténoïdes bénéfiques pour la santé. La laitue romaine est aussi une source de vitamine K, de vitamine B9, de vitamine C et de fer. Ces différents constituants jouent un rôle important dans la coagulation sanguine et la prévention des maladies cardiovasculaires, ainsi que dans le transport d'oxygène dans le sang.

Mon travail a été organisé en cinq parties, auxquelles correspondent cinq chapitres de résultats.

La première partie a porté sur le «Choix d'une dose non délétère d'UV-C», l'objectif étant d'identifier la dose en dessous de laquelle il n'y a pas d'effet négatif pour la physiologie de la plante.

La deuxième partie a consisté à tester l'effet de cette dose sur la résistance de la laitue romaine à *Botrytis cinerea* (BC87) et *Sclerotinia minor* (SM). Ce choix est justifié par le fait que ces deux pathogènes importants pour la culture de la laitue sont très étudiés à l'unité de phytopathologie de l'INRA à Avignon. Le deuxième chapitre de résultats est intitulé «Effets des rayonnements UV-C sur la résistance de la laitue romaine à *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*».

Dans la littérature, il a été observé que la maîtrise de la fertilisation azotée jouait un rôle dans la résistance des plantes contre les pathogènes (Navarette et al,2010). J'ai voulu vérifier s'il y avait une interaction entre l'application de rayonnements UV-C et la fertilisation azotée sur la résistance de la laitue romaine contre les pathogènes étudiés à l'étape précédente. Le troisième chapitre de résultats porte donc sur «L'effet combiné de la fertilisation azotée et des rayonnements UV-C sur la résistance de la laitue romaine à *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*».

Comme la laitue romaine est un légume feuille très consommé en produit 4^{ème} gamme, j'ai étudié les «Effets des rayonnements UV-C sur le potentiel de conservation après récolte de la laitue romaine».

Plusieurs études ont été effectuées sur plusieurs espèces végétales, spontanées et cultivées, afin de préciser leur seuil de tolérance à la contrainte saline, d'une part, et d'identifier les mécanismes impliqués dans leur capacité à croître dans ces conditions, d'autre part. Sachant qu'un stress modéré peut amplifier la capacité des plantes de croître en présence d'une autre contrainte abiotique, il a été décidé d'étudier dans le dernier chapitre de ma thèse l' « Effet du priming aux UV-C sur la capacité de la laitue romaine à croître en présence d'une contrainte saline ».



Chapitre I

Synthèse Bibliographique

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les rayonnements UV

1. Définition et différents types de rayonnements UV

Les rayonnements ultraviolets (UV) sont des rayonnements électromagnétiques émis par le soleil ou par une source artificielle. Leur domaine spectral s'étend de 100 à 400 nm, dans la gamme des rayonnements optiques invisibles pour l'œil humain.

Trois types de rayonnements UV ont été distingués selon leurs activités biologiques et leur pouvoir de pénétration dans la peau. Ils correspondent à trois plages de longueurs d'ondes :

- les UVA, de longueurs d'ondes 315 à 400 nm, représentent 95% des rayons ultraviolets qui atteignent la surface de la terre.

- les UVB, de longueurs d'ondes 280 à 315 nm, sont, en grande partie, arrêtés par la couche d'ozone, mais ceux qui la franchissent sont responsables de dommages à court terme, tels que les coups de soleil.

- les UVC, de longueurs d'ondes 100 à 280 nm, sont les plus dangereux, mais ils sont absorbés en totalité par la couche d'ozone.

2. Les UV, la croissance des plantes et la machinerie photosynthétique

Le développement des plantes est possible grâce à la présence de la couche d'ozone qui joue le rôle d'un écran vis-à-vis des rayonnements UV au niveau de la stratosphère. Cette couche, en jouant le rôle d'un filtre à UV, absorbe les rayons solaires UV-C et une partie des rayonnements UV-B. Une des conséquences de l'application des rayons UV sur les plantes, est la génération du stress oxydatif (Costa *et al.*, 2002) suite à la formation des espèces réactives oxygénées qui

peuvent altérer les lipides, les pigments, les protéines et même les acides nucléiques (Dai *et al.*, 1997).

Les rayonnements UV-A sont moins néfastes que les rayonnements UV-B et UV-C sur les plantes (Barta *et al.*, 2004). La dose ou fluence, qui s'obtient simplement en multipliant la puissance par le temps, dépend de la puissance des lampes et du temps d'exposition. Quoiqu'elles constituent un composant mineur du spectre solaire, les radiations UV-B sont capables d'affecter de manière disproportionnée les processus métaboliques chez les animaux, l'homme, les plantes et les microorganismes. L'intérêt accordé à l'étude des effets de ces radiations sur les plantes prend de plus en plus d'ampleur. Les longueurs d'ondes UV-B sont biologiquement actives, mais elles sont aussi les plus agressives. Toutefois, les niveaux perçus par les plantes dépendent de la latitude et de la durée d'exposition, autrement dit de l'intensité d'exposition (Houghton JT *et al.*, 2001).

Chez les plantes, les radiations UV-B peuvent interférer avec la croissance, le développement, la photosynthèse, la floraison, la pollinisation et la transpiration (Rozema *et al.*, 1997). Un grand nombre de publications relatant l'effet de ces radiations sur la reproduction des plantes (Phoenix *et al.*, 2002), ont souligné leur influence sur le développement, la production du fruit incluant le développement des structures reproductives, la formation du nectar, l'activité des pollinisateurs, la viabilité du pollen et la germination, ainsi que la reproduction végétative (Bjorn, 2002).

Outre ces effets, les radiations UV-B induisent des modifications morphologiques au niveau de la feuille et au niveau de la plante entière (Rozema *et al.*, 1997). Par exemple, l'enroulement des feuilles, afin de réduire la surface foliaire touchée par ces rayonnements, est une réponse photo-morphogénique qu'on observe à des doses faibles d'UV-B (Greenberg *et al.*, 1996). L'épaississement de la feuille est une autre stratégie de protection qui peut être accompagnée d'une redistribution de la chlorophylle de sa surface adaxiale (Day and Vogelmann, 1995). Les UV-B peuvent aussi être à l'origine de changements dans la forme de la feuille, résultant peut-être d'une inhibition non homogène de la croissance

(Greenberg *et al.*, 1996). Les changements dans la morphologie de la plante, résultat d'une exposition à ce type de radiations, sont dûs en plus grande partie à la balance compétitive entre les espèces qu'aux changements dans la machinerie photosynthétique (Barnes *et al.*, 1990).

Outre sa fonction de barrière de protection mécanique, l'épiderme des feuilles joue un rôle assez important dans la protection du mésophylle chlorophyllien sous-jacent contre les effets induits par des rayonnements UV. Ce rôle de filtre de l'épiderme est réalisé grâce aux composés phénoliques, aux flavonoïdes et aux acides hydroxycinamiques. Les flavonoïdes peuvent être présents sous forme de glycosides dans les vacuoles des cellules épidermiques (Strid *et al.*, 1990). Quant aux acides hydroxycinamiques, outre cette forme, ils peuvent être dans la plupart des cas estérifiés dans la cuticule, avec l'hémicellulose de la paroi cellulaire ou même avec des flavonoïdes (Furuya et Galston, 1965). La comparaison du spectre d'absorption peut fournir un outil assez précis pour l'identification des classes de phénols présents dans les feuilles des plantes. Une bonne corrélation négative entre les absorbances des extraits foliaires totaux et entre les transmittances épidermiques a bien confirmé que l'épiderme était le premier responsable de l'absorption des rayons UV dans les feuilles des plantes (Furuya et Galston, 1965).

Par ailleurs, des études, réalisées sur le Sorgho (*Sorghum vulgare* L.), ont évalué l'impact des rayonnements UV-B sur la biomasse, les teneurs en pigments photosynthétiques, en flavonoïdes et en acide ascorbique ainsi que sur les activités de la peroxydase et de la catalase. Au terme de 60 jours de culture en plein champ à des doses ambiantes normales et élevées de rayonnement UV-B, une diminution de la photosynthèse liée à une baisse de la conductance stomatique est enregistrée chez cette espèce. Cet effet est accompagné par une réduction des teneurs des pigments chlorophylliens et des caroténoïdes (Ambasht et Agrawal, 1998). En revanche, chez le petit pois, aucun effet spécifique direct de ces rayonnements sur les enzymes des voies de biosynthèse de la chlorophylle n'a été observé chez des plantes éclairées, que ce soit avec une lumière visible complétée par des doses de lumière UV-B, ou avec une lumière visible de contrôle précédée par une courte exposition de quelques heures aux UV-B (Strid et Porra, 1992). Selon les auteurs de

ce travail, l'effet majeur des radiations UV-B serait une mauvaise régulation génétique des voies de biosynthèse de ces pigments conduisant à leur dégradation.

Par contre, il a été mis en évidence que les rayons UV-B stimulaient la biosynthèse des pigments foliaires (chlorophylles et caroténoïdes), ce qui a permis à Campos *et al.* (1991) de leur attribuer une fonction photo protectrice. Dans le même ordre d'idée, Middleton et Teramura (1993) ont suggéré l'implication des caroténoïdes dans la protection directe des photosystèmes contre ces rayonnements. Toutefois, les analyses par régression n'ont révélé aucune relation directe entre les niveaux de la photosynthèse et celui des pigments foliaires absorbant les UV-B. L'effet remarquable est une augmentation des teneurs en pigments photosynthétiques, en particulier celles des caroténoïdes, qui est liée à la masse totale et à l'efficacité photosynthétique. En effet, chez les plantes, les rayonnements UV-B exercent leurs effets nocifs au niveau de plusieurs sites cellulaires, notamment au niveau des chloroplastes qui constituent le siège de la synthèse de la chlorophylle et celui de la photosynthèse. Plusieurs composants de la membrane thylacoïdale sont affectés par ces rayonnements. Il a été noté, par exemple, une diminution de l'activité de l'ATP synthase et un dysfonctionnement irréversible de l'activité du photosystème II (Strid *et al.*, 1990, Zhang *et al.*, 1997), ainsi qu'une perturbation de l'activité de 1,5 Ribulose Biphosphate Carboxylase Oxygénase (Jordan *et al.*, 1992).

Si pour certains auteurs, comme Krizek *et al.* (1998), l'effet néfaste des rayonnements UV sur la production de la matière fraîche et sur le nombre de feuilles pourrait être dû aux dommages occasionnés au niveau de la machinerie photosynthétique, pour d'autres, ce ne serait pas le cas. En effet, selon Tsormpatsidis *et al.* (2007), c'est la biosynthèse des anthocyanes, absorbant dans le spectre de la photosynthèse, qui serait à l'origine d'une réduction de la capacité photosynthétique des feuilles, et donc de leur croissance. Une autre cause possible de cet effet est que la production de plus en plus importante de métabolites secondaires agirait en compétition directe avec la croissance de la plante pour l'assimilation du carbone. Une recherche récente réalisée par Mahdavian *et al.*

(2008) sur le piment d'ornementation, *Capsicum annuum* L. a montré l'importance de l'accumulation des flavonoïdes, spécialement la quercétine, en réponse à une exposition de 27 minutes par jour, durant 14 jours, à des rayonnements d'UV-A (320-390 nm), d'UV-B (312 nm) et d'UV-C (254 nm), ce qui correspond à des doses respectives de 6.1, 5.8 et 5.7 W.m⁻² respectivement. Les résultats ont révélé une diminution significative des teneurs en chlorophylle a, en chlorophylle b et en chlorophylle totale, mais seulement sous l'effet des rayonnements UV-B et UV-C, par comparaison avec celles des plantes témoins. Toutefois, cet effet est plus marqué chez les plantes traitées aux UV-C. Des effets similaires sont notés pour les caroténoïdes, avec des diminutions de 11 et de 20%, respectivement chez les plantes exposées aux UV-B et aux UV-C. Pour Smith *et al.* (2000), la réduction des pigments chlorophylliens a un effet négatif sur l'efficacité de la photosynthèse et, de ce fait, sur l'accumulation de la biomasse et servira ainsi d'indicateur de la sensibilité aux rayonnements UV-B. En outre, les caroténoïdes jouent un rôle protecteur des plantes contre les rayonnements UV-B (Rau *et al.*, 1991) et les rayonnements UV-C (Campos *et al.*, 1991).

3. Les UV et la synthèse des flavonoïdes

Récemment, les flavonoïdes ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leurs effets bénéfiques sur la santé humaine. Ils ont des effets antiagrégants plaquettaires, antiviraux, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-tumoraux et des activités antioxydantes (Ross et Kasum, 2002). C'est une classe de composés phénoliques omniprésents dans les plantes, y compris dans les fruits, les légumes et les céréales, que ce soit au niveau de leurs feuilles, de leurs tiges, de leurs fleurs, de leurs fruits ou du pollen. Le terme «flavonoïdes» proviendrait de flavedo, désignant la couche externe des écorces d'oranges. Ils sont reconnus pour jouer de multiples rôles dans les réactions des plantes supérieures contre des agents stressants d'origine différente, allant de la défense contre les pathogènes et les prédateurs à la protection des feuilles contre le rayonnement solaire (Ross et Kasum, 2002). Les anthocyanes comptent parmi les flavonoïdes qui ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Ce sont des composés solubles dans l'eau qui

donnent la couleur pourpre aux feuilles et aux organes (Harborne, 1988). Leur synthèse dans le cytoplasme est suivie par leur séquestration active dans les vacuoles grâce à des pompes à glutathion (Mars *et al.*, 1995). Par exemple, il a été montré que la glutathion S-transférase (GST) est impliquée dans la séquestration vacuolaire de ces pigments chez le maïs.

La quercétine est un autre type de flavonoïde ayant une activité antioxydante et utilisé depuis plus de trente ans pour renforcer la résistance aux allergies alimentaires et respiratoires. Ses effets biologiques s'expliquent principalement par son activité anti-oxydante, par une synergie spécifique avec la vitamine C (quercétine et vitamine C se protègent et se régénèrent mutuellement) et par une activité anti-inflammatoire diversifiée et polyvalente.

Rappels sur la biosynthèse de quelques flavonoïdes. Les flavonoïdes proviennent de deux voies principales du métabolisme secondaire des plantes: la voie shikimique et la voie de l'acétate (Ross et Kasum, 2002). Ils possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques; deux cycles en C6, reliés par une chaîne en C3. Selon leur structure chimique, ils sont classés en flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, catéchines, anthocyanes et chalcones (Ross et Kasum, 2002). Les précurseurs de la biosynthèse des anthocyanes sont les flavan-3,4-*cis*-diol ou leucoanthocyanidines (Heller et Geiger, 1988). L'aglycone de l'anthocyane, qui est aussi le chromophore, est appelé anthocyanidine. Le chromophore est en fait une molécule colorée qui désigne le groupement d'atomes au sein de cette molécule qui est responsable de sa couleur. Cette propriété optique résulte d'une capacité à absorber l'énergie des photons dans une gamme du spectre visible tandis que les autres longueurs d'onde sont transmises ou diffusées. Le plus souvent, les anthocyanes sont glycosylés en position 3 et 5. Les sucres les plus fréquents sont des sucres simples, ce sont des monosaccharides comme le glucose qui est un ose simple et plus particulièrement un aldose, un isomère d'autres sucres comme le mannose et le fructose, de formule $C_6H_{12}O_6$, et le galactose qui est un épimère du glucose au 4^{ème} carbone. A leur tour, les sucres peuvent être acylés par l'acide cinnamique de

formule $C_6H_5-CH=CHCOOH$ qui est un acide organique de faible solubilité dans l'eau.

Outre l'acide cinnamique, d'autres acides peuvent acyler les sucres comme l'acide caféique qui est un composé organique présent dans toutes les plantes. C'est un intermédiaire clé dans la biosynthèse de la lignine et un dérivé de l'acide cinnamique ou encore l'acide malonique de formule $HOOC-CH_2-COOH$ (Brouillard et Dangles, 1993).

Comme tous les autres flavonoïdes, les anthocyanidines présentent une absorption caractéristique dans le domaine des UV (Markham, 1998).

Répartition des flavonoïdes dans la plante. L'une des caractéristiques les plus importantes de l'accumulation des métabolites secondaires est sa dépendance du stade de développement des plantes ainsi que de l'organe, du tissu, des cellules concernées et du type de stress environnemental en cause (Dixon, 1999). La distribution des phénols dans les plantes, dans le tissu et dans les cellules foliaires n'est pas uniforme (Naczki et Shahidi, 2006).

A l'échelle cellulaire, la localisation des composants est très spécifique. Ils s'accumulent principalement dans deux sites : la paroi cellulaire et la vacuole. Les flavonoides, comme la quercétine et le kaempférol, peuvent être présents au niveau du noyau et de la membrane plasmique, mais toujours à très faible concentration.

A l'échelle tissulaire, des répartitions inégales des différents composés phénoliques sont observées. En effet, les anthocyanes et les flavonols sont présents dans les couches externes et, en particulier, au niveau des épidermes des fruits et des feuilles (Sarni et Cheynier, 2006).

Les polyphénols sont particulièrement abondants dans les fruits. Leur teneur peut atteindre 263,8 mg GAE/100 g dans certains fruits comme les fraises, les pommes et les raisins. Les légumes en contiennent aussi des quantités importantes. Le champion de toute catégorie est l'artichaut avec une concentration de 321,3 mg GAE/100 g. Parmi les 20 premiers fruits et légumes les plus riches en polyphénols, 60 % correspondent aux fruits et 40 % aux légumes (Brad *et al.*, 2008).

Chez la majorité des plantes, la pigmentation est limitée à des tissus spécifiques et elle est généralement régulée par des facteurs externes et internes comme la lumière (Piazza *et al.*, 2002) et l'horloge biologique. La régulation de la synthèse de ces pigments se fait par un contrôle coordonné de la transcription des gènes de structure (Mol *et al.*, 1998).

Rôles biologiques des flavonoïdes. La large diffusion des flavonoïdes sur la surface des feuilles et dans les cellules de l'épiderme peut constituer un bouclier efficace contre la pénétration des rayons UV-B, en raison de leurs propriétés optiques (Tattini *et al.*, 2006). Outre l'absorption de ces radiations, les flavonoïdes assurent d'autres fonctions. En effet, ils jouent un rôle assez important dans l'allélopathie, dans la transduction des signaux, dans la défense chimique contre les herbivores et dans la rigidité structurelle (Strack, 1997). Chez les plantes supérieures lignifiées, cette rigidité constitue le support du transport de l'eau à travers les vaisseaux du xylème.

Plus récemment, les flavonoïdes ont montré des fonctions antioxydantes dans les tissus exposés à diverses contraintes environnementales (Toor *et al.*, 2006). L'activité antioxydante des flavonoïdes provient de leur capacité à donner un atome d'hydrogène à partir d'un groupe hydroxyle aromatique à un radical libre, ce qui mène à un radical phénolique stable (Ross et Kasum, 2002). Cette activité est également liée à leur capacité à piéger les radicaux à l'interface de la membrane, ce qui empêche la progression de leur réaction en chaîne (Ross et Kasum, 2002). En plus des propriétés de neutralisation des radicaux dans les milieux aqueux et organiques, l'activité antioxydante des flavonoïdes découle de la protection et de l'amélioration de la production des antioxydants endogènes, ainsi que de leur capacité à chélater les ions métalliques de transition, et à empêcher la propagation de la réaction de lipoxygénation (Ross et Kasum, 2002).

Des recherches faites sur *Capsicum annuum* L. ont montré que l'activité des enzymes anti-oxydantes comme la peroxydase, la polyphénol oxydase, l'ascorbate peroxydase et la catalase est renforcée au niveau des feuilles et des racines en réponse aux radiations UV-B et UV-C. Ces résultats sont aussi confirmés par les

travaux menés par Karishma *et al.* (2004) sur le concombre, et qui ont prouvé que les activités de la superoxyde dismutase, la gaïacol peroxydase et la glutathion réductase sont augmentées en réponse à une forte exposition aux radiations UV-B.

L'induction des anthocyanes par les contraintes environnementales (Chalker-Scott, 1999) a permis d'identifier certaines des fonctions qu'elles assurent dans les feuilles:

- modification de la quantité et de la qualité de la lumière capturée (Lee, 1986; Barker *et al.*, 1997),
- défense contre les herbivores (Coley et Kusar, 1996),
- protection contre la photoinhibition (Gould *et al.*, 1995; Dodd *et al.*, 1998),
- élimination des espèces réactives de l'oxygène en condition de stress (Yamasaki, 1997; Sherwin et Farrant, 1998), et enfin,
- protection contre les effets des UV-B (Burger et Edwards, 1996; Klaper *et al.*, 1996).

Les anthocyanes sont aussi des composés osmotiquement actifs, puisque leur présence peut améliorer l'état hydrique des plantes (Chalker-Scott, 1999). Kaliamoorthy et Rao (1994) ont rapporté jusqu'à 40% d'accumulation d'anthocyanes chez le maïs en réponse à la salinité. En outre, les anthocyanes s'accumulent en réponse aux UV-B (Mendez *et al.*, 1999), à la sécheresse (Balakumar *et al.*, 1993), aux basses températures (Krol *et al.*, 1995), aux déficiences nutritionnelles (Rajendran *et al.*, 1992) et à l'ozone (Foot *et al.*, 1996). Leur accumulation a été décrite chez plusieurs plantes y compris *Morus alba* (Ramanjulu *et al.*, 1993), *Arabidopsis thaliana* (Mita *et al.*, 1997) et les feuilles de *Hedera helix* cultivées en présence de sucres (Murray *et al.*, 1994).

Les plantes en plein champ, qui sont exposées à la température ambiante et aux rayonnements solaires UV-B (de longueurs d'ondes 280 à 315 nm), présentent souvent une résistance accrue aux insectes herbivores par rapport aux plantes cultivées sous les filtres qui excluent la composante UV-B du rayonnement solaire (Johannes, 2003). Les photorécepteurs pour les radiations UV-A et pour la lumière visible sont bien caractérisés. Ces photorécepteurs sont les phytochromes, les cryptochromes, les phototropines et les UVR 8. Le phytochrome, le plus

anciennement connu, est un photorécepteur des organismes végétaux, capable de percevoir la lumière rouge (650 à 750 nm) et d'engendrer une réponse caractéristique. Il existe sous deux formes: l'une physiologiquement active et l'autre inactive; le passage de l'une à l'autre s'effectue sous l'action de certaines longueurs d'onde. Certaines réponses photo-morphogéniques à des radiations UV-B nocives n'impliquent pas ces récepteurs bien qu'ils peuvent co-réguler leurs voies de signalisation (Wade *et al.*, 2001). Les réponses au stress induit par de fortes radiations UV-B sont dues à des événements non spécifiques de la reconnaissance de ces rayonnements.

Les flavonoïdes et la protection contre les UV. Les radiations solaires UV-B sont connues par leur stimulation de la PAL (Phénylalanine Ammonium Lyase) qui est l'enzyme responsable de la transformation de la phénylalanine en acides trans-cinnamiques générant la formation de composés phénoliques comme les flavonoïdes, les tanins et les lignines, et la CHS (Chalcone Synthase) et d'autres enzymes qui sont impliquées dans la voie de synthèse de ces composés.

Les flavonoïdes et les composés phénoliques absorbent les UV-B et constituent, de ce fait, un filtre protégeant la plante contre les dégâts que peuvent engendrer ces rayonnements nocifs (Rozema *et al.*, 1997). Ils forment ainsi une première ligne de défense qui protège les tissus photosynthétiques. En effet, les pigments localisés dans les cellules épidermiques, spécialement les flavonoïdes et les anthocyanes, réduisent la traversée de l'épiderme par les rayonnements UV-B, ce qui assure la protection des tissus internes et limite ainsi leur effet sur la photosynthèse (Caldwell *et al.*, 1983).

Une étude menée sur *Vicia faba* L. a révélé que dans leurs feuilles, les flavonoïdes présents sont essentiellement la quercétine et le kaempférol. (M. Al-Oudat *et al.*, 1998). La synthèse de la quercétine est inductible par les rayonnements UV-B, tel qu'il a été observé chez *Brassica napus* (Olsson *et al.*, 1998), alors que le kaempférol constitue un composé constitutif non inductible. Cette induction est localisée principalement au niveau de l'épiderme supérieur, comme il a été révélé par la technique de microscopie à fluorescence. Cependant, les

flavonoïdes présents dans le mésophylle et dans l'épiderme inférieur ne sont pas induits par les UV-B et représentent donc une fraction constitutive non inductible de ces composés. L'augmentation assez importante, enregistrée pour la quercétine au niveau de l'épiderme supérieur, peut être aussi liée à sa capacité antioxydante. Si les niveaux de quercétine sont augmentés en réponse à l'exposition aux rayonnements UV, ceux du kaempférol sont diminués avec le vieillissement des feuilles.

Des études menées sur la laitue rouge, *Lollo Rosso*, exposée aux différents rayonnements UV, et ce en jouant sur la transparence des films des tunnels, ont montré que plus la transparence était faible plus la production des flavonoïdes était forte et plus l'activité antioxydante importante (Macias *et al*, 2007). Ces études ont bien montré que la biosynthèse des flavonoides et l'activité antioxydante de la laitue rouge étaient renforcées d'une manière assez spectaculaire lorsque les plantes étaient cultivées sous un film peu transparent qui ne filtre pas assez efficacement les rayonnements UV.

D'après Macias *et al.* (2007), une exposition intense de la laitue aux radiations UV durant sa culture entraîne une augmentation, de l'ordre de 381 %, de la concentration de la cyanidine glycoside dans la totalité des feuilles parallèlement à une augmentation de la concentration de cyanidine, après hydrolyse, qui est passée de 165 à 793 $\mu\text{g.g}^{-1}$ MF. Ces résultats montrent bien que la cyanidine glycoside est le principal composant anthocyanique de la laitue rouge (*Lollo Rosso*).

II. Les défenses des plantes contre les pathogènes

Les maladies des plantes diminuent leur valeur sélective, mais aussi leur rendement agricole et on estime à 10% les pertes (Terrentroy, 1994) de la production potentielle mondiale dues aux maladies des plantes. La phytopathologie se préoccupe de plus en plus de l'interaction entre la plante, le pathogène et l'environnement: les pratiques culturales (irrigation, fertilisation) et les conditions climatiques (températures, hygrométrie, rayonnements).

L'effet des UV sur le comportement des cultures maraîchères vis-à-vis des champignons a été bien étudié. Les plantes en cours de culture ou même au cours

de leur stockage sont la cible de nombreuses attaques par des pathogènes, comme *Bremia lactucae* qui apparaît dès le stade cotylédons, *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*. Ces deux derniers, redoutables bien que microscopiques, attaquent le collet et les feuilles basales de la laitue. Une fois attaquées, ces parties ramollissent, brunissent et se couvrent d'un mycélium blanc dans le cas de *Sclerotinia* ou d'un feutrage gris dans le cas du *Botrytis* (connu sous le nom de pourriture grise). Ces dégâts peuvent se limiter à quelques feuilles ou s'étendre à l'ensemble du collet. Lors de l'infection de la plante par un pathogène, une réponse d'hypersensibilité se déclenche chez la plupart des plantes et constitue une composante de leurs mécanismes de défense. Elle se traduit par un phénomène de nécrose des cellules dès qu'elles sont infectées par un pathogène. Les premiers signes peuvent être observés seulement une heure après l'infection.

Le développement de ces différents champignons dépend dans la majorité des cas des pratiques culturales (fertilisation azotée notamment) et des systèmes d'irrigation. Plusieurs acteurs du domaine se sont intéressés à l'étude de l'effet de certains stress, comme le stress UV et le stress azoté, sur le développement des champignons attaquant les cultures maraîchères d'une façon générale.

1. Effet des UV-C sur la résistance des plantes aux pathogènes

Exposée à une dose de 3,7 kJ.m⁻² d'UV-C, la tomate, au stade vert, acquiert une résistance vis-à-vis du *Botrytis* au cours du stockage (Charles *et al.*, 2008). Cette résistance acquise suite à une irradiation par des UV-C est due à l'accumulation de rishitine à des concentrations inhibitrices pour le pathogène. La rishitine, une phytoalexine (un composé anti microbien de poids moléculaire faible , à la fois synthétisé et accumulé par la plante après avoir été exposé à des microorganismes), propre à la tomate, est une substance accumulée par la plante suite à son attaque par des micro-organismes, et elle n'est pas détectée chez le lot témoin n'ayant pas été exposé aux UV-C. La dose appliquée renforce donc la production de cette substance lors de l'inoculation avec l'agent pathogène, *Botrytis cinerea* (Charles *et al.*, 2008). Il est aussi prouvé que l'exposition des tomates vertes à ce type de rayonnement retarde la maturation entraînant donc un ralentissement

de la dégradation des chlorophylles, suivi par le renforcement de la résistance des tomates à ce pathogène *Botrytis cinerea*. Chez les fruits matures, les UV-C induisent l'accumulation de composés phénoliques et donc la formation d'une barrière biochimique constituée principalement de lignine et de subérine. Chez les fruits matures et verts, en pré stockage, l'exposition aux UV-C peut affecter le métabolisme des phénylopropanoïdes selon deux modes : soit ils déclenchent cette voie, dans les tissus intérieurs, d'une manière qui dépasse le renforcement des phénols lors de la maturation des fruits, soit ils influencent la nature chimique de la cire cuticulaire causant ainsi une réduction de la longueur de leur chaîne et une augmentation de la ramification des alcanes homologues. Donc l'accumulation des phénols simples, comme la lignine, et celle des phénols complexes, comme la subérine, est affectée par l'exposition aux UV-C.

Les rayonnements UV-C augmentent la synthèse de la scoparone dans l'épicarpe des agrumes matures (Rodov *et al.*, 1992), ce qui renforce la résistance de ces plantes à *Penicillium digitatum* Sacc (pourriture verte). Dans une étude de l'effet des UV-C sur la résistance des plantes aux pathogènes, Mercier *et al.* (2001) ont testé plusieurs doses (0.22; 0.44, 0.88 et 2.2 kJ.m⁻²) afin de choisir celle qui renforce la résistance du poivron à *Botrytis cinerea* au cours du stockage. En calculant l'incidence de la maladie, ils ont pu confirmer que 0,88 kJ.m⁻² est la dose qui induit une meilleure résistance aux champignons au cours du stockage. Ils ont aussi vérifié que l'exposition des poivrons rouges 24 heures avant l'inoculation avec *Botrytis cinerea* conférait aux plantes une résistance accrue contre ce pathogène. L'induction de cette résistance dépend de plusieurs facteurs. En effet, il a été mis en évidence que les UV-C induisaient une résistance des plantes vis-à-vis du pathogène quel que soit leur stade de maturité lors de l'application de ces rayonnements. L'autre facteur influençant cette induction est l'irradiation intermittente. En effet, le traitement par une dose unique de rayons UV-C à 0,88 kJ.m⁻² s'est révélé aussi efficace que le traitement par deux doses successives de 0,44 kJ.m⁻². Alors que le traitement par deux doses successives de 0,88 kJ.m⁻² n'a pas conduit à une meilleure résistance, il y a eu même une moindre résistance.

2. Effet de la fertilisation azotée sur la résistance des plantes aux pathogènes

En plus de l'oxygène, du dioxyde de carbone et de l'eau, les plantes ont besoin d'au moins 14 éléments minéraux pour une nutrition adéquate (Mengel et al, 2001). Une carence dans l'un de ces éléments minéraux réduit la croissance des plantes et le rendement des cultures. Les plantes acquièrent généralement leurs éléments minéraux à partir du sol. Six éléments minéraux, l'azote (N), le phosphore (P), le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium (Mg) et le soufre (S), sont nécessaires en grandes quantités, tandis que le chlore (Cl), le bore (B), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le nickel (Ni) et le molybdène (Mo) sont nécessaires en petites quantités.

Les légumes feuilles occupent une place très importante dans l'alimentation humaine, cependant elles constituent malheureusement un groupe d'aliments qui contribue à une consommation importante de nitrate par les êtres vivants. Lors d'une utilisation excessive d'engrais azoté, ces légumes peuvent accumuler des hauts niveaux de nitrate et, une fois consommées les êtres vivants, causent de graves problèmes pour la santé. Par conséquent, des efforts sont garantis pour minimiser l'accumulation de nitrates dans les légumes feuilles.

En général, les légumes accumulateurs de nitrate appartiennent aux familles des Brassicacées (roquette, les radis et la moutarde), Chénopodiacées (betteraves, bettes à carde et épinards), Amaranthaceae (*Amaranthus*), Asteraceae (laitue) et Apiaceae (céleri et le persil). (Santamaria, 2006).

La laitue *lactuca sativa* L. est bien connue par sa grande capacité à accumuler le nitrate dans ses feuilles ce qui peut affecter la santé humaine. Le nitrate est considéré comme un précurseur possible de nitrosamines cancérigènes (Addiscott, 2006; Cometti & Furlani, 2009). Cependant, il n'est toujours pas consensus, il n'est pas connu avec précision, si l'apport de nitrate est bénéfique ou nuisible pour la santé humaine (Light et al, 2008). Les plantes cultivées dans des systèmes hydroponiques ont montré des niveaux plus élevés par rapport à ceux qui sont cultivés dans les systèmes conventionnels (Beninni et al, 2002).

Dans le sol, l'azote se trouve sous forme organique (humus) ou minérale (ammonium NH_4^+ , nitrate NO_3^-). L'essentiel de la nutrition azotée des plantes est

assurée par les nitrates. L'azote sous forme d'ions nitrate, est un élément très soluble, peu retenu par le sol. Apporté en trop grande quantité, l'excédent est lessivé (dissous, puis emporté par l'eau circulant dans le sol) et donc perdu pour la plante. L'azote doit donc être apporté, autant que possible, juste avant son absorption par la plante, afin d'éviter le lessivage vers la nappe phréatique.

Les faibles besoins de la laitue romaine en azote sont satisfaits en été et en automne par la minéralisation de la matière organique. Les excès de fumure azotée favorise le *botrytis*, retardent la pomaison et peuvent provoquer l'accumulation de nitrates dans les feuilles.

En effet, les pratiques culturales influencent aussi le développement des pathogènes. (Datnoff *et al*, 2007). Dans ce contexte, plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude des effets de l'alimentation minérale sur la résistance des légumes et des fruits à un certain nombre de champignons.

Ainsi, une augmentation des apports peut selon l'élément minéral, la plante et la maladie considérée augmenter ou diminuer l'incidence et la sévérité des symptômes (Huber et Thompson, 2007). Cette diversité des effets de la fertilisation minérale, notamment azotée, est liée au fait que la nutrition des plantes peut exercer une influence aux différents niveaux de l'interaction hôte-pathogène. Les nutriments fournis à la plante ont un effet sur la croissance et le développement des cultures, donc sur l'architecture des plantes. Une fertilisation azotée excessive pourra favoriser un couvert dense et peu aéré, favorable au développement de champignons pathogènes. Parallèlement, la nutrition a un effet sur le métabolisme des plantes, notamment le métabolisme secondaire, qui inclut la synthèse de molécules impliquées dans la défense contre les maladies fongiques (comme les polyphénols totaux).

En effet, Navarette *et al*. (2010) ont prouvé que l'excès d'azote induit une sensibilité de la laitue à *Botrytis cinerea* et à *Sclerotinia sclerotirium*. Sur la tomate, au contraire, des réactions opposées ont été observées entre des souches de *Botrytis* agressives, défavorisées par de fortes teneurs en azote dans les plantes, et des souches peu agressives, favorisées par ces teneurs (Lecompte *et al*, 2010). De faibles niveaux de nutrition azotée seraient donc susceptibles de réduire la sévérité

des dégâts causés par deux champignons pathogènes causant des dégâts importants sur la laitue.

L'effet de la source d'azote dépend de l'espèce végétale et des conditions dans lesquelles elle est cultivée. Par exemple, Verhoeff (1965) a constaté une diminution de la sensibilité de la tomate à la moisissure grise quand elle est cultivée dans un sol riche en azote. Hoffland *et al.* (1999) ont trouvé une corrélation positive entre le rapport C/N des feuilles et la sensibilité des plantes de tomate à *B. cinerea*, et l'ont attribuée à des niveaux variables de sucres solubles disponibles dans la plante. Hobbs et Waters (1964) ont rapporté des résultats opposés avec des fleurs de chrysanthème dans ces conditions. Sol (1967) a constaté que les plantes de *Vicia faba* L. croissant sur milieu contenant de l'ammonium comme source d'azote sont plus sensibles à la pourriture grise que celles poussant sur milieu nitrique. Dans des expériences étudiant l'effet de la source d'azote sur la pourriture grise, il a été constaté que la source d'azote n'avait pas d'influence sur la sensibilité des aubergines ou du poivron à la pourriture grise. En revanche, une plus grande proportion de nitrate dans l'engrais est associée à une diminution de l'incidence de la maladie sur les plants de concombre (Elad *et al.*, 1993).

III. Les UV et le potentiel de conservation poste-récolte des fruits et légumes

L'application des UV-C sur les fruits et les légumes en post-récolte a pour but de prolonger leur durée de vie et d'améliorer leur qualité nutritionnelle. Ces effets varient en fonction des doses appliquées et des espèces végétales étudiées. L'effet de quatre doses d'UV-C (1.6 ; 2.8 ; 4.8 et 7.2 KJ.m⁻²) sur la qualité de la pastèque a été étudié par le suivi des changements qualitatifs de cubes stockés jusqu'à 11 jours à 5°C (Hernández *et al.*, 2010). Cette étude a révélé que l'augmentation des doses UV-C induisait une production légèrement plus élevée de CO₂ tout au long de la période de stockage et une baisse de la contamination microbienne, juste après l'illumination. Selon les attributs sensoriels de qualité, la durée maximale de conservation des fruits est de 11 jours à 5°C pour les lots témoins et irradiés avec de faibles doses d'UV-C (1,6 et 2,8 KJ.m⁻²), alors qu'elle n'est que de 8 jours à 5°C

pour ceux irradiés avec les deux autres doses élevées. Pombo *et al.* (2009) ont mis en évidence que les radiations UV-C retardaient le ramollissement des fraises.

Durant le stockage, les produits perdent leur valeur nutritionnelle. Plusieurs auteurs se sont intéressés aux traitements des végétaux en post-récolte, et ce afin d'essayer d'améliorer ou, au moins, de maintenir la valeur nutritionnelle de leurs produits. En effet, Kim *et al.* (2008) ont observé que la dégradation de la vitamine C des tomates était retardée après 7 jours de stockage à une température de 4 à 6°C, en présence de doses croissantes d'UV-C : 3.2, 9.6 et 19.2 kJ.m⁻². Selon ces auteurs, le traitement aux UV-C renforce les teneurs de la tomate en polyphénols totaux. D'autres travaux ont montré que l'exposition d'ananas à des rayonnements UV-C pendant 60 et 90 secondes entraînait une diminution de la réduction de la fermeté du fruit, une inhibition de l'augmentation du degré d'acidité et une inhibition de la réduction des sucres. Toutefois, ces rayonnements causent une diminution du contenu en vitamine C de ce fruit et induisent un brunissement du fruit coupé au cours du stockage (Yong-Gui Pan *et al.*, 2012).

Le processus de maturation des fruits et des légumes se traduit par la dégradation ou la transformation des pigments chlorophylliens. Certains chercheurs ont essayé de ralentir cette dégradation afin de prolonger la durée de vie du végétal au cours du stockage. En effet, Charles *et al.* (2008) ont observé que l'application d'une dose d'UV-C de 3.7 kJ.m⁻² sur les tomates ralentissait la dégradation de la chlorophylle et retardait la maturation du fruit. La dose de 0.03 kJ.m⁻² appliqué sur les bananes par Pongprasert *et al.* (2011) s'est révélée suffisante pour ralentir la dégradation de la chlorophylle, et ce en inhibant l'activité de la chlorophyllase. Une dose d'UV-C de 10 kJ.m⁻² a retardé aussi la dégradation de la chlorophylle chez *Brassica oleracea* L. à une température de stockage de 20°C. Les teneurs en caroténoïdes chez la carotte sont renforcées suite à une exposition à une dose d'UV-C de 0.78 kJ.m⁻² (Alegria *et al.*, 2012).

Les rayonnements UV-C induisent aussi une augmentation des teneurs en polyphénols au cours du stockage chez la tomate (Charles *et al.*, 2008). Une accumulation de ces composés au cours du stockage a aussi été mise en évidence par Kim *et al.* (2008) chez la tomate exposée à des doses de 3.2; 9.6 et 19.2 kJ.m⁻².

Toutefois, d'autres chercheurs ont observé une diminution des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes suite à l'exposition à des doses d'UV-C de 4, 7, 10 et 14 kJ.m⁻² chez *Brassica oleracea* L.

IV. La salinité

La Tunisie possède de vastes étendues salées (Chott et Sebkha) et d'importantes quantités d'eaux de qualité très médiocre (Mhiri, 1997). Cette situation est aggravée par une évaporation estivale intense qui favorise la remontée des sels en surface, diminue le potentiel osmotique de la solution de sol et provoque la mortalité des plantes (Guerrier, 1983).

Pour soutenir la production agricole des terres affectées par la salinité, deux solutions ont été proposées, l'une reposant sur une meilleure gestion de l'irrigation, et l'autre sur l'utilisation de variétés plus tolérantes au sel. L'étude du comportement des plantes en milieu salin a montré qu'il existait un seuil de salinité toléré par les plantes, qui est très variable suivant les espèces, mais aussi suivant les variétés (Maas, 1986). Il est établi actuellement que la capacité à tolérer des concentrations salines plus ou moins fortes est un caractère génétique chez les plantes, et qu'il existe un potentiel génétique *à priori* exploitable pour l'amélioration (Epstein *et al.*, 1980). Or, cette amélioration passe par l'identification des caractères que les améliorateurs peuvent exploiter dans des programmes de sélection (Munns, 1993).

1. Effets physiologiques de la salinité

En termes physiologiques, l'effet dépressif du sel (NaCl) du milieu sur la physiologie de la plante peut s'exercer de manières différentes. Une forte concentration saline entraîne une diminution du potentiel osmotique dont l'objectif est d'empêcher le potentiel hydrique cellulaire de devenir supérieur à celui des milieux extérieurs et extracellulaires. Ce phénomène assure, d'une part, la continuité de l'absorption de l'eau du sol, et d'autre part, la rétention de l'eau et le maintien de la turgescence cellulaire. Lorsque l'ajustement osmotique (qui n'est d'autre que le maintien de la turgescence des cellules et l'accumulation dans le cytoplasme de composés osmoprotecteurs) cellulaire n'est pas suffisant, l'eau a

tendance à quitter les cellules, ce qui induit un déficit hydrique et une perte de la turgescence (Gorham *et al.*, 1990). Ensuite, les concentrations salines trop fortes provoquent une altération de la nutrition minérale, notamment par la compétition pour les transporteurs ioniques cellulaires entre les ions de sodium et de chlorure, d'une part, et les ions indispensables à la croissance, d'autre part (Jacoby, 1994). Les études ont montré qu'un excès de Na^+ et de Cl^- dans le milieu de culture était responsable d'une faible absorption de certains nutriments essentiels tels que K^+ et NO_3^- (Attia *et al.*, 2008), d'une mauvaise utilisation de Ca^{2+} et de H_2PO_4^- ainsi que d'une inhibition de l'exportation du phosphore de la racine vers les feuilles (Attia *et al.*, 2008).

Par ailleurs, il est généralement admis que le sel véhiculé par le xylème entrerait dans les cellules des parties aériennes par des transporteurs ou canaux à cations peu spécifiques (Jacoby, 1994). L'effet dépressif du sel accumulé dans les tissus peut se manifester de deux façons. Il peut se traduire, d'une part, par une toxicité qui survient lorsque sa concentration dans le compartiment cytosolique excède celle qui est compatible avec une activité métabolique normale (Munns, 1993; 2002). D'autre part, la saturation de l'apoplasme par le sel «montant» est un autre facteur déterminant de la nécrose et de la mort cellulaire car, par un effet osmotique, le sel concentré dans ce compartiment provoque une sortie d'eau intracellulaire, ce qui conduit à une déshydratation rapide des cellules (Munns, 1993). Deux types de comportement ont pour effet d'éviter la saturation en sel de l'apoplaste. Dans le premier type, le sel montant est accumulé dans les cellules des parties aériennes (type «include»); dans le second type, le sel est réexpédié via le phloème vers les racines où il est stocké (type «exclude»). C'est pourquoi la plus ou moins grande tolérance des plantes dépend notablement de leur capacité à répartir le sel entre leurs différents organes, tissus et compartiments cellulaires (Kim *et al.*, 2008). L'accumulation préférentielle du sel dans les cellules des parties aériennes est un caractère déterminant du degré de tolérance de différentes espèces (Maas, 1986).

L'inhibition de la photosynthèse par NaCl est l'une des causes de la réduction de la croissance et de la productivité végétale (Wang et Nil, 2000). Ceci peut

résulter des effets inhibiteurs directs du sel sur les réactions biochimiques de la photosynthèse (Jeschke *et al.*, 1992). L'inhibition de la photosynthèse peut être aussi attribuée aux restrictions imposées par le sel sur l'ouverture stomatique et donc sur l'apport du CO₂ à la feuille (Kyparassis *et al.*, 1995). A des concentrations modérées de sel, l'activité photochimique est insensible au sel. L'inhibition de l'activité photosynthétique dans ces conditions est d'origine stomatique (Kyparassis *et al.*, 1995). La réduction de la conductance stomatique limite la disponibilité du CO₂ pour les réactions de carboxylation (Brügnoli et Bjorkman, 1992). Par ailleurs, la fermeture stomatique minimise les pertes d'eau par transpiration (Iyengar et Reddy, 1996). D'autres études ont montré qu'il existait aussi une inhibition non stomatique de la photosynthèse, sous stress salin, qui est due à l'augmentation de la résistance à la diffusion du CO₂ du mésophylle vers son site de réduction dans les chloroplastes et à la diminution de l'efficacité de la Rubisco, première enzyme impliquée dans l'assimilation photosynthétique (Iyengar et Reddy, 1996).

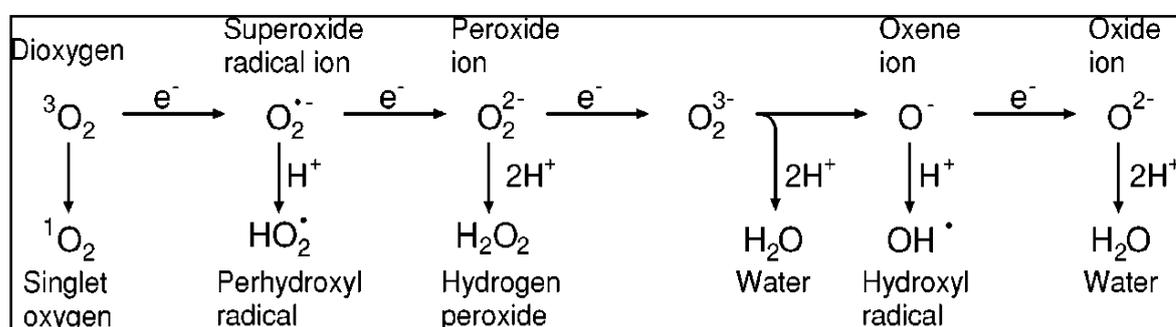
Les contenus en chlorophylles et en caroténoïdes des feuilles diminuent généralement en présence de sel (Agastian *et al.*, 2000). Cependant, Wang et Nil (2000) ont montré que le niveau d'accumulation de la chlorophylle augmentait en réponse à un traitement salin, chez l'amarante. Par contre, dans les feuilles de tomate, les niveaux de la chlorophylle totale (Chl a+Chl b), de la Chl a, et du β carotène diminuent sous l'effet d'un tel traitement (Khavarinejad et Mostofi, 1998). Chez *Bruguiera parviflora*, le traitement par le sel entraîne aussi une diminution significative des contenus en Chl a, Chl b, et en caroténoïdes dans les feuilles (Parida *et al.*, 2002).

2. Le stress oxydatif : réponse commune à toutes les contraintes : Outre ses effets directs sur les plantes, la salinité, comme toutes les autres contraintes environnementales, peut accroître la formation d'espèces oxygénées réactives (EOR), dont l'accumulation peut occasionner des dommages oxydatifs qui sont à l'origine de leur sensibilité à cette contrainte. Ces EOR sont capables de diffuser loin de leur site de formation et d'occasionner des dégâts moléculaires dont le plus

important est la peroxydation lipidique. Ils peuvent altérer les structures et les fonctions membranaires en entraînant une perturbation de la compartimentation cellulaire associée à une modification des flux ioniques. Donc, la capacité des plantes à tolérer cette contrainte serait aussi tributaire de leur aptitude à maintenir un équilibre entre la genèse de ces EOR et les systèmes de défense antioxydants qui les éliminent.

Les EOR ont été considérées comme des sous produits toxiques du métabolisme aérobique qui sont éliminés par des antioxydants. Toutefois, il est devenu évident ces dernières années que les plantes produisent activement ces espèces en tant que molécules de signalisation pour contrôler divers processus, comme la mort cellulaire programmée (apoptose), les réponses aux contraintes abiotiques, la défense contre les pathogènes et la signalisation cellulaire.

Les espèces oxygénées réactives sont partiellement des formes réduites de l'oxygène atmosphérique. En effet, les plantes utilisent l'oxygène, via le métabolisme aérobie, pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et à leur développement. Cependant, la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire s'accompagne d'une production de radicaux oxygénés. Ceux-ci résultent souvent d'une excitation énergétique de l'oxygène atmosphérique formant l'oxygène singulet ou d'un transfert d'un, de deux ou de trois électrons sur l'oxygène atmosphérique pour former respectivement le radical superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^\cdot).



Le radical superoxyde O_2^- a une durée de vie de l'ordre de quelques secondes, ce qui lui permet de diffuser au delà de son site de production afin d'atteindre ses cibles. Il peut être supprimé par une des superoxydes dismutases (Mn-SOD, Fe-SOD et Cu/Zn-SOD), métalloenzymes qui catalysent la dismutation du radical O_2^-

en H₂O₂. Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé a tous ses électrons appariés, ce qui fait de lui un intermédiaire réduit toxique possédant une durée de vie relativement longue, de quelques minutes. Il possède aussi la capacité de diffuser loin de son site de formation. Parallèlement, les chaînes de transfert des électrons au niveau de l'appareil photosynthétique sont capables de produire de grandes quantités de ces formes réactives de l'oxygène. Contrairement à l'oxygène atmosphérique, ces ERO sont capables d'oxyder les différents composants cellulaires et peuvent conduire ensuite à la destruction des cellules (Dat *et al.*, 2000).

Origine et conséquences du stress oxydatif. Le stress oxydatif est un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants, en faveur des premiers, conduisant potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels. En effet, ces formes très réactives, produites en grandes quantités en réponse aux contraintes environnementales, sont capables d'endommager les structures cellulaires (Zhu, 2001). Il en existe de nombreuses sources potentielles de production dans les plantes, dont certaines réactions impliquant le métabolisme, telles que la photosynthèse et la respiration. De ce fait, elles sont considérées comme de sous-produits du métabolisme aérobie. D'autres sources sont induites par les stress abiotiques, telle que la glycolate oxydase dans les peroxysomes durant la photorespiration. Toutefois, ces dernières années, de nouvelles sources ont été identifiées chez les plantes, y compris les NADPH oxydases, les amines oxydases et les peroxydases (Dat *et al.*, 2000). Elles sont étroitement régulées et participent à la production des EOR au cours de nombreux processus tels que la mort cellulaire programmée et la défense contre les pathogènes (Grant *et al.*, 2000).

Les marqueurs du stress oxydatif. Le diagnostic du stress oxydatif fait appel à plusieurs méthodes d'analyse; car une seule méthode ne peut pas à elle seule évaluer l'état de stress. Parmi les principales méthodes, nous citons :

📌 **La technique de la résonance paramagnétique nucléaire :** elle constitue un moyen direct pour déceler la présence ou l'absence d'un stress oxydant. Dans les

conditions normales de croissance, la production des EOR dans les cellules est faible ($240 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ d' O_2 et de $0,5 \mu\text{mol}$ de H_2O_2 dans les chloroplastes). Toutefois, dans les conditions contraignantes qui perturbent l'homéostasie cellulaire, cette production est stimulée (de 240 à $720 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ d' O_2 et de 5 à $15 \mu\text{mol}$ de H_2O_2) (Polle, 1997). Ces conditions incluent la sécheresse et la dessiccation, le choc thermique, les métaux lourds, les rayonnements ultraviolets, la pollution atmosphérique par l'ozone et le SO_2 , les stress mécaniques, les attaques par les pathogènes et les ravageurs et le stress lumineux (Dsikan *et al.*, 2001)

📌 *L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide* : cette technique permet de suivre les modifications des profils isoenzymatiques des antioxydants enzymatiques, tels que les superoxydes dismutases, la catalase, les peroxydases... Les variations ainsi enregistrées constituent un véritable marqueur du stress oxydatif (Lepeduš *et al.*, 2004). Des études plus poussées, portant sur l'expression des gènes codant pour ces enzymes, permettent non seulement de se rendre compte de l'état de stress (Attia *et al.*, 2008) mais aussi d'obtenir des plantes transgéniques résistantes à ce type de stress (Azevedo *et al.*, 1998).

📌 *Les teneurs en antioxydants de faible poids moléculaire* (les caroténoïdes, la vitamine C ou acide ascorbique, la vitamine E ou famille des tocophérols, les protéines thiols, le glutathion...) montrent de véritables changements lors d'un stress oxydatif, ce qui permet de suggérer leur implication dans la lutte contre ce type d'agression (Artetxe *et al.*, 2002).

La plupart des caroténoïdes interagissent avec l'oxygène singulet et peuvent ainsi empêcher l'oxydation de plusieurs substrats biologiques dont les acides gras polyinsaturés des systèmes membranaires. La vitamine C, ou ascorbate, est un excellent piègeur des EOR qui peut protéger divers substrats biologiques (protéines, acides gras, ADN) de l'oxydation (Noctor et Foyer, 1998). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, l'ascorbate passe par une forme radicalaire intermédiaire stable, le radical ascorbyl, qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E. Les protéines ayant des groupements thiols (-SH) sont capables de réagir très facilement avec les EOR (Chew et Whelan, 2003). Ces dernières jouent un rôle fondamental de perception des ROS et de contrôle des

gènes. C'est notamment par ce mécanisme majeur que les stress contrôlent des gènes.

■ *Les produits de peroxydation lipidique*: les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires sont la cible principale des EOR. Ces dernières, en réagissant avec les chaînes hydrophobes des acides gras insaturés, entraînent la formation de peroxydes lipidiques. Ces derniers se décomposent, toutefois, en sous produits comme le malondialdéhyde (MDA), le 4-hydroxynonénal, l'éthane ou le pentane. Ce phénomène est connu sous le nom de peroxydation lipidique (Alia *et al.*, 1995).

3. Le «Priming» : Une stratégie d'amélioration de la réponse au sel

Définition du priming. Le priming, ou l'amorçage en botanique et en agriculture, est une forme de préparation de la plantation des semences dans laquelle les graines sont préalablement soumises à un pré-traitement. En général, la plupart des graines utilisées en expérimentation ont montré un avantage global sur les semences qui ne sont pas pré-traitées. (Sedghiet *et al.*, 2010).

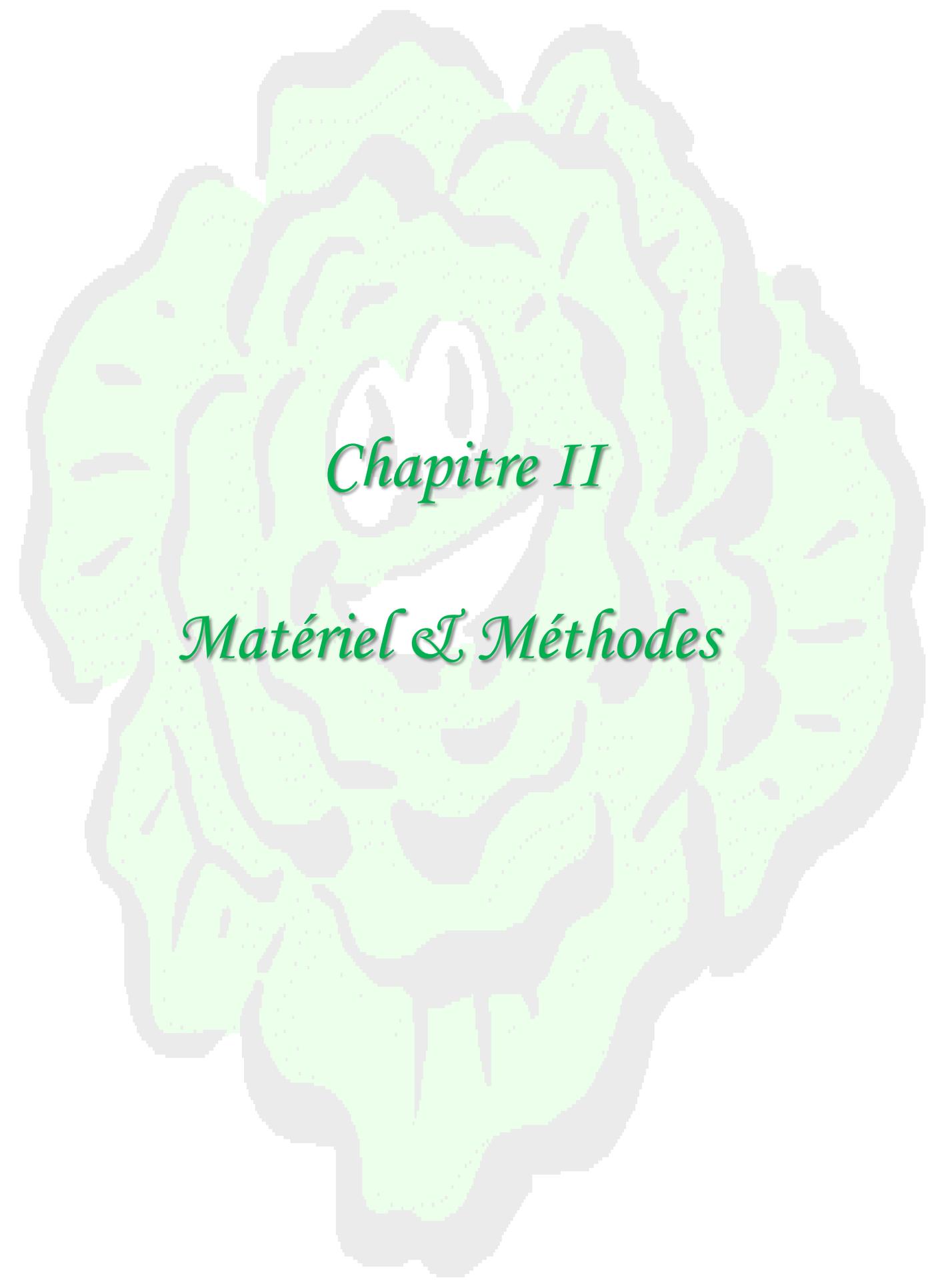
En général, l'amorçage des graines induit une germination plus rapide et plus uniforme lorsque les semences pré-traitées sont ensuite plantées (McDonald, 2000). C'est une technique qui a été utilisée pour traiter les semences et induire une augmentation du taux et de l'uniformité de leur germination pour stimuler la levée des plantules, principalement sous des conditions environnementales défavorables (Rozbeh *et al.*, 2011). Elle est même appliquée commercialement dans de nombreuses cultures pour améliorer leur taux et vitesse de germination, et en particulier dans la laitue (*Lactuca sativa* L.) pour lutter contre la thermoinhibition, et ce en augmentant la température maximale à laquelle la germination peut se produire (Gonai *et al.*, 2004).

Applications. La technique du priming a été souvent utilisée pour améliorer la germination des graines et la tolérance au stress des plantes en utilisant de l'eau, des sels, des hormones, des vitamines et des EOR comme le H₂O₂ (Aboutalebian *et al.*, 2012 ; Abdollahi *et al.*, 2012 ; Mahmoudi *et al.*, 2012 ; Ghoohestani *et al.*, 2012).

Rozbeh *et al.* (2011) ont étudié l'effet du pré traitement des graines de deux cultivars de melon avec 100 mM NaCl, pendant 36 heures à 20°C, sur leur capacité à croître sur milieu nutritif en présence de différentes concentrations de NaCl (0, 50, 100 et 150 mM). Les résultats ont révélé que chez le lot prétraité, il y avait une production plus importante de la matière sèche, un renforcement de l'activité antioxydante, un enrichissement en glucides solubles et en proline et des niveaux du malondihydroxydéhyde plus faibles reflétant donc une peroxydation lipidique moins importante, surtout en présence de 150 mM NaCl. Le prétraitement des graines de laitue avec une solution de nitrate de potassium (KNO₃) a entraîné une amélioration du pourcentage de leur germination, de l'élongation de la racine et de la longueur des pousses en condition de salinité (Nasri *et al.*, 2011). Comparant les effets du pré-traitement des graines avec NaCl 1% et KNO₃ 3% sur le pouvoir germinatif et la croissance précoce de *Brassica napus* en présence de NaCl et CaCl₂ (0, 50, 100, 150 et 200 mM). Abdollahi *et al.* (2012) ont noté une amélioration nette des performances de la germination sous condition de salinité, chez les graines prétraitées par le sel, notamment par KNO₃ à 3 %.

L'effet d'un pré-traitement des graines avec des concentrations croissantes d'acide gibbérellique (GA3) (0, 3, 4.5 et 6 mM) a été étudié sur la germination et la croissance végétative de la laitue en conditions de salinité, ainsi que sur les systèmes antioxydants (Mahmoudi *et al.*, 2012). Les résultats ont révélé une meilleure performance de la germination et de la croissance des plantules (estimée par la longueur et le poids sec des racines et de l'hypocotyle) chez les germinations issues de semences prétraitées. En outre, le pré-traitement avec 4.5 mM de GA3 a induit les baisses les plus importantes de la perte d'électrolyte et du taux de malondialdéhyde (MDA), ce qui a amené les auteurs de ce travail à conclure que le pré-traitement hormonal des graines de laitue permettait d'obtenir une amélioration de leur capacité à croître en présence de sel, et ce en renforçant les activités des enzymes antioxydantes et en réduisant les dommages fonctionnels et structuraux au niveau des systèmes membranaires. De son côté, Azooz (2009) a étudié l'effet du priming des graines de deux génotypes de féverole (*Vicia faba* L.) 115 et 125 avec 0,2 mM d'acide salicylique sur la capacité de croître dans des

conditions salines (0 et 140 mM NaCl). Les résultats ont montré que les deux génotypes pouvaient développer différents mécanismes d'adaptation au sel. L'effet bénéfique de l'acide salicylique pourrait être utilisé pour améliorer leur tolérance au sel. De plus, le prétraitement des graines de tomate avec des concentrations différentes d'acide salicylique (0, 50, 100 and 150 mg/l), d'acide ascorbique (0, 50, 100 and 150 mg/l) ou de peroxyde d'hydrogène (0, 40, 80 and 120 pm) a conduit à une réduction des effets dépressifs du sel et à un meilleur comportement des graines prétraitées avec l'acide ascorbique à la concentration de 150 mg/l (Ghoohestani *et al.*, 2012). L'étude des effets de différents types de priming (témoin, GA3, mannitol, NaCl et eau distillée) sur la germination des graines de deux plantes médicinales *Calendula officinalis* et *Foeniculum vulgare* mises à germer en présence de 5 niveaux de salinité (0 , 2,5 , 5 , 7,5 et 10 ds.m⁻¹), a permis à Sedghiet *et al* (2010) de confirmer que ces divers «priming» autorisent une amélioration nette de la performance de la germination des graines sous condition saline.



Chapitre II

Matériel & Méthodes

CHAPITRE 2

MATERIEL & METHODES

I. Matériel végétal : la laitue (*Lactuca sativa* L.)

1. Classification

Lactuca sativa L. est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des composées (Astéracées). Elle comporte le 1/10^{ème} de toutes les espèces des angiospermes connus. La laitue est originaire de la région méditerranéenne et sa culture a commencé en Egypte 4500 avant JC, ceci étant grâce à l'huile comestible extraite de ses semences. La laitue était populaire auprès des anciens Grecs et Romains et elle est arrivée aux Etats-Unis pendant l'époque coloniale. Aujourd'hui, la laitue est une des espèces cultivées les plus importantes aux Etats-Unis (Davis *et al.*, 1997).

Les laitues sont divisées en 4 grandes catégories :

- La laitue pommée : elle forme des pommes rondes ou peu aplaties au centre de la plante, dont les feuilles sont assez arrondies, lisses, voir un peu cloquées pour certaines variétés.



Photo 2.1. Photo d'une laitue pommée

- La laitue batavia : les feuilles sont cloquées avec de nombreuses nervures. Elles sont très croquantes en restant, cependant, tendres.



Photo 2.2. Photo d'une laitue batavia

- La laitue romaine : les feuilles sont épaisses et la pomme est allongée et volumineuse. C'est une laitue méridionale (se localisant généralement au sud).



Photo 2.3. Photo d'une laitue romaine

- La laitue à couper : elle ne forme pas de pommes, les feuilles sont tendres et on peut les récolter plusieurs fois si cette récolte épargne ou bien évidemment le collet.



Photo 2.4. Photo de quelques laitues à couper

2. Culture

La laitue est une plante annuelle de culture facile. La façon la plus simple de la cultiver est d'acheter régulièrement des plants en mottes et de les planter sur des lignes espacées de 25 cm tous les 20 cm. Elle craint le manque d'eau, et de ce fait, elle nécessite un arrosage régulier, si possible tôt le matin ou tard le soir, en période chaude. Suivant les variétés, on récolte les laitues 4 à 8 semaines après les plantations. Ce qu'on redoute dans leur culture, c'est la levée des graines. La laitue se met alors à s'allonger en hauteur, ses feuilles dépérissent et deviennent très coriaces. Des petites fleurs finissent par se former sur la plante lorsqu'elle atteint les 30 cm de hauteur. Cette montée est principalement conditionnée par la température. Les coups de froid du printemps sont souvent responsables d'une montée précoce.

La laitue aime le soleil, les sols humifères et frais. Peu gourmande en engrais organique, elle trouve sa place facilement dans la rotation ou en association avec d'autres cultures. Au début du printemps, un engrais organique ou un compost mur seront suffisants pour une croissance normale dans le respect des doses d'emploi. En estivale ou automnale, la minéralisation naturelle de l'humus présent dans le sol suffit amplement à couvrir ses besoins. Elle préfère les sols meubles, propres et aérés. Le semis direct (en pleine terre) a pour avantage l'obtention de plantes plus résistantes aux maladies et à la montée en graine.

3. Modèle d'étude

La variété de laitue choisie pour faire l'objet de notre étude est la laitue romaine var *Claudius* dont les semences sont biologiques et fournies par la société Rijk Zwaan.

II. Conduite des expériences

1. Conditions des cultures

Les conditions de culture appliquées lors de la réalisation de ce travail de thèse sont diverses.

1.1. Culture sous serre : Travail réalisé en collaboration avec le GRAB (Groupe de Recherche en Agriculture Biologique). La culture est prise en charge par l'équipe du GRAB (Groupe de Recherche en Agriculture Biologique). Elle était conduite sous abris dans un tunnel de 400 m² de surface. Les plants sont biologiques (mottes 3.75 type salade).

La laitue romaine variété *Claudius* choisie comme modèle végétal est cultivée sur paillage micro et macro perforé avec une densité 14 plants/m², dans un tunnel orienté Nord-Sud.

Pour la fertilisation, l'apport en azote est fait avec du tourteau de ricin (5% azote) qui est un engrais azoté naturel (résidu solide obtenu après le traitement des graines pour obtenir de l'huile de Ricin), 100 % d'origine végétale, riche en oligo-éléments et en matière organique.



Photo 2.5. Plantes de laitues romaines cultivées sur paillage perforé par le GRAB, (Groupe de Recherche en Agriculture Biologique) tunnel orienté nord-sud.

1.2. Culture sous serre en collaboration avec l'INRA Avignon. La culture des plantes est réalisée hors sol, dans des pots de 2L avec vermiculite, avec 3 régimes de fertilisation azotée : Un premier lot de plantes cultivé en présence de 2 mmol d'azote (régime à concentration réduite), un second lot cultivé en présence de 10 mmol (régime à concentration classique) et un troisième lot cultivé en présence de 20 mmol (régime riche).



Photo 2.6. Plantes de laitues romaine cultivées avec différents régimes de fertilisation azotée (2, 10 et 20 mmol d'azote). La culture est réalisée à l'INRA dans une serre en verre, sur vermiculite.

La composition des différents milieux de culture est résumée dans le tableau suivant. (Tab 2.1). L'apport en oligo-éléments est résumé dans le tableau 2.2.

Tableau 2.1. Composition en macro-éléments du milieu de culture (Lecompte et al, 2009)

Ions, meq	Concentration en azote, mM		
	2	10	20
NO ₃ ⁻	2	10	20
K ⁺	11	11	11
Ca ²⁺	3,25	3,25	3,25
Mg ²⁺	3,5	3,5	3,5
SO ₄ ²⁻	6,5	2,5	2,5
H ₂ PO ₄ ⁻	1	1	1

Tableau 2.2. Composition en oligo-éléments du milieu de culture (Lecompte et al, 2009)

Sels	$\mu\text{mol.l}^{-1}$
H_3BO_3	20,6
$\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$	10,7
$\text{MnSO}_4,4\text{H}_2\text{O}$	11,6
$\text{ZnSO}_4,6\text{H}_2\text{O}$	3,2
$(\text{NH}_4)\text{MO}_7\text{O}_{24}$	0,2

1.3. Culture hydroponique dans des conditions contrôlées du laboratoire. Trois lots de graines de laitue romaine sont utilisées dans cette culture : deux lots de graines ayant été exposés, l'un à une dose d'UV-C de 0.85 kJ.m^{-2} et l'autre à 3.4 kJ.m^{-2} et un lot témoin n'ayant pas subi ce traitement. Les trois lots de graines sont mis à germer dans des boîtes de pétri avec du papier filtre imbibé d'eau distillée.

Après 7 jours d'incubation, les boîtes sont transférées dans une chambre de culture avec une photopériode de 16 h le jour / 8 h la nuit et un rayonnement efficace de $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La température et l'humidité relative moyennes sont respectivement de 22°C et 60% le jour et de 18°C et 80% la nuit. Le repiquage, qui consiste à transférer des plantules dans des pots de 330 ml à raison d'une plante par pot, a eu lieu deux jours après.

Les pots de 330 ml contiennent une solution nutritive utilisée pour la culture de la laitue romaine qui est préparée d'après la formule d'Arnon et Hoagland (1940) (Tab. 2.3). Les macroéléments sont individuellement préparés et apportés dans le milieu nutritionnel à des concentrations diluées quatre fois. Les oligoéléments, excepté le fer, sont groupés dans une seule solution mère proposée aussi par Arnon et Hoagland (1940) (Tab. 2.4).

Tableau 2.3. Composition en macro-éléments du milieu de culture (Arnon et Hoagland, 1940)

Sels	PM (g.mol ⁻¹)	Solution nutritive (mM)
Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	236,15	1,25
MgSO ₄ , 7H ₂ O	246,48	0,5
KNO ₃	101,11	1,25
KH ₂ PO ₄	136,1	0,25

Tableau 2.4. Composition en oligo-éléments du milieu de culture (Arnon et Hoagland, 1940).

Sels	M (g.mol ⁻¹)	Solution nutritive (mM)
MnSO ₄ , 4H ₂ O	223	10 ⁻³
CuSO ₄ , 5H ₂ O	249,6	5 10 ⁻⁴
ZnSO ₄ , 6H ₂ O	269,5	5 10 ⁻⁴
(NH ₄) ₂ MO ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	1235,86	5 10 ⁻⁵
H ₃ BO ₃	61,83	10 ⁻²

Pour le fer, une solution mère est utilisée et elle est préparée comme suit: Une quantité de 26,1 g d'EDTA (triplex II) sous forme sodique (C₁₀H₁₆N₂O₈) est dissoute dans 268 ml de KOH (1N) et 24,9 g de Fe SO₄, 7H₂O. Le mélange est ensuite complété avec de l'eau distillée jusqu'à 950 ml (toujours < 1 litre). Après une agitation pendant 24h afin de stabiliser le complexe Fe-EDTA, son pH est amené à la valeur de 5,5 avec de l'hydroxyde de potassium(KOH) 1N. Le volume est finalement ajusté à 1 litre avec de l'eau distillée. La solution de fer ainsi préparée est maintenue à l'obscurité.

III. Expériences réalisées :

La première expérience est destinée au choix d'une dose d'UV-C non délétère pour l'aspect de la laitue. Nous avons utilisé dans cette expérience des plantes de laitues romaines cultivées dans une serre en plastique jusqu'à l'âge de 65 jours. A la récolte, elles ont été réparties en quatre lots: un lot servant de témoin (ne

recevant pas d'UV-C), un deuxième lot où les laitues sont exposées à une dose de 1 min (ce qui correspond à une dose de 0.85 kJ/m²); un troisième lot où les plantes sont exposées à une dose double et un quatrième lot où les plantes sont soumises aux effets cumulés de plusieurs doses, à raison d'une exposition de 4 min, et ce durant 7 jours. Une fois irradiées aux UV-C, elles sont placées dans des bacs blancs couverts de films transparents et stockés dans une armoire réfrigérée à l'obscurité et à 6°C. La fluorescence chlorophyllienne est mesurée chaque jour chez les quatre modalités de laitue et des feuilles de chaque modalité sont prélevées afin de doser la chlorophylle totale.

La seconde expérience a pour objectif d'étudier l'effet des UV-C sur la résistance de laitue Romaine à BC87 et SM. Des laitues romaines récoltées à l'âge de 58 jours sont été réparties en deux lots : un lot témoin ne recevant pas de radiations UV-C et un lot exposé à la dose de 1 min. 24 heures après, les feuilles externes des deux modalités sont détachées et inoculées avec du mycélium du *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*. L'inoculation est faite par dépôt du mycélium au centre de la feuille sur la nervure principale. Les feuilles inoculées sont conservées dans une chambre de culture pendant 4 jours à une température de 21°C et 14 heures d'éclairage par jour.

La surface de lésion, causée par les champignons, est mesurée à l'aide du logiciel d'imagerie J. Des feuilles des deux modalités sont prélevées pour doser les indicateurs du stress oxydatif (MDA et H₂O₂), les polyphénols par HPLC et les pigments chlorophylliens.

La troisième expérience est destinée à l'étude des effets combinés des UV-C et de la fertilisation azotée sur la résistance de la laitue Romaine à BC87 et SM. La culture des plantes est réalisée avec 3 régimes de fertilisation azotée : un premier régime à concentration réduite de 2 mmol d'azote, un second à concentration classique de 10 mmol et un troisième régime riche à concentration de 20 mmol. A la récolte, faite à l'âge de 52 jours, 3 feuilles par plante provenant de 3 plantes par modalité sont inoculées avec du mycélium de *Botrytis cinerea* et celui de *Sclerotinia minor*. L'inoculation est faite par dépôt du mycélium au centre de la feuille sur la

nervure principale (Photo 2.7). Le développement de la surface de lésion est suivi pendant 4 jours. Cette première partie de l'expérience a pour but de choisir la dose d'azote permettant une meilleure résistance de la laitue romaine aux deux champignons testés. Une fois choisie, les laitues romaines se développant en présence de cette dose (2mM d'azote) ont été réparties en 2 lots : un lot témoin n'ayant pas été exposé aux UV-C et un lot traité, où les plantes sont exposées aux UV-C pendant une minute. 24 heures après l'exposition aux UV-C, 3 feuilles par plante provenant de 3 plantes par modalité sont inoculées avec du mycélium de *Botrytis cinerea* et celui de *Sclerotinia minor*. Les feuilles inoculées sont conservées dans une chambre de culture pendant 4 jours à une température de 21°C et 14 heures d'éclairage par jour.

La surface de lésion, causée par les champignons, a été mesurée à l'aide du logiciel d'imagerie J. Des prélèvements de feuilles sont faits afin d'évaluer les indicateurs du stress oxydatif, les teneurs en pigments chlorophylliens et les teneurs en composés phénoliques.



Photo 2.7. Mise en place du mycélium sur la nervure centrale de la feuille de romaine détachée

Une quatrième expérience conduite sous serre a pour but d'étudier l'effet des rayonnements UV-C sur le potentiel de conservation après récolte de la laitue Romaine. Les laitues romaines ont été récoltées à l'âge de 65 jours et réparties en deux lots : un lot servant de témoin qui n'a pas reçu de radiations UV-C et un lot

exposé à la dose de 1 min (choix de la première expérience). Les plantes de ces deux lots sont ensuite transformées en produit de 4^{ème} gamme en passant par les différentes étapes de ce processus (Le parage, le rinçage, l'essorage et le conditionnement) et stockées dans des bocaux de 1.5 L et placées pendant 14 jours dans une armoire réfrigérée à 4°C et à l'obscurité.

Des prélèvements de feuilles sont effectués en J0 (avant conditionnement), J2 (48 heures après conditionnement), J3 (72 heures après conditionnement), J7 (168 heures après conditionnement) et en J14 (336 heures après conditionnement) pour divers analyses et dosages biochimiques.

L'aspect visuel des feuilles prélevées et la fluorescence chlorophyllienne déterminée à l'aide de l'Handy PEA sont évalués chez les deux modalités. Les indicateurs du stress oxydatif, le malondialdéhyde et le peroxyde d'hydrogène, les teneurs en chlorophylle totale sont aussi déterminés. La qualité nutritionnelle des laitues transformées en produits de 4^{ème} gamme est bien évaluée en estimant les teneurs en vitamine C et en polyphénols totaux. L'intensité respiratoire est aussi déterminée en J0, J7 et J14.

Une cinquième expérience conduite dans des conditions contrôlées afin d'étudier l'effet du priming des graines de la laitue romaine par des UV-C sur sa capacité de croissance en condition de salinité. Les graines de laitue romaine sont réparties en trois lots, lot témoin n'ayant pas reçu de radiations UV-C, un lot exposé à la dose de 1 min et un troisième exposé pendant 4 min aux UV-C. A l'âge de 28 jours, les plantes, issues de chaque lot de graines, sont réparties en 2 lots. Le premier lot, servant de témoin, est irrigué avec la solution nutritive diluée 4 fois (solution T/4). Le second est irrigué avec la même solution, mais additionnée de NaCl 100 mM. Au terme de 15 jours de culture, les plantes sont récoltées et séparées en feuilles et racines. Plusieurs paramètres (croissance racinaire, nombre de feuilles masses de matière fraîche et sèche, surface foliaire, teneur en eau et teneurs en Na⁺, K⁺ des différents organes) sont déterminés avant et après la récolte finale des plantes. Les racines sont auparavant rincées dans trois bains successifs à l'eau distillée froide, puis épongées entre deux papiers filtres. Les produits des

récoltes sont rapidement mis dans des sachets de papier aluminium préalablement tarés. Les sachets sont ensuite pesés avant et après dessiccation pendant 48 h dans une étuve à 70 °C, à l'aide d'une balance de précision au 1/10^{ème} de mg. Les masses de matière fraîche et sèche des différents organes ainsi que leurs teneurs en eau et en éléments minéraux (Na⁺ et K⁺) sont enfin déterminées.

La morphogenèse est suivie par des comptages du nombre des feuilles et de la croissance racinaire à l'aide d'une règle graduée. La surface foliaire a été mesurée à l'aide du logiciel *Optimas*. Six plantes de chaque traitement sont récoltées et utilisées pour le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes, et pour la mesure de l'activité antioxydante totale et du pouvoir anti radicalaire.

IV. Techniques analytiques

1. Exposition aux radiations UV-C

La dose d'UV-C dépend de la fréquence d'irradiation de la lampe UV-C, de la distance qui sépare cette source de lumière des plantes et du temps d'exposition des plantes aux radiations. La lampe utilisée émet des rayonnements UV quasi monochromatiques à 254 nm. Le débit de dose moyenne est de 1,43 mw.cm⁻². Toutes les laitues romaines sauf celles qui ont servi de témoin sont irradiées avec deux lampes ayant une puissance de sortie normale de 60 W. Les doses ainsi appliquées s'obtiennent simplement en multipliant la puissance par le temps d'exposition.

2. Evaluation de l'état visuel des feuilles

Pour toutes les expérimentations, une évaluation de l'état visuel des feuilles est réalisée. Des photographies sont faites pour comparer les différentes conditions et durées de stockage étudiées. L'attribution des notes obéit à une échelle allant de 0 à 3 : 0 désigne un état parfait des feuilles, 1 désigne un état légèrement flétri des feuilles, 2 désigne un état plus ou moins dégradé et 3 désigne un état dégradé.

3. Préparation des souches fongiques

La paille sur laquelle le travail est réalisé est désinfectée avec de l'alcool et le matériel utilisé (écouvillons, portoir et tubes Eppendorf) est exposé aux UV

pendant 15 min sur la paillasse. On a procédé ensuite à la préparation des tubes Eppendorf . 600 µl d'eau stérile sont ajoutées dans la culture en boîte de 55 mm et 1ml (1,5 ml si la souche est très sporulante) dans la culture en boîte de 90 mm. L'écouvillon est humidifié avec l'eau de la boîte et la surface de la gélose est raclée superficiellement sans l'érafler. On a procédé doucement pour éviter la dispersion des spores dans l'air.

Le mycélium est ensuite rassemblé avec l'écouvillon, où il est essoré contre la paroi de la boîte de Pétri puis transféré dans le tube Eppendorf de 2 ml. La souche est mise en collection sous forme d'une suspension de spores dans le tampon phosphate-glycérol. L'écouvillon est introduit dans le tube de 1,5 ml et la suspension de spores est homogénéisée par un mouvement de va et vient et de rotation avec l'écouvillon. L'écouvillon est ensuite retiré et les tubes Eppendorf sont conservés à -20 °C.

Le matériel fongique est prélevé après 10-14 jours d'incubation. La pureté des souches est vérifiée après 7 jours par une observation macroscopique à la loupe binoculaire. S'il s'est avéré qu'elles ne sont pas purifiées, un isolement monospore à partir de l'isolat est refait.

4. Calcul de la surface de lésion

L'estimation des surfaces des lésions causées par les deux champignons est réalisée sur des photos prises tout au long des jours de la manipulation, donc de J0 à J4. Les photos sont prises à l'aide d'un appareil photo numérique. Les mesures des surfaces des lésions sont réalisées à l'aide d'un logiciel de traitement et d'analyse d'images, image J (J indique que le programme est écrit en Java, ce qui en fait un logiciel utilisable sur différents systèmes d'exploitation).

5. Quantification des pigments (chlorophylles et caroténoïdes)

Une quantité d'environ 100 mg de matière fraîche de l'échantillon est prélevée et déposée dans des tubes pré pesés. L'ensemble est repesé et la masse exacte de l'échantillon est notée. L'extraction est faite avec de l'acétone en raison d'un ml d'acétone pure dans chaque tube. Les échantillons sont incubés pendant 15

minutes dans de la glace, en agitant de temps en temps, jusqu'à décoloration complète de la poudre. Ils sont mis après à centrifuger pendant 5 minutes à 15000g. Les surnageants sont ensuite récupérés dans des tubes neufs de 2 ml. La densité optique des extraits est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de paillasse à 662, 645 et 470 nm pour calculer les teneurs en chlorophylle a; b et en caroténoïdes selon les équations suivantes :

$$\text{Chlorophylle a} = (11,24 \times A_{662}) - (2,04 \times A_{645})$$

$$\text{Chlorophylle b} = (20,13 \times A_{645}) - (4,19 \times A_{662})$$

$$C_{X+C} = (1000 \times A_{470} - 1,9 \times \text{Chl}_a - 63,14 \times \text{Chl}_b) / 214$$

Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche.

6. Mesure des paramètres de fluorescence chlorophyllienne par l'Handy PEA

L'activité photosynthétique est mesurée à l'aide d'un fluorimètre «Handy-PEA» (Hansatech) (Photo 2.4). L'utilisation de la fluorescence chlorophyllienne permet d'évaluer de façon simple et rapide l'activité photosynthétique (PSII) des plantes, ce qui constitue un grand avantage, car cette activité est intimement liée à la physiologie de l'organisme végétal.



Photo 2.8. Handy PEA, fluorimètre de la chlorophylle, se compose d'une unité de contrôle de poids léger compact en capsulation électronique sophistiquée fournissant la haute résolution temporelle essentielle dans la réalisation de mesures de la cinétique d'induction de fluorescence de la chlorophylle

L'Handy PEA permet d'évaluer l'état de stress des plantes en mesurant les deux indicateurs suivants : le rendement quantique maximal (F_v/F_m) et l'indice

de performance photosynthétique (PI) avec ses trois composantes (RC/Abs), $(1-V_j)/V_j$ et F_v/F_0). Le rendement quantique maximal (F_v/F_m) est le critère le plus communément utilisé pour caractériser l'état de stress. Il renseigne en fait sur le taux de réduction du pool des plastoquinones (PQ), et rend compte de l'état du photosystème II (PSII). Ce critère reste le moins sensible aux stress et ce par rapport aux autres paramètres de la fluorescence chlorophyllienne.

7. Mesure de l'intensité respiratoire

La respiration est l'activité physiologique majeure post récolte des fruits et des légumes. Elle est mesurée en J0, J7 et J14 à l'aide d'un PBI dansensor (CheckMate 9900) (Photo 2.9). L'intensité respiratoire est calculée selon la formule :

$$IR = (\text{pente}/100) * ((\text{volume} - \text{poids}) * 273) / ((273 + T^\circ) * 22.4 * (\text{poids}/1000))$$

Avec

IR : intensité respiratoire exprimée en mmol/h/kg.

Volume exprimé en ml

Poids exprimé en grammes (g)

T°: température exprimée en ° C



Photo 2.9. PBI dansensor (CheckMate 9900).

8. Extraction et dosage des composés phénoliques par HPLC

8.1. Extraction. Environ 50 mg de poudre lyophilisée sont homogénéisés dans 990 μ l de solvant d'extraction, méthanol (80%)/eau (20%), avec 0.1% HCl 1N et 10

μ de méthoxyflavone à 1.25mg/ml. Le mélange est mis en sonification ultrason dans de la glace pendant 5 mn, puis congelé dans de l'azote liquide. Avant de passer à une autre sonification de 5 mn, le mélange est agité au vortex. L'homogénat est centrifugé, une première fois, à 14000 rpm pendant 15 min à 4°C. Le surnagent est récupéré pour une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. Le surnagent final est filtré sur filtre seringue de 0.45 μ m de diamètre. Un volume de l'extrait de 125 μ l est déposé dans une Vial de 150 μ l puis stocké à -20°C si l'injection dans l'HPLC n'est pas immédiate.

8.2. Principe de l'HPLC. La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Le mélange obtenu est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. A la sortie de la colonne, les différents solutés sont caractérisés par un pic grâce à un détecteur approprié. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme. L'HPLC utilisé lors de ces manipulations est une C18 sunfire de Waters (Photo 2.10).



Photo 2.10. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilisée pour les analyses des poly phénols-Laboratoire de Physiologie Fruits et Légumes (EA 42 79)

9. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage quantitatif des composés phénoliques se fait en utilisant la méthode de Foline-Ciocalteu (Cicco et al, 2009). Elle implique l'oxydation de ce réactif en oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleue, l'intensité du couleur bleu renseigne la concentration des extraits en polyphénols. Après extraction (extraction réalisée de la même manière que les flavonoïdes), on prélève 125 µl de l'extrait mélangé avec 500 µl d'eau distillée et de 125 µl de réactif Folin-Ciocalteu. Après agitation, les échantillons sont incubés pour la première fois pendant trois minutes. Par la suite, on additionne 1250µl d'une solution de $(\text{Na})_2\text{CO}_3$ à 7%. Le mélange obtenu est ajusté par l'eau distillée à 3 ml. Une deuxième incubation est effectuée pendant 90 minutes à l'abri de la lumière.

La lecture de l'absorbance est mesurée à 760nm. La quantification des polyphénols a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par un extrait d'étalon « Acide Gallique » à des concentrations croissantes (de 25 mg.l⁻¹ à 500 mg.l⁻¹) (Dewanto et al., 2002). Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg AG .g⁻¹ MS).

10. Dosage des flavonoïdes

10.1. Principe. La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique de Zhishen et al. (1999) basée sur la formation d'un complexe entre les flavonoïdes et le chlorure d'aluminium. L'intensité de la couleur rose indique l'importance du contenu des plantes en flavonoïdes.

10.2. Manipulation. Les échantillons sont immergés dans le méthanol (80%) pendant 24 heures et par la suite, ils sont filtrés pour l'obtention d'un extrait brut de chaque échantillon. Un aliquote de 250 µl de chaque extrait est mélangé avec 75 µl d'une solution de NaNO_2 (5%), puis le mélange est incubé pendant 6 minutes, puis additionné de 150 µl de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$, 10%) fraîchement préparé. Ce mélange est incubé une autre fois pendant 5 minutes à la température ambiante, puis additionné de 500 µl de NaOH (1M). Le mélange est ajusté avec l'eau distillée à un volume final de 1525 µl. Une gamme étalon est

préparée avec des concentrations croissantes de catéchine (de 50 à 500 mg.l⁻¹), et les extraits sont mesurés avec un spectrophotomètre à 510nm (Dewanto et al, 2002). L'intensité de la couleur rose indique l'importance du contenu des plantes en flavonoïdes. Les teneurs en flavonoïdes sont exprimées en mg d'équivalents catéchine par gramme de matière sèche (mg EC. g⁻¹ MS).

11. Détermination des teneurs en ascorbate et en déhydroascorbate

Les concentrations de l'ascorbate réduit (AsA) et de déhydroascorbate (DHA) sont déterminées selon le protocole de Ramzi Murshed et *al* (2010). AsA et DHA sont extraits par homogénéisation de 0.2g de la matière fraîche des feuilles dans 1ml de TCA 6% (p :v). L'homogénat est centrifugé à 16000g à 4°C pendant 15 minutes. Les surnagants sont immédiatement utilisés pour la détermination, de l'ascorbate total (AsA +DHA) et AsA.

Pour la détermination de la teneur en ascorbate total, 10µl de l'extrait sont ajoutés à 10µl de Dithiothreitol (DTT) 10 mM et 20µl de tampon phosphate 0.2 mM (pH=7.4). Après incubation pendant 20 min à 42°C, 10µl de 0.5% (p :v) du N-Ethylmaleimide (NEM) sont rajoutés, avec une incubation de 2 min à température ambiante, suivi par l'ajout de 150µl d'un réactif préparé juste avant l'utilisation en mélangeant 50µl de TCA 10% (p :v), 40µl de l'acide orthophosphorique (H₃PO₄) 42% (v :v) ; 40µl de 2.2-bipyridil 4% dissous dans de l'éthanol 70% et de 20µl de FeCl 3%.

12. Détermination des indicateurs du stress oxydatif

La peroxydation lipidique est une des plus anciens effets connus des radicaux libres sur les systèmes membranaires et le plus facile à mesurer. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le malondialdéhyde (MDA), deux marqueurs de l'état oxydatif des cellules, sont dosés selon la méthode de Velikova et *al*. (2000) légèrement modifiée.

12.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA). Des échantillons de feuilles de 200 mg sont broyés en présence d'azote liquide dans un mortier en porcelaine. La

poudre obtenue est mise en suspension dans 1 ml d'acide trichloracétique (TCA, 0.1 %). Le broyat est centrifugé pendant 15 min à 15 000 g à 4 °C.

A un volume de 0.5 ml de surnageant est ajouté un volume de 1 ml d'acide thiobarbiturique (TBA, 0.5 %) préparé dans du TCA 20 %. Le tout est incubé pendant 30 min dans un bain-marie à 100 °C. Dans ces conditions, les composés aldéhydiques, essentiellement le malondialdéhyde, vont réagir avec le TBA pour former le complexe TBA-MDA. La réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans de la glace pilée, pendant 10 min. Le surnageant est récupéré pour le dosage par colorimétrie des lipoperoxydes. L'absorbance est lue à 532 et 600 nm contre un blanc contenant un mélange de TBA-TCA. Après soustraction de l'abondance non spécifique lue à 600 nm, la concentration du malondialdéhyde (exprimée en $\mu\text{mole g}^{-1}$ MF) est calculée à l'aide de son coefficient d'extinction ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) selon l'équation suivante :

$$[\text{MDA}] = \frac{A \times V_{(\text{cuve})} \times V_{(\text{surnageant})}}{\epsilon \times l \times V_{(\text{TBA} + \text{surnageant})} \times \text{MF}}$$

$V_{(\text{cuve})}$: volume de la cuve = 1 ml

$V_{(\text{surnageant})}$: volume de l'extrait du surnageant en ml

$V_{(\text{TBA}+\text{surnageant})}$: somme du volume de TBA et celui de l'extrait du surnageant en ml

MF: masse de la matière fraîche des feuilles de la rosette en g

12.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Des feuilles fraîches (200 mg) sont homogénéisées dans 1ml de 0.1% (p:v) acide trichloracétique (TCA) à 4°C. L'homogénat est centrifugé à 15000g pendant 15 minutes à 4°C. Trois aliquotes de 50 μl de chaque tube sont placés dans une microplaque de type Elisa à 96 puits et 50 μl de tampon phosphate (pH=7) et 100 μl de KI sont ajoutés dans chaque puits. Chaque plaque contient également des quantités croissantes de H_2O_2 pour générer une courbe d'étalonnage. La plaque est brièvement agitée, incubée à température ambiante pendant 30 min puis l'absorbance de chaque puit est déterminée à 390 nm dans un lecteur microplaque (Power Wave HT Microplate Spectrophotometer

from Bio Tek). Les teneurs en H₂O₂ des différents échantillons sont déterminées en utilisant la courbe d'étalonnage.

13. Mesure de l'activité anti radicalaire (contre le radical DPPH)

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode au 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). C'est un radical libre synthétique possédant à l'état oxydé, une coloration violette foncée. Lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle. En effet, la couche électronique de ce radical se sature au contact d'un antioxydant ce qui explique la disparition de sa coloration. Cette décoloration met en évidence le pouvoir piègeur du radical libre par l'extrait testé. Le DPPH est solubilisé dans du méthanol absolu pour en avoir une solution de 0,2 mM. Une prise d'essai de 1 ml des différents extraits à différentes concentrations (1, 10, 100 et 200 µg.ml⁻¹) est mise en présence de 250 µl de DPPH (solubilisé dans du méthanol pour une concentration de 0,2 mM). Les tubes sont ensuite placés à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. La mesure de l'absorbance est effectuée à 517 nm grâce à un spectrophotomètre UV visible contre un blanc (constitué de 250 µl de DPPH additionnée de 1 ml de méthanol) (Hanato et al. 1988). Pour obtenir la concentration efficace des extraits qui réduisent la concentration initiale de DPPH de 50%, les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition PI.

$$PI = (Abs_{\text{témoin}} - Abs_{\text{extrait}} / Abs_{\text{témoin}}) * 100$$

PI: Pourcentage d'inhibition

Abs: Absorbance à la longueur d'onde de 517nm du témoin sans extrait et de la solution d'extrait acétonique.

La réalisation de la cinétique de cette activité permet de déterminer la concentration qui correspond à 50% d'inhibition (CI₅₀), la valeur de la CI₅₀ la plus faible correspond à l'efficacité de l'extrait la plus élevée.

14. Mesure de l'activité anti-oxydante totale

Un aliquote de 0.1ml de l'extrait est mélangé avec 1 ml d'une solution à pH acide contenant de l'acide sulfurique (H_2SO_4 , 0.6 M), du phosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 28 mM) et de l'heptamolybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 4 mM). Le mélange est ensuite incubé dans un bain-marie à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm à l'aide d'un spectrophotomètre-UV visible. L'activité anti-oxydante totale est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG.g⁻¹ MS).

15. Extraction et dosage des éléments minéraux

Une fois séchés, les organes sont mis dans des piluliers, contenant du HNO_3 (0,5 %). L'extraction des ions dure au moins 48 h, à température. Les cations (K^+ et Na^+) sont dosés par spectrophotométrie de flamme en émission. Le dosage se fait après avoir étalonné les appareils avec des solutions de concentrations connues. En effet, les solutions étalons du potassium sont préparées à partir de KCl, et, celles du sodium à partir de NaCl. Ces deux sels sont préalablement séchés à l'étuve avant leur utilisation.

 **Teneurs et quantités ioniques.** Les teneurs ioniques des différents organes sont déterminées à la récolte et exprimées en $\mu\text{moles.g}^{-1}$ MS. La quantité de chacun des ions (exprimée en $\mu\text{moles.organe}^{-1}$), mesurée dans les racines, permet d'estimer l'accumulation racinaire, et celle trouvée dans les parties aériennes permet d'estimer la quantité transportée à ces organes.

Tableau 2.5. Appareils et gammes d'étalonnage utilisés dans le dosage des cations.

Ions	Appareil	Gamme d'étalonnage, mg.l ⁻¹
Na^+	Spectrophotomètre de flamme en émission (Jenway)	Solution de NaCl: 2, 4, 6, 8, 10 mg/l
K^+	Spectrophotomètre de flamme en émission (Jenway)	Solution de KCl: 2, 4, 6, 8, 10 mg/l

16. Dosage des nitrites et des nitrates

24 heures après l'exposition aux UV-C, un prélèvement des feuilles des 6 modalités résultantes des deux essais appliqués est effectué afin de doser l'azote total et le nitrate. L'échantillonnage et le broyage sont réalisés au sein de notre laboratoire de Physiologie des Fruits et Légumes et le dosage est réalisé au sein du PSH 'Plantes et Systèmes de culture Horticoles' unité de l'INRA d'Avignon.

16.1. Principe du dosage. L'échantillon contenant nitrites et nitrates est introduit dans un flux de chlorure d'ammonium. Il traverse une colonne au cadmium qui réduit les nitrates en nitrites et entre ensuite en réaction avec une solution d'acide sulfonique pour former un composé azoté. Cette réaction de diazotation donne un composé diazoïque (soit un corps qui comprend un groupement $N=N$ bivalent lié d'une part à un carbone et d'autre part à un ion minéral électronégatif).

Lors de la réaction avec le NED (N-naphtyl éthylène dihydrochlorure) (dit réaction de copulation), il y a condensation entre le composé diazoïque formé et l'amine secondaire pour donner un dérivé diazo-aminé de couleur violacée et qui absorbe à 540 nm.

Cette technique permet de déterminer la teneur en nitrate et en nitrite. Pour obtenir la teneur en nitrate, il suffit de soustraire la teneur en nitrite obtenue en effectuant le dosage sans passage de l'échantillon sur la colonne au cadmium.

16.2. Préparation de l'extrait à partir de la matière sèche broyée Les poudres végétales sèches sont mises dans une étuve à 70° C pendant 48 H ou dans un dessiccateur pendant une heure si ces dernières sont stockées à -20 ou à -80°C. Des pesées d'environ 50 mg de poudre végétale sont effectuées sur basile ou sur papier libre. Elles sont ensuite ajoutées dans un tube spécifique numéroté avec 4 ml d'eau ultra pure et le mélange est agité énergiquement au vortex. Il est ensuite additionné de nouveau de 4 ml d'eau et agité encore au vortex. Les tubes sont par la suite placés sur un portoir et mis en agitation sur une plaque vibrante pendant une demi-heure, puis centrifugés à 5000 tours par minute pendant 10 minutes.

Dans chaque tube, on introduit un filtre à soupape (SARSTEDT réf 53.420). Les extraits sont transférés dans un tube jetable de 10 mL. Pour l'analyse des nitrates et des nitrites, on utilise le FIA 5000 (Flow Inject Analysis) (Photo 2.11).



Photo 2.11. Flow Injected Analysed FIA 5000- PSH Plantes et Systèmes de cultures Horticoles-INRA Avignon St Paul

17. Transformation de la laitue en produit 4^{ème} gamme

17.1. Définition. Ce terme désigne les produits végétaux frais, commercialisés prêts à l'emploi, c'est-à-dire lavés, épluchés et découpés. Ce sont les salades, crudités variées, mélanges de légumes à cuire conditionnés en sachet plastique.

17.2. Etapes :

* **Le parage.** Le parage consiste à éliminer les parties non consommables, en effet pour la laitue romaine, nous avons procédé à une élimination des feuilles externes, puis nous les avons étrognées, c'est-à-dire nous avons ôté mécaniquement les parties internes du légume avant leur traitement pour la conservation et nous avons coupé les parties supérieures et inférieures (Photo 2.12).

* **Le lavage.** L'opération de lavage et de désinfection permet d'éviter la contamination des feuilles. Selon la législation française, elle peut s'effectuer par trempage dans des bacs contenant des solutions d'eau chlorée ou bien d'hypochlorite de sodium à 80 ppm selon le Guide des bonnes pratiques (1996) et

ceci pendant une minute suivi d'un trempage des feuilles dans un bain d'eau claire pendant 2 minutes.



Photo 2.12. Les feuilles des romaines ont été étrognées et rassemblées avant de les laver.

* *L'essorage.* Les feuilles sont essorées à raison de 5 tours avant de passer à leur conditionnement (Photo 2.13).



Photo 2.13. Séchage des feuilles avant de les conditionner et ce par essorage à raison de 5 tours.

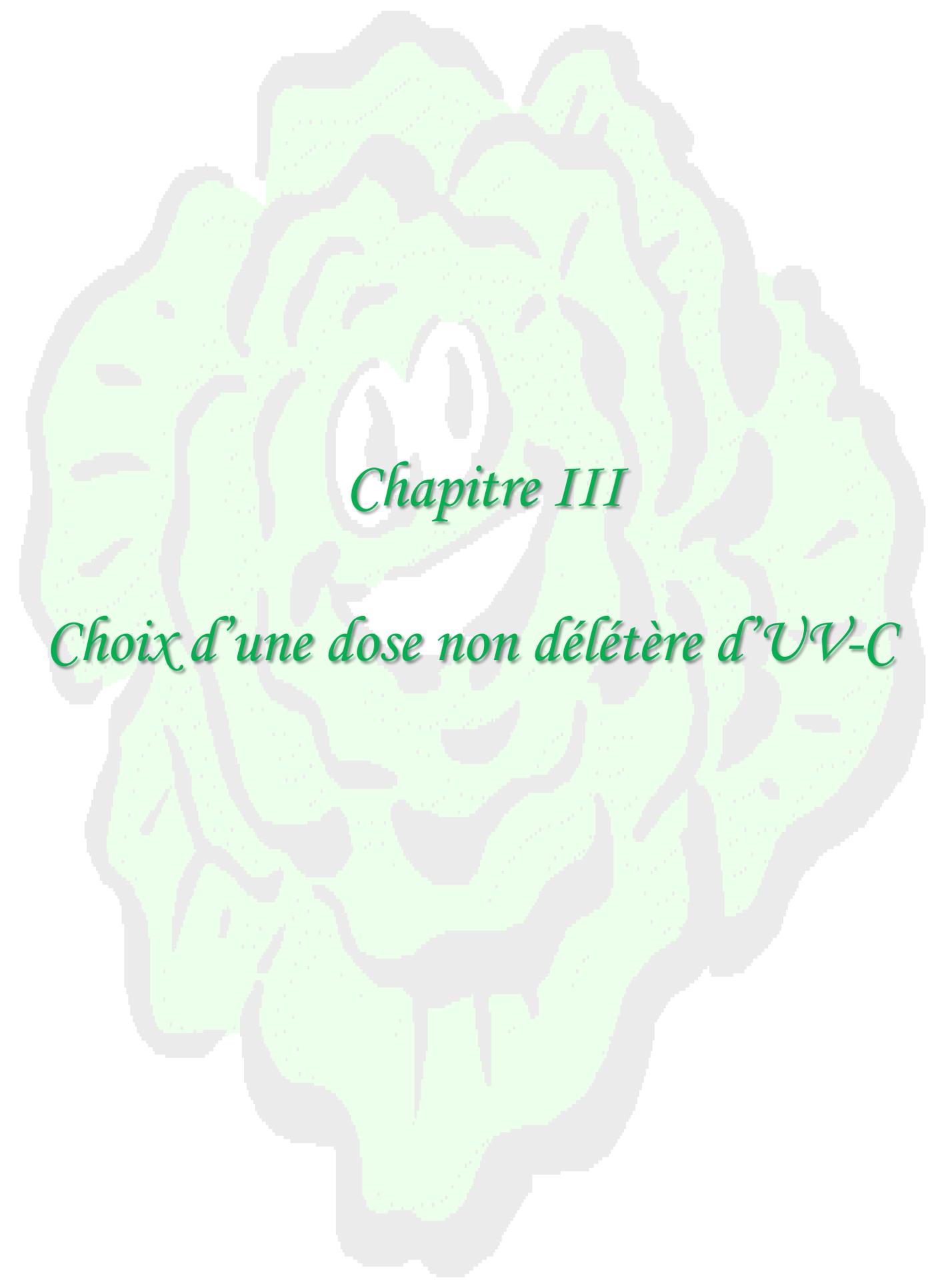


Photo 2.14. Conditionnement des feuilles dans des bocaux de 1,5 L avant de les stocker dans une armoire réfrigérée à 6°C et à l'obscurité.

* *Le conditionnement.* Les feuilles sont placées dans des bocaux de 1,5 L (Photo 2.14) et sont stockées dans une armoire réfrigérée à une température de 6°C et à l'obscurité pendant 14 jours.

V. Analyses statistiques

Une seule méthode d'analyse statistique est utilisée, le test Duncan. Ce test post-hoc (ou test de comparaisons multiples) est utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes dans une analyse de variance. Le test de Duncan, est basé sur la statistique des étendues (pour une présentation détaillée des différents tests post-hoc (David B. Duncan, 1955).



Chapitre III

Choix d'une dose non délétère d'UV-C

CHAPITRE 3

CHOIX D'UNE DOSE NON DELETERE D'UV-C

Résumé. L'application des UV-C sur les fruits et les légumes en post-récolte a pour but de prolonger leur durée de vie, d'augmenter leur résistance vis à vis des pathogènes et d'améliorer leur qualité nutritionnelle. Les effets des UV-C varient en fonction des doses appliquées et des espèces végétales étudiées. Il est donc nécessaire de tester différentes doses d'UV-C pour choisir une dose convenable et dont les effets n'altèrent pas la conservation du produit végétal. Ce travail a consisté à : (i) appliquer différentes doses d'UV-C sur des feuilles de Laitue, variété Romaine, une fois par jour pendant une semaine, (ii) suivre les indicateurs de stress à l'aide d'un Handy PEA, et (iii) évaluer visuellement l'aspect des feuilles. Le suivi de l'aspect visuel des feuilles montre que seules les plantes exposées à une dose de $0,85 \text{ KJ.m}^{-2}$ présentent un aspect comparable à celui des plantes témoins. En revanche, les plantes exposées aux doses de $1,71 \text{ KJ.m}^{-2}$ et de $3,42 \text{ KJ.m}^{-2}$ présentent des feuilles avec de nombreuses taches nécrotiques dès le troisième jour. En raison de leur forte agressivité, les doses de $1,71$ et $3,42 \text{ KJ.m}^{-2}$ n'ont pas été retenues pour la suite de nos expériences alors que celle de $0,85 \text{ KJ.m}^{-2}$ semble représenter une dose convenable.

1. Introduction

Le développement de la vie des plantes terrestres est possible grâce au développement de la couche d'ozone qui joue le rôle d'un écran vis-à-vis des rayonnements UV au niveau de la stratosphère. Cette couche, jouant le rôle d'un filtre à UV, absorbe les rayonnements solaires UV-C (dont la longueur d'onde est inférieure à 280 nm) et une partie des rayonnements UV-B (dont la longueur d'onde varie entre 280 nm et 315 nm). Une dose de rayonnements UV-A est moins efficace que celles d'UV-B et d'UV-C pour induire les réactions des plantes (Barta et al, 2004). La dose ou fluence dépend de la puissance des lampes et du temps d'exposition. La dose s'obtient simplement en multipliant la puissance par le temps. Une des conséquences de l'application des rayons UV est la génération d'un stress oxydatif (Costa et al, 2002) suite à la formation des espèces réactives oxygénées qui peuvent réagir avec les lipides, les pigments, les protéines et même avec les acides nucléiques (Dai et al, 1997).

L'objectif de ce chapitre est de choisir une dose d'UV-C qui n'altère pas le comportement physiologique de la laitue Romaine.

2. Rappel du protocole expérimental

Une fois récoltées, les laitues romaines sont réparties en quatre lots, un lot témoin n'ayant pas reçu d'UV-C, et trois autres exposés à des doses respectives de 0.85, 1.71 et 3.42 KJ.m⁻². Les différents lots ont été ensuite stockés, pendant sept jours, à l'obscurité dans une armoire réfrigérée. En plus de l'aspect visuel des feuilles, deux indicateurs de stress, à savoir le rendement quantique maximal (F_v/F_m) et l'indice de performance photosynthétique, sont suivis quotidiennement et pendant les sept jours à l'aide d'un fluorimètre « Handy-PEA » (Hansatech). Enfin, des échantillons de feuilles ont été prélevés au premier (J1), au troisième (J3) et au septième jour (J7) pour doser la chlorophylle totale.

3. Résultats

3.1. Effet des UV-C sur l'aspect visuel des feuilles

Le suivi de l'aspect visuel des feuilles, durant les sept jours de traitement, a montré que seules les plantes exposées à une dose de 0,85 kJ.m⁻² présentent un aspect comparable à celui des plantes témoins. En revanche, les plantes exposées aux doses de 1,71 et de 3,42 kJ.m⁻² présentent des feuilles avec de nombreuses tâches nécrotiques dès le 3^{ème} jour. Ces tâches, de couleur marron, sont localisées sur le limbe loin de la nervure centrale (Fig. 3.1).

3.2. Effet des différentes doses d'UV-C sur la fluorescence chlorophyllienne de la Romaine

L'Handy PEA permet de diagnostiquer l'état fonctionnel de l'appareil photosynthétique par la mesure du rendement quantique maximal (F_v/F_m) et de l'indice de performance photosynthétique (PI) avec ses trois composantes (RC/Abs), $(1-V_j)/V_j$ et F_v/F_0 .

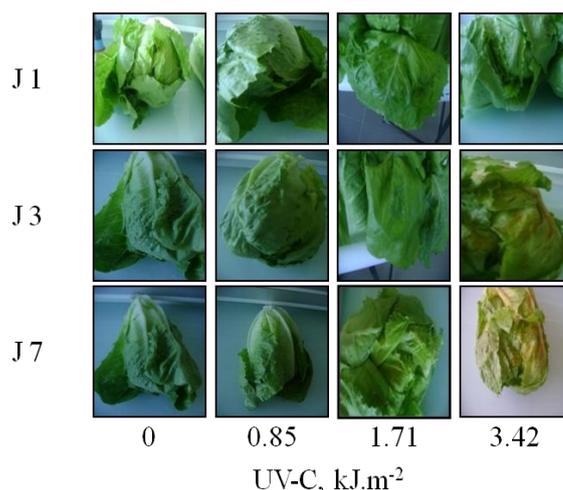


Figure 3.1. Aspect visuel des feuilles après application de 3 doses différentes d'UV-C (0,85; 1,71 ou 3,42 KJ.m⁻²) : Manifestations nécrotiques sur les limbes des feuilles exposées à une dose de 1,71 ou 3,42 KJ.m⁻²

Le rendement quantique maximal (F_v/F_m) est le critère le plus communément utilisé pour caractériser l'état de stress. Il renseigne en fait sur le taux de réduction du pool des plastoquinones (PQ). F_v/F_m ne permet de rendre compte que de l'état fonctionnel du photosystème II (PSII). Les mesures réalisées montrent une légère diminution de ce rapport mais seulement dans les feuilles exposées à la dose la plus élevée (3,42 KJ.m⁻²) (Fig 3.2). Toutefois, ce critère reste le moins sensible aux stress, et ce par rapport aux autres paramètres de la fluorescence chlorophyllienne.

Les mesures réalisées montrent une perturbation générale de la machinerie photosynthétique, mais seulement dans les feuilles exposées aux deux doses les plus élevées (1,71 et de 3,42 KJ.m⁻²). En effet, une diminution au cours du temps de la concentration en centres réactionnels actifs (RC/Abs) et du rendement quantique de la photochimie primaire (F_v/F_0), associée à un déclin du transfert d'électrons par photon piégé $(1-V_j)/V_j$ en réponse à ces doses d'UV-C. Ces diminutions sont observées surtout à partir du troisième jour d'exposition à ces rayonnements (J3) (Fig. 3.2).

L'indice de performance photosynthétique (PI) est le produit des 3 paramètres: F_v/F_0 , Rc/Abs et $(1-V_j)/V_j$. La figure 3.3 montre que les différentes doses d'UV-C conduisent à une diminution de ce paramètre, ce qui plaide en faveur de l'hypothèse de l'installation d'un état de stress chez ces plantes.

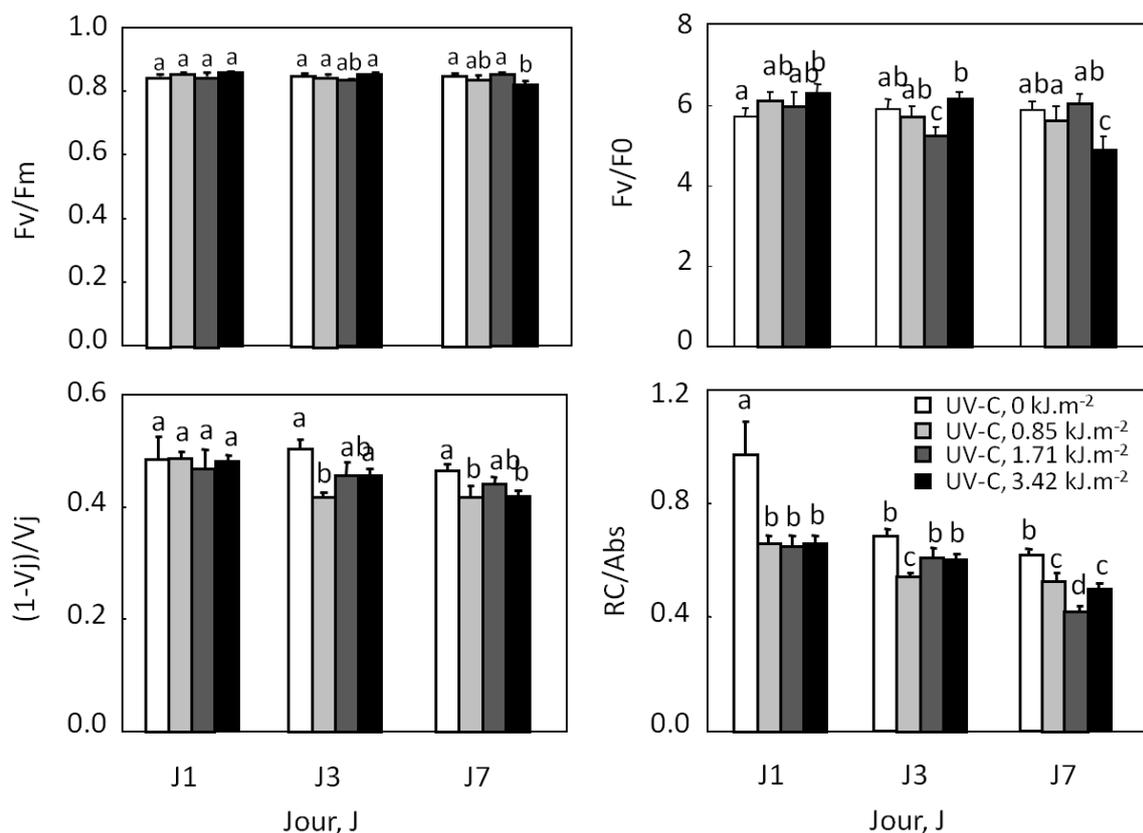


Figure 3.2. Evolution du rendement quantique maximal (F_v/F_m), de la concentration en centres réactionnels actifs (RC/Abs), du rendement quantique de la photochimie primaire (F_v/F_0) et du déclin du transfert d'électrons par photon piégé $(1-V_j)/V_j$ chez la laitue Romaine exposée aux différentes doses d'UV-C : 0; 0,85; 1,71 et 3,42 $KJ.m^{-2}$. Moyennes de 15 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

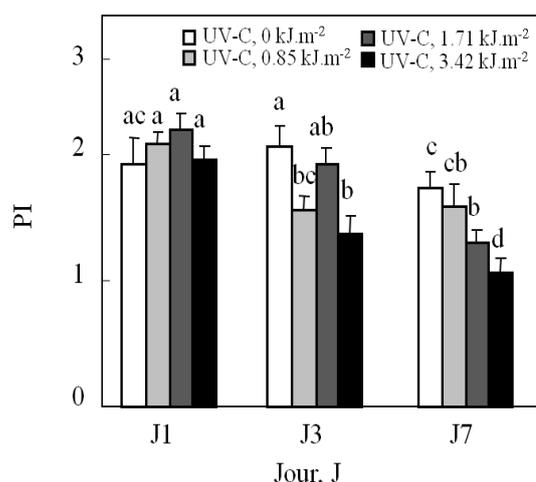


Figure 3.3. Evolution de l'indice de performance photosynthétique (PI) chez la laitue Romaine exposée aux différentes doses d'UV-C : 0; 0,85; 1,71 et 3,42 $kJ.m^{-2}$. Moyennes de 15 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

3.3. Effet des différentes doses d'UV-C sur les teneurs en chlorophylle totale

Des prélèvements des feuilles effectués au premier (J1), au troisième (J3) et au septième jour (J7) de traitement ont été réalisés afin de doser la chlorophylle totale. La figure 4 montre bien que les feuilles exposées respectivement aux doses de 1.71 et 3.42 KJ.m⁻² présentent des teneurs en chlorophylle totale moins importantes que celles des feuilles du lot témoin. Cette différence qui se révèle significative est bien visible à partir du J3. Par contre, le lot exposé à la dose de 0.85 KJ.m⁻² se distingue par des feuilles relativement saines avec des teneurs en chlorophylle totale comparables à celles enregistrées chez le lot témoin. Ces résultats corrélerent avec ceux obtenus par le Handy PEA.

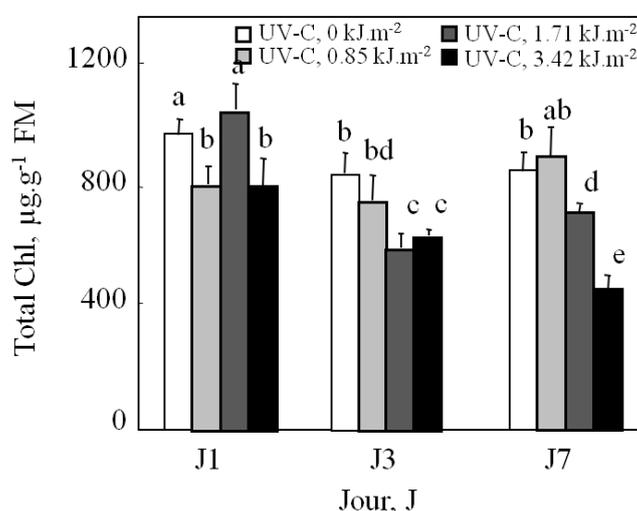


Figure 3.4. Effet des différentes doses d'UV-C (0,85 ; 1,71 ou 3,42 KJ.m⁻²) sur les teneurs en chlorophylle totale après 1; 3 et 7 jours d'exposition. Moyennes de six répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

4. Discussion

Les rayons ultraviolets, biologiquement actifs à toutes les longueurs d'onde, exercent sur les organismes vivants des effets qui varient selon les doses absorbées. A forte dose, ils sont délétères tandis que, administrés à dose hormique, ils peuvent procurer des effets bénéfiques (Droby et al, 1993). L'absorption de ces rayons à des doses élevées provoque deux principaux types de dégâts, à savoir

une altération de la structure de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pouvant provoquer des mutations génétiques, et des perturbations des processus physiologiques (Stapleton,1992). Par contre, des effets bénéfiques, comme l'induction de la résistance aux maladies, la prolongation de la durée de vie post-récolte, etc... (Charles, 2008a, 2008b; Vicente, 2005), peuvent être obtenus par traitement post-récolte des fruits et légumes avec des doses hormiques de rayons ultraviolets.

Certains agents physiques ou chimiques sont délétères lorsqu'ils sont appliqués à forte dose, par contre, ils stimulent des réponses bénéfiques à faible dose. Ce phénomène, connu sous le nom d'hormesis, correspond à la dose qui permet d'obtenir une réponse bénéfique optimale et qualifiée de dose hormique (Calabrese E.J,1997).

De nombreux auteurs ont utilisé les radiations UV-C pour tester leurs effets sur la conservation et sur la résistance aux pathogènes, chez des modèles végétaux. Mercier et al (2001) ont testé plusieurs doses afin de choisir celle qui renforce la résistance du poivron à *Botrytis cinerea* au cours du stockage. Ce test comporte une exposition du fruit à quatre doses d'UV-C : 0,22; 0,44, 0,88 et 2,2 kJ.m⁻², jusqu'à l'obtention de la bonne dose. En calculant l'incidence de la maladie, ils ont pu confirmer que 0,88 KJ.m⁻² est la dose qui induit une bonne résistance aux champignons au cours du stockage. Cette dose est proche de celle que nous avons trouvée. Une dose de 3,7 kJ.m⁻² s'est avérée efficace pour induire la résistance de la tomate à *Botrytis cinerea* (Charles, 2008).

Les rayonnements UV-C sont utilisés fréquemment en post-récolte pour prolonger la durée de vie des plantes. En effet, l'effet de quatre doses d'UV-C (1,6; 2,8; 4,8 et 7,2 kJ.m⁻²) sur la qualité de la pastèque a été étudié (Hernández, 2010) par le suivi des changements qualitatifs de cubes de melon d'eau stockés jusqu'à 11 jours à 5°C L'augmentation des doses UV-C a induit une production légèrement plus élevée de CO₂ tout au long de la période de stockage et une baisse de la contamination microbienne, juste après l'illumination. Selon les attributs sensoriels de qualité, le témoin et les lots irradiés avec de faibles doses d'UV-C (1,6 et 2,8 kJ.m⁻²) peuvent être stockés pour un maximum de 11 jours à 5°C, tandis que

la durée maximale de conservation des fruits traités avec des doses d'UV-C modérées à élevées était de 8 jours à 5°C. Il a été bien mis en évidence que l'irradiation avec des UV-C retarde le ramollissement des fraises (Pombo, 2009). Chez la mangue, une amélioration qualitative est obtenue après une exposition à différentes doses d'UV-C (González, 2007).

La première manifestation de l'exposition des tissus végétaux aux rayons UV est la production des espèces oxygénées hautement réactives (H_2O_2 , O_2 , $HO\cdot$) qui attaquent les macromolécules et les membranes cellulaires (Arnott T, 1991). A ce propos, Ait-Barka et al (2000) ont observé une peroxydation des lipides membranaires consécutivement à la formation des radicaux libres chez la tomate exposée à une lumière ultraviolette. Nos résultats ont également montré que les fortes d'UV-C ont engendré un état de stress dans les feuilles de la laitue romaine, attesté notamment par une réduction de l'indice de performance photosynthétique. Ces résultats pourraient être, selon Murphy (1983), la conséquence des effets néfastes des rayons UV sur les membranes cellulaires, dont les principaux sont une dépolarisation membranaire, une inactivation des pompes ioniques, comme les ATPases, ainsi qu'une altération des flux des ions K^+ , Na^+ et Cl^- . D'autres manifestations, telles que la fluctuation du pH cytoplasmique, l'inhibition de l'absorption des acides aminés et de la biosynthèse des protéines ont été également signalées comme conséquence de l'exposition des tissus végétaux aux fortes doses de rayons UV (Murphy, 1983).

Outre les membranes cellulaires, les rayons UV affectent l'appareil photosynthétique en occasionnant des dommages au niveau de la structure et des membranes des thylakoïdes (Bornman J. F, 1983). Aux fortes doses, ils entraînent même un dysfonctionnement du photosystème II en altérant le complexe oxydatif de l'eau (De Long J. M, 1999). Ils peuvent de même induire une diminution de la teneur en chlorophylle et de l'activité de la Rubisco, ce qui provoque un ralentissement de l'activité photosynthétique (Jourdan E, 2000) conduisant à un rendement agricole médiocre.

5. Conclusion

Le but de cette partie est de choisir une dose d'UV-C qui n'altère pas le fonctionnement physiologique de la laitue romaine, *Lactuca sativa* L. L'irradiation des laitues romaines avec différentes doses d'UV-C a induit, au terme de 7 jours, des manifestations nécrotiques sur les limbes foliaires, une dégradation de la chlorophylle totale et un dysfonctionnement de la machinerie photosynthétique, mais seulement chez les deux lots de laitue exposés aux doses d'UV-C de 1.71 et 3.42 kJ.m⁻². En outre, un état de stress est associé à ce dysfonctionnement, comme il peut être attesté par la baisse de l'indice de performance photosynthétique (PI).

En revanche, ces modifications sont absentes chez le lot exposé à la dose 0.85 kJ.m⁻² qui a montré un comportement photosynthétique similaire à ce lui du lot des plantes témoins n'ayant pas subies de traitement aux UV-C.

En conclusion, cette dose de 0.85 KJ m⁻², qui n'a altéré ni l'aspect visuel des laitues Romaines ni la machinerie photosynthétique, est choisie pour le reste des expériences, afin de tester son impact sur la réponse de ces plantes aux contraintes biotiques (champignons) et abiotiques (salinité).



Chapitre IV

*Effet des rayonnements UV-C
sur la résistance de la laitue
romaine à BC87 et SM*

CHAPITRE 4

EFFETS DES RAYONNEMENTS UV-C SUR LA RESISTANCE DE LA LAITUE ROMAINE A BC87 ET SM

Résumé. *Lactuca sativa* L. est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Astéracées. Ce légume feuille constitue une production importante de la filière fruits et légumes tunisienne et mondiale. Cependant, pendant leur croissance et leur stockage, les feuilles tendres de la laitue sont la cible de nombreuses attaques pathogènes par des champignons, comme *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*, respectivement responsables de la pourriture grise et de la pourriture blanche. Plusieurs recherches ont démontré qu'une modification des conditions atmosphériques (température, rayonnements UV-C) peut réduire le développement et la propagation de ces maladies. Ainsi, le but de ce travail est d'exposer des feuilles de laitues à la dose d'UV-C de 0,85 kJ.m⁻² non délétère pour leur physiologie puis de suivre leur comportement vis-à-vis de ces deux champignons. Vingt-quatre heures après le traitement, les feuilles externes ont été détachées et inoculées avec du mycélium de *B. cinerea* et de *S. minor*. L'évolution de la nécrose est suivie pendant 4 jours par comparaison à des feuilles témoins non traitées. De plus, des prélèvements sur les feuilles ont été effectués à J0, J1 et J4 après inoculation pour effectuer des dosages des chlorophylles, des caroténoïdes, du MDA, du H₂O₂ et de l'acide gallique. L'analyse des résultats a révélé que l'exposition des laitues aux UV-C renforce leur résistance à ces deux agents pathogènes. Cet accroissement de la résistance est lié à une diminution des niveaux d'accumulation du MDA et du H₂O₂ et à une augmentation de la teneur en acide gallique, qui est considéré comme un antioxydant. Quant aux pigments chlorophylliens, leur biosynthèse ne semble pas être trop affectée par ces traitements.

1. Introduction

À la frontière du saprophytisme et du parasitisme, le champignon phytopathogène ubiquiste, *Botrytis cinerea*, responsable de la pourriture grise, est un microorganisme polyphage qui cause d'énormes dégâts en agriculture. La maladie causée par cet agent pathogène est économiquement redoutable et importante car ce champignon attaque plus de 230 espèces de plantes. Sur cultures maraîchères, viticoles et horticoles, en pré- ou en post-récolte, cette maladie conduit à des pertes importantes de rendement. *Sclerotinia minor* est aussi un ascomycète assez polyphage. Les pertes économiques enregistrées dans certains

pays sont parfois importantes. Aux États-Unis, par exemple, les dégâts peuvent fluctuer d'une parcelle à une autre, de moins de 1% de plantes malades jusqu'à 75%. En France, la situation est tout à fait comparable. Ce champignon sévit avec plus ou moins de gravité dans de nombreuses parcelles, seul ou en association avec d'autres champignons, comme *Botrytis cinerea*.

Par ailleurs, la laitue (*Lactuca sativa* L.) est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Astéracées, et dont la production représente une composante importante de la filière tunisienne et mondiale «fruits et légumes». Ses feuilles tendres sont la cible de ces deux pathogènes pendant leur croissance et leur stockage. Or, certains travaux de recherche ont démontré que l'exposition des plantes aux UV-C pourrait dans certaines conditions renforcer leur résistance aux pathogènes (Rodov et al, 1992 ; Mercier et al.2001 ; Charles et al, 2008).

Le travail de recherche, objet de ce chapitre, s'intéresse à l'étude des effets d'un traitement par les UV-C sur la résistance de la laitue romaine à deux champignons pathogènes, *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*.

2. Rappel du protocole expérimental

Des laitues romaines ont été récoltées auprès du GRAB (Groupe de recherche en Agriculture Biologique) à l'âge de 68 jours. Elles sont ensuite réparties en deux lots ; un lot témoin ne recevant pas de radiations UV-C et un lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻². Vingt quatre heures après l'exposition aux UV-C, les feuilles externes des deux modalités ont été détachées et inoculées avec du mycélium de *Botrytis cinerea* (BC87) et *Sclerotinia minor* (SM). L'inoculation se fait par un simple dépôt du mycélium sur la nervure centrale. Le développement de la nécrose suite à cette inoculation et son évolution sont suivis pendant 4 jours par comparaison aux feuilles témoins non traitées. Des échantillons de feuilles des deux modalités ont été prélevés en J0 (24 heures après exposition aux UV-C), J1 (24 heures après inoculation) et en J4 (96 heures après inoculation) pour doser le malondialdéhyde (MDA), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), les pigments chlorophylliens et les polyphénols totaux.

3. Résultats

3.1. Effet d'un traitement des laitues romaines par des UV-C sur le développement des champignons, *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*, sur leurs feuilles

Le choix des deux champignons, *Botrytis cinerea* (BC87) et *Sclerotinia minor* (SM), est justifié par le fait qu'ils sont très étudiés chez la laitue par les chercheurs de l'unité de phytopathologie à l'INRA d'Avignon. L'inoculation des feuilles isolées de la laitue avec ces deux agents pathogènes a induit sur leurs limbes l'apparition de plages nécrotiques dont l'importance est suivie pendant 4 jours par la mesure de leur surface. Les résultats, illustrés sur la figure 4.1, révèlent un développement important des nécroses qui semble s'accélérer avec le temps, notamment à partir du troisième jour après l'inoculation. Toutefois, le traitement par les UV-C semble ralentir ce développement. Ainsi, les laitues prétraitées avec les UV-C ont manifesté une plus grande résistance à *Botrytis cinerea* (BC87) et à *Sclerotinia minor* (SM) par comparaison avec les laitues témoins n'ayant pas subi ce prétraitement.

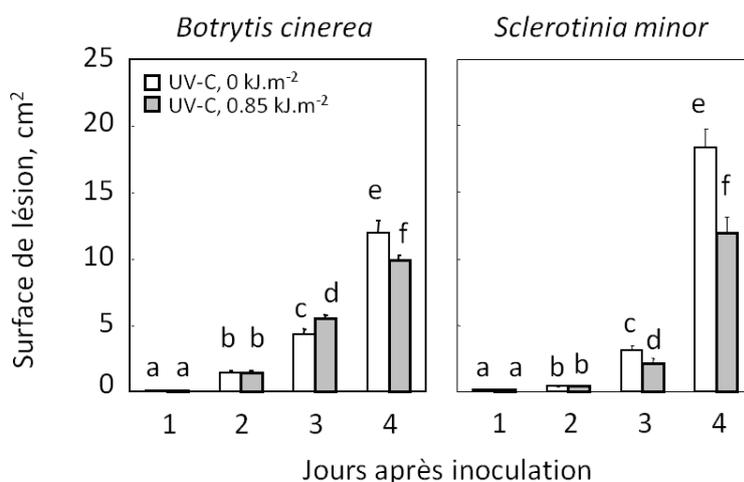


Figure 4.1. Evolution de la surface de lésion causée par les deux agents pathogènes (BC87) et (SM) sur des feuilles isolées de la Laitue Romaine exposées ou non auparavant aux UV-C. Moyennes de 20 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

3.2. Effet du traitement des feuilles par des UV-C sur leur état oxydatif après inoculation avec BC87 et SM

Il est actuellement établi que les contraintes environnementales, biotiques et abiotiques, accélèrent chez les plantes la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui peuvent réagir avec les constituants cellulaires (protéines,

pigments, ADN et lipides) et stimuler leur oxydation. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) compte parmi ces EOR dont l'accumulation dans les tissus des plantes soumises aux contraintes a été souvent considérée comme un indicateur de stress.

Par ailleurs, la peroxydation lipidique est un des plus anciens effets connus des EOR, car ses dérivés représentent des composés couramment utilisés dans le diagnostic de l'état du stress oxydatif (Slater, 1984) et sont qualifiés de marqueurs de ce stress. Le dialdéhyde malonique ou MDA est l'un de ces marqueurs les plus utilisés, en raison de la simplicité et la sensibilité de sa méthode de dosage.

Les niveaux d'accumulation du MDA sont déterminés sur des prélèvements de feuilles, d'abord exposées ou non à la dose d'UV-C de 0.85 kJ.m^{-2} puis séparées de leur rosette et inoculées avec les deux champignons, BC87 et SM (Fig. 4.2). L'analyse des résultats permet de diagnostiquer un état de stress oxydatif dans les deux types de feuilles, qui s'est manifesté par un accroissement de leur teneur en MDA. Toutefois, les niveaux atteints au terme 4 jours de traitement restent nettement plus bas dans les feuilles prétraitées aux UV-C, comparés à ceux enregistrés dans les feuilles témoins.

Pour ce qui est du H_2O_2 , ses teneurs dans les feuilles témoins et exposées à la dose d'UV-C de 0.85 kJ.m^{-2} , avant et après leur inoculation avec *B. cinerea* et *S. minor*, ont montré des variations similaires à celles du MDA (Fig. 4.3). En effet, l'irradiation préalable des laitues romaines avec les UV-C a ralenti, au terme de 96 heures, l'accumulation de cette forme réactive de l'oxygène dans les tissus foliaires des plantes inoculées avec les deux pathogènes. Les niveaux de H_2O_2 atteints dans ces tissus sont significativement inférieurs à ceux enregistrés chez les plantes témoins n'ayant pas reçu de radiations UV-C.

Il apparaît ainsi que l'amélioration de la résistance vis-à-vis des deux champignons dans les feuilles traitées auparavant aux UV-C est liée à une baisse de l'état de stress, attestée par une diminution très marquée des teneurs en MDA et en H_2O_2 , notamment au 4^{ème} jour après l'inoculation. Ce résultat suggère que l'exposition des feuilles de laitue à ce type de rayonnements leur a permis d'acquérir une meilleure capacité à protéger leurs structures membranaires contre le stress oxydatif.

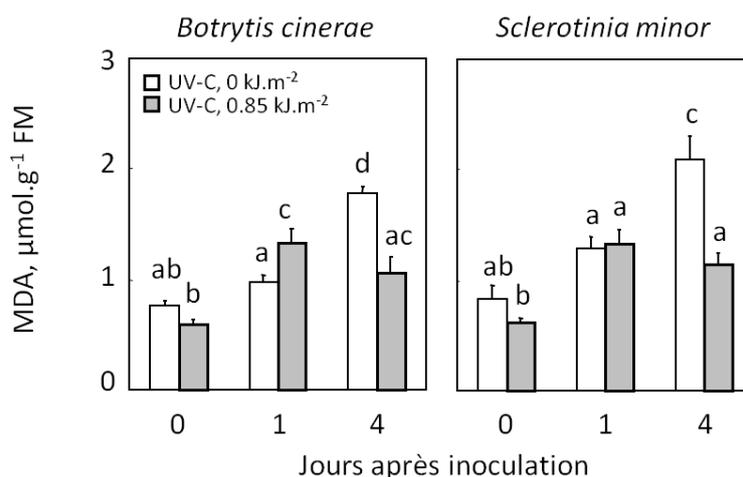


Figure 4.2. Evolution de la teneur en MDA dans des feuilles isolées de la Laitue Romaine, exposées ou non aux UV-C puis inoculées par (BC87) et (SM). Moyennes de 9 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

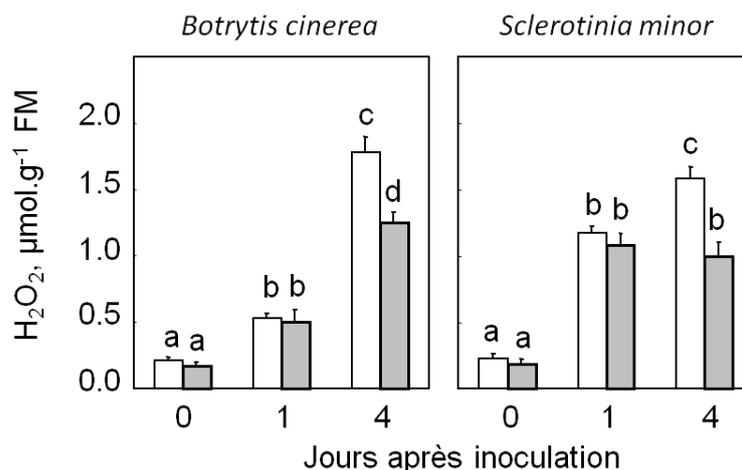


Figure 4.3. Evolution de la teneur en H₂O₂ dans des feuilles de la Laitue Romaine exposées ou non aux UV-C puis inoculées par (BC87) et (SM). Moyennes de 9 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

3.3. Evaluation de la réponse antioxydante non enzymatique

Il est admis que lors d'un stress oxydatif généré par les contraintes du milieu, l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est accompagnée d'une stimulation de la production de nombreux antioxydants non enzymatiques tels que les caroténoïdes et les composés phénoliques (Allende, 2003).

Pigments photosynthétiques. L'implication de ces pigments, et notamment des caroténoïdes, dans les réponses aux stress a été signalée dans plusieurs travaux (Charles et al, 2008 a). Les teneurs de ces pigments, exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, sont estimées dans les feuilles des deux lots de laitues prélevées aux jours J0 (24 heures après UV-C), J1 (24 heures après inoculation) et J4 (96 heures après inoculation). L'analyse des résultats (Fig. 4.4) révèle que la quantité de chlorophylle rapportée à l'unité de surface foliaire augmente avec le temps dans les feuilles inoculées avec *S. minor*, contrairement à celle des feuilles inoculées avec *B. cinerea*, où elle reste stable. En outre, l'exposition préalable des feuilles aux UV-C ($0,85 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$) semble y avoir induit une stimulation de la biosynthèse des chlorophylles. En effet, les valeurs enregistrées sont toujours plus importantes dans les feuilles des plantes traitées aux UV-C que chez les témoins, et ce pour les deux champignons.

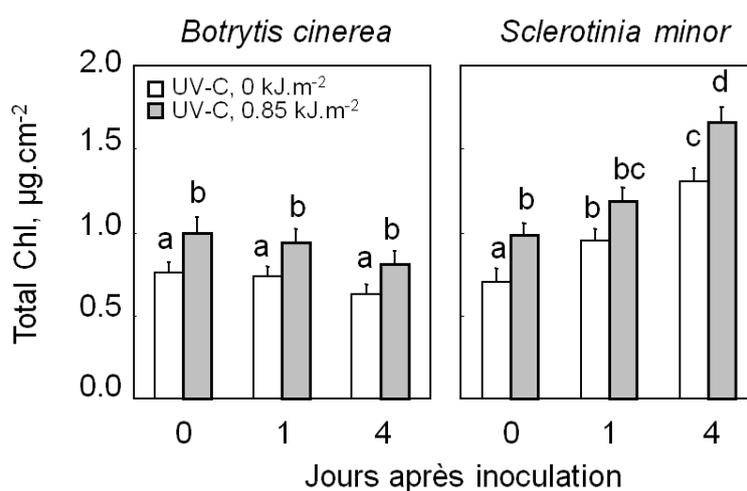


Figure 4.4. Evolution de la teneur en chlorophylle totale dans des feuilles de Laitue Romaine exposées ou non aux UV-C puis inoculées par BC87 et SM. Moyennes de 9 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

En ce qui concerne les caroténoïdes, les quantités rapportées à l'unité de surface foliaire (Fig. 4.5) montrent des fluctuations qui semblent peu dépendantes de la nature du champignon du traitement par les UV-C. On relève surtout une accumulation excessive des caroténoïdes dans les feuilles des plantes non traitées aux UV-C et inoculées avec *B. cinerea* au jour 1 (24 heures après l'inoculation). Un effet similaire est également observé dans les feuilles inoculées avec *S. minor* au

4^{ème} jour après l'inoculation (J4), mais qui est moins marqué dans les feuilles traitées aux UV-C.

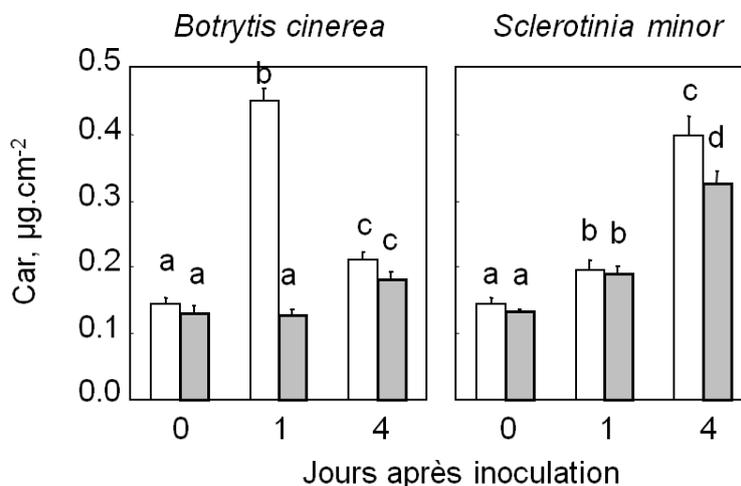


Figure 4.5. Evolution de la teneur en caroténoïdes dans des feuilles de Laitue Romaine exposées ou non aux UV-C puis inoculées par BC87 et SM. Moyennes de 9 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

Polyphénols totaux. Les teneurs en polyphénols totaux sont déterminées par HPLC. L'identification des composés contenus dans la laitue romaine révèle que l'acide gallique est le composé majoritaire. Ce composé est réputé être un piègeur des radicaux libres (ChinYen, 2002).

La quantification de l'acide gallique dans les feuilles de cette espèce suite à leur inoculation avec du mycélium de *Botrytis cinerea* ou de *Sclerotinia minor* (Fig. 4.6) montre que les teneurs en ce composé, qui n'ont subi de variation significative que 96 heures après l'inoculation, ont atteint des niveaux nettement plus élevés chez les feuilles exposées aux radiations UV-C que chez les feuilles témoins.

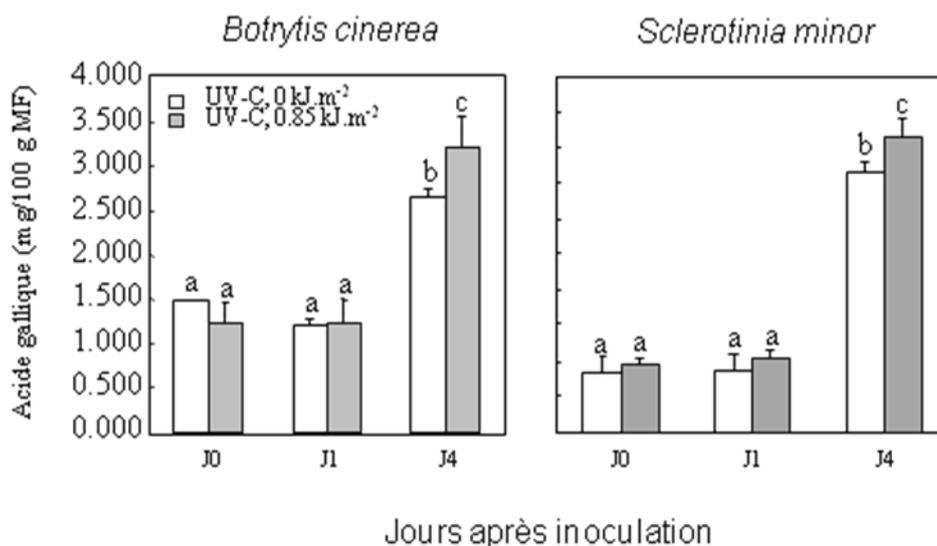


Figure 4.6. Evolution de la teneur en acide gallique dans des feuilles de Laitue Romaine exposées ou non aux UV-C puis inoculées avec BC87 et SM. Moyennes de 9 répétitions. Les différences entre les traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les différents traitements.

4. Discussion

L'étude des effets des rayonnements UV-C sur la résistance des végétaux aux pathogènes au cours du stockage a fait l'objet d'autres travaux de recherche ((Charles et al, 2008), (Mercier et al, 2001)). Nos résultats suggèrent que le fait d'exposer les feuilles de la laitue romaine à une faible dose d'UV-C lui a permis d'améliorer sa résistance contre les deux pathogènes, BC87 et SM. Ceci a été bien confirmé par les faibles teneurs en MDA et en H₂O₂ enregistrées chez les romaines exposées aux UV-C.

Des effets comparables des UV-C sur la résistance des plantes aux pathogènes ont été aussi rapportés dans d'autres études. Mercier et al. (2001) ont testé plusieurs doses (0,22; 0,44, 0,88 et 2,2 kJ.m⁻²) afin de choisir celle qui renforce la résistance du poivron à *Botrytis cinerea* au cours du stockage. En accord avec nos résultats, ils ont confirmé que la dose de 0,88 kJ.m⁻² est celle qui induit une bonne résistance à ce champignon. Ils ont aussi vérifié que l'exposition du poivron rouge 24heures avant l'inoculation avec *Botrytis cinerea* acquiert aux plantes une résistance accrue contre ce pathogène. Chez les tomates vertes, l'amélioration de la

résistance vis-à-vis du Botrytis au cours du stockage est tributaire de l'application d'une dose d'UV-C plus élevée, de 3.7 kJ.m⁻² (Charles et al, 2008).

Toutefois, il faut signaler que l'induction de cette résistance est dépendante de plusieurs facteurs. D'une part, il est bien mis en évidence que les UV-C induisent une résistance des plantes vis-à-vis du pathogène quel que soit leur stade de maturité lors de l'application de ces rayonnements. D'autre part, le traitement par une dose unique de rayons UV-C à 0,88 kJ.m⁻² s'est révélé aussi efficace que le traitement par deux doses successives de 0,44 kJ.m⁻². Alors que le traitement par deux doses successives de 0,88 kJ.m⁻² n'a pas amélioré cette résistance et il l'a même diminuée.

Il a été souligné par Sharma (2006) que les organes végétaux sont capables de déclencher des systèmes de défense induits, en réponse à un éliciteur, qui se traduisent essentiellement par : (1) le renforcement de la paroi cellulaire avec des barrières biochimiques, par exemple, via la lignification et la subérisation, et (2) la synthèse et l'accumulation de composés antimicrobiens telles que les phytoalexines. Nos résultats, quoique préliminaires, ont montré aussi que l'accroissement de la résistance des laitues romaines à *B. cinerea* et à *S. minor* est lié à une augmentation de la teneur en acide gallique, composé phénolique considéré comme un antioxydant. Chez la tomate mature, les UV-C ont induit l'accumulation de composés phénoliques et donc la formation d'une barrière biochimique constituée principalement de lignine et de subérine (Charles et al, 2008). Le traitement des fruits matures et verts de la tomate, en pré-stockage, par des UV-C peut affecter le métabolisme des phénylopropanoïdes selon deux modes différents : (1) soit que les UV-C affectent la nature chimique de la cire cuticulaire causant ainsi une réduction de la longueur de la chaîne et une augmentation de la ramification des alcanes homologues, (2) soit que, dans les tissus internes, la voie des phénylpropanoïdes déclenchée par les UV-C dépasse le renforcement des phénols lors de la maturation des fruits. Une amélioration de la résistance à *Penicillium digitatum* Sacc (pourriture verte) a été auparavant mise en évidence par Rodov et al. (1992) chez les agrumes matures, et elle est associée à une synthèse de scoparone (6,7-diméthoxycoumarine, C₁₁H₁₀O₄) dans leur épicarpe. La biosynthèse

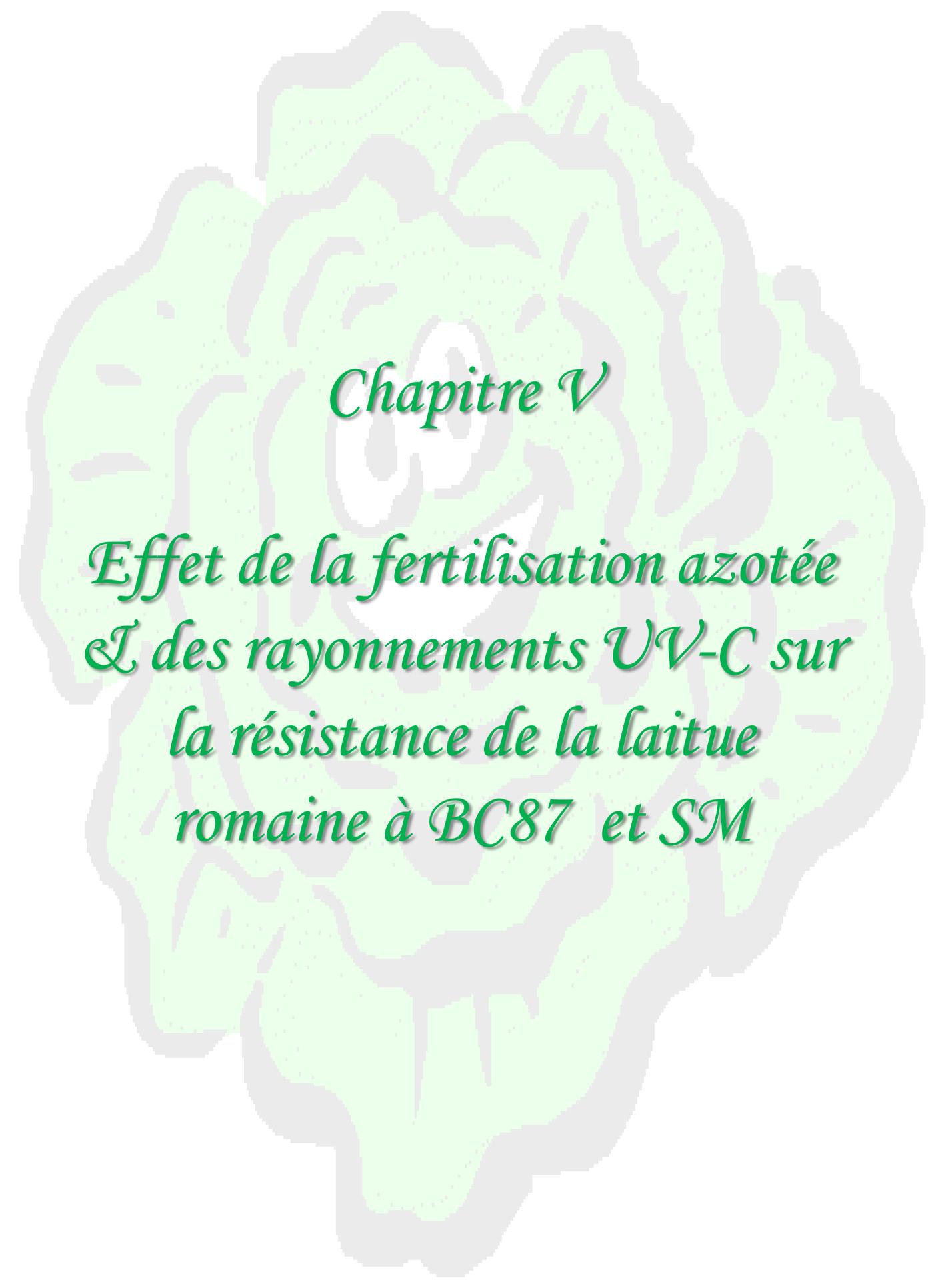
de scoparone a été également associée à la résistance des fruits mûrs de *Tangelo Nova*, de *Citrus aurantium* et de *Citrus paradisi* à l'infection par *Phytophthora parasitica* (Ortuño et al., 1997). La scoparone a été ainsi considérée comme une phytoalexine synthétisée dans les fruits de ces cultivars. La résistance acquise par les tomates vertes suite à leur irradiation avec les UV-C est due à l'accumulation d'une autre phytoalexine, la rishitine, à des concentrations inhibitrices du pathogène (Charles et al, 2008). La rishitine est une phytoalexine propre à la tomate accumulée aussi suite à son exposition à des micro-organismes et qui n'a pas été détectée chez des plantes n'ayant pas été exposées à la dose de 3.7kJ/m².

Il peut être enfin déduit de tous ces résultats que l'application des UV-C sur les plantes (laitues, tomates vertes, agrumes, etc...) pourrait renforcer la synthèse de métabolites secondaires antimicrobiens, tels que les phytoalexines et les polyphénols, améliorant ainsi leur résistance aux agents pathogènes.

5. Conclusion

Le but de cette deuxième partie de la thèse est d'étudier l'effet de la dose d'UV-C 0.85 kJ.m⁻² (choisie dans le 3^{ème} chapitre de la thèse) sur la résistance de la laitue romaine à *Botrytis cinerea* et à *Sclerotinia minor*.

Les analyses des résultats confirment que l'exposition des laitues à une faible dose d'UV-C semble avoir renforcé leur résistance à ces 2 pathogènes. Cette résistance accrue est liée à une diminution des contenus de leurs feuilles en MDA et en H₂O₂ ainsi qu'à une augmentation de celui de l'acide gallique.



Chapitre V

*Effet de la fertilisation azotée
& des rayonnements UV-C sur
la résistance de la laitue
romaine à BC87 et SM*

CHAPITRE 5

EFFET DE LA FERTILISATION AZOTEE ET DES RAYONNEMENTS UV-C SUR LA RESISTANCE DE LA LAITUE ROMAINE A BOTRYTIS CINEREA (BC87) ET A SCLEROTINIA MINOR (SM)

Résumé. Les maladies les plus redoutables de la laitue sont la sclérotiniose ou pourriture blanche (*Sclerotinia minor*), le mildiou (*Bremia lactuca*) et la pourriture grise (*Botrytis cinerea*). Plusieurs recherches ont démontré que le développement de ces maladies dépend non seulement des pratiques culturales (irrigation, fertilisation), mais aussi des conditions atmosphériques (température, rayonnements UV-C).

On s'est proposé, dans ce chapitre, de rechercher dans un premier temps la dose d'azote qui autorise une meilleure résistance aux deux pathogènes, *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*. Des plantes âgées de 30 jours sont cultivées en hors sol, sur vermiculite, sous trois régimes de fertilisation azotée : 2, 10 et 20 mM d'azote. Des mesures hebdomadaires in situ des paramètres de la fluorescence chlorophyllienne ont été effectuées, à l'aide d'un Handy PEA, sur les feuilles des laitues ainsi cultivées. Outre ces paramètres, les teneurs en pigments photosynthétiques, en MDA, en H₂O₂, en nitrate, en azote total et en polyphénols totaux sont déterminées dans des feuilles prélevées 24 heures plus tard sur les mêmes laitues. L'analyse des résultats a montré surtout que l'appauvrissement du milieu de culture en azote a entraîné une diminution de l'indice de performance photosynthétique. Parallèlement, les marqueurs du stress oxydatif (MDA et H₂O₂) n'ont pas montré de variations significatives en réponse à ce déficit en azote. Toutefois, un enrichissement de leurs contenus en polyphénols totaux est enregistré dans ces conditions. Au jour suivant (53^{ème} jour), l'impact du régime d'azote sur la réponse de la laitue à *Botrytis cinerea* (BC87) et à *Sclerotinia minor* (SM), est étudié sur des feuilles prélevées sur ces plantes puis inoculées avec du mycélium de l'un de ces 2 champignons. Le suivi de la surface de lésion a bien révélé que les plantes se développant sur milieu nutritif additionné de 2 mM d'azote sont plus résistantes à ces deux agents pathogènes.

La seconde étape est consacrée à une étude des effets de cette dose d'azote (2 mM) et de la dose d'UV-C de 0.85 kJ.m⁻² sur la résistance des laitues aux deux pathogènes précédemment utilisés. Après 24 heures d'exposition aux UV-C (au jour 53), les feuilles des deux modalités sont prélevées et inoculées avec du mycélium de BC87 ou de SM, et la surface de la lésion est suivie pendant 4 jours. En outre, les teneurs en MDA, en H₂O₂, en pigments photosynthétiques et en polyphénols totaux sont déterminées dans des feuilles prélevées avant et après inoculation avec les deux champignons. L'analyse des résultats a révélé une augmentation de la résistance de la laitue à ces deux champignons après irradiation aux UV-C. L'acquisition de cette résistance est concomitante d'une diminution des teneurs foliaires en MDA et en H₂O₂ et d'une augmentation de celles en polyphénols totaux. Elle est également associée à un enrichissement des laitues en pigments photosynthétiques, en particulier, en caroténoïdes.

1. Introduction

La laitue romaine, comme la plupart des plantes maraichères, est la cible des champignons au cours de leur culture ou en période de stockage. Le développement de ces différents champignons dépend étroitement des pratiques culturales (fertilisation azotée notamment) et des systèmes d'irrigation (Lecompte et al, 2010). L'étude des effets de certains stress, comme les rayonnements UV et le déficit en azote, sur le développement des champignons pouvant infecter les cultures maraichères d'une façon générale a fait l'objet de nombreux travaux de recherche. Certains de ces travaux se sont été intéressés à l'étude de l'effet de la fertilisation azotée sur la résistance des plantes aux pathogènes (Verheoff et al, 1965 ; Elad et al, 1993 ; Navarette et al, 2010 ; Lecompte et al, 2010). D'autres ont prouvé, qu'exposées à des rayonnements d'UV-C, les plantes acquièrent une résistance contre les pathogènes (Rodov et al, 1992 ; Mercier et al, 2001 ; Charles et al, 2008 ; Siddiqui et al, 2010).

Dans ce chapitre, on s'est proposé d'étudier les effets de la variation de l'apport d'azote au milieu de culture et de l'application d'une dose d'UV-C adéquate sur le comportement des feuilles de Laitue romaine vis-à-vis de deux champignons pathogènes, *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*.

2. Rappel du protocole expérimental

La culture des laitues romaines est réalisée en hors sol, sur vermiculite, par l'équipe de phytopathologie de l'INRA St Maurice d'Avignon. Deux expériences ont été réalisées. Dans la première, les plantes âgées de 30 jours sont cultivées en présence de trois régimes de fertilisation azotée : 2, 10 et 20 mM d'azote. Dans une première étape, des mesures hebdomadaires de quelques paramètres de la fluorescence chlorophyllienne (F_v/F_m , RC/Abs , $1-V_j/V_j$ et F_v/F_0) sont faites *in situ*, pendant trois semaines (à l'âge de 37, 44 et 51 jours), sur les feuilles de 5 plantes par régime azoté, soit trois feuilles par plante prises sur des positions différentes : externe, médiane et interne. 24 heures plus tard (jour 52), quelques paramètres indicateurs de l'état oxydatif (MDA et H_2O_2), ainsi que les statuts en nitrate, en azote total, en pigments chlorophylliens et en polyphénols sont

déterminés dans des feuilles échantillonnées sur les mêmes plantes. Au jour suivant (jour 53), des feuilles de chaque régime sont récoltées et réparties en 2 lots : un premier lot inoculé avec le mycélium du BC87 et un second où les plantes sont inoculées avec du mycélium de SM. La surface de lésion induite par chaque champignon est suivie pendant les 4 jours suivants.

Dans une seconde expérience, des plantes cultivées jusqu'à l'âge de 52 jours sous régime azoté réduit à 2 mM, dose considérée comme optimale (autorisant une meilleure résistance aux pathogènes), sont réparties en 2 lots : un lot témoin ne recevant pas de radiations UV-C et un lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻². Vingt quatre heures après, et avant de procéder à l'inoculation avec le mycélium des deux champignons étudiés, les feuilles de cinq plantes par modalité sont prélevées afin de déterminer leurs contenus en pigments photosynthétiques, en indicateurs de stress (MDA et H₂O₂), en azote total et nitrique et en polyphénols. D'autres prélèvements de feuilles sont ensuite effectués sur le reste des plantes de chaque modalité puis inoculées avec le mycélium de l'un des deux champignons précédemment utilisés, BC87 et SM. La surface de lésion due à l'inoculation par chacun de ces champignons est mesurée quotidiennement, pendant les quatre jours suivants. Au cours de cette période, les paramètres précédents, excepté les fractions azotées, sont déterminés sur les parties saines des feuilles inoculées et prétraitées ou non aux UV-C.

3. Résultats

3.1. Recherche d'une dose d'azote qui autorise une meilleure résistance aux champignons pathogènes

3.1.1. Fonctionnement photosynthétique des feuilles et fertilisation azotée

Les variations de la fluorescence chlorophyllienne sont suivies pendant 14 jours sur des laitues ayant été cultivées en présence de trois régimes d'azote, afin de préciser l'impact de la fertilisation azotée sur l'état fonctionnel des photosystèmes. Les mesures ont porté sur le rendement quantique maximal (F_v/F_m) et sur l'indice de performance photosynthétique (PI) avec ses trois composantes (RC/Abs), $(1-V_j)/V_j$ et F_v/F_0 . Sur la figure 5.1, où sont regroupés les résultats des 4 paramètres, des variations plus ou moins significatives sont observées en réponse au régime de

fertilisation azotée. Pour ce qui est des valeurs du rapport F_v/F_m , de faibles variations peu significatives sont affichées et sont comprises dans la gamme des valeurs normales (0.82 à 0.84), et ce indépendamment du régime d'azote et de l'âge des plantes, confirmant ainsi la stabilité de l'efficacité photochimique du PSII. Toutefois, il est à noter que les valeurs minimales sont enregistrées dans les feuilles des laitues cultivées sous le régime le moins pourvu en azote (2mM). A l'exception du rapport F_v/F_0 , qui a subi des variations presque similaires à celles du rapport F_v/F_m , les autres paramètres de la fluorescence chlorophyllienne ont montré des fluctuations plus nettes et plus significatives en fonction du régime azoté et de l'âge des plantes. En effet, l'enrichissement du milieu en azote a entraîné une augmentation de la concentration en centres réactionnels actifs (RC/Abs) et du déclin du transfert d'électrons par photon piégé ($(1-V_j)/V_j$), et ce dès le premier prélèvement (jour J0).

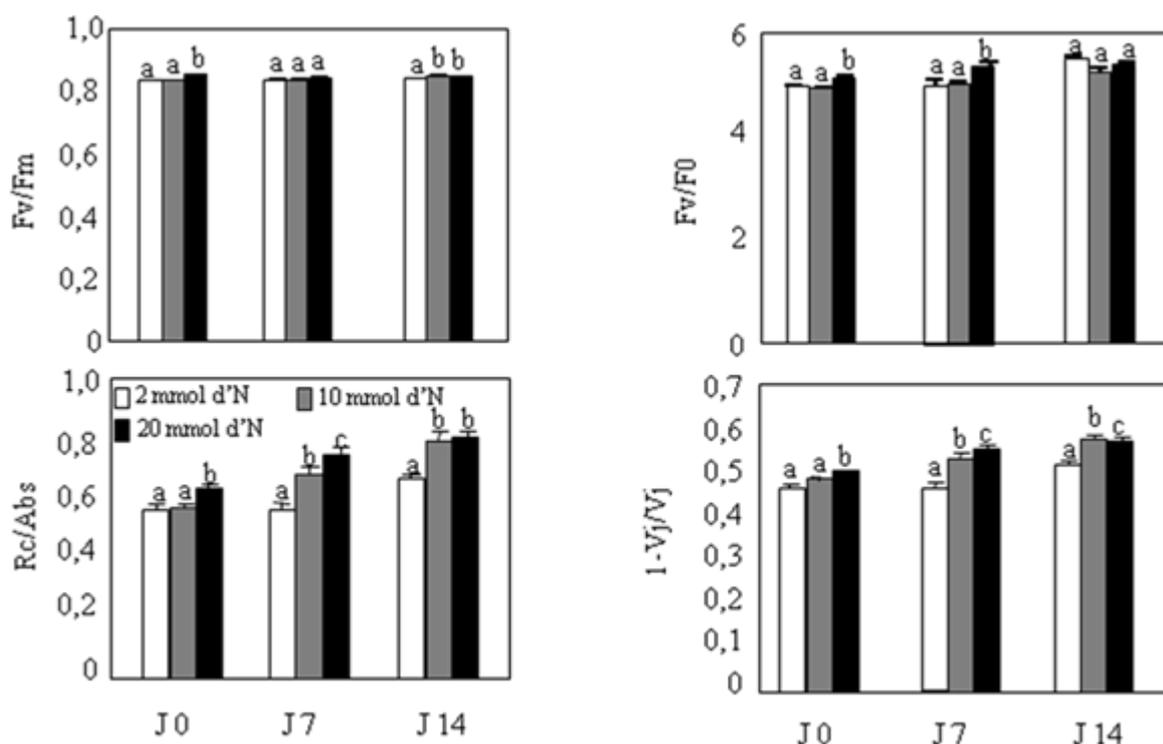


Figure 5.1. Evolution du rendement quantique maximal (F_v/F_m), de la concentration en centres réactionnels actifs (RC/Abs), du rendement quantique de la photochimie primaire (F_v/F_0) et du déclin du transfert d'électrons par photon piégé $(1-V_j)/V_j$ dans les feuilles de la laitue Romaine cultivée sous différents régimes d'azote (2, 10 et 20 mM). Moyennes de 12 répétitions. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

Pour ce qui est de l'indice de performance photosynthétique (PI), produit des 3 derniers paramètres (F_v/F_0 , RC/Abs et $(1-V_j)/V_j$), les variations indiquent clairement que le régime riche en azote (20 mM) a toujours conduit aux valeurs les plus élevées de ce paramètre (Fig. 5.2). Ces variations, qui semblent s'accroître avec l'âge des plantes, suggèrent probablement un dysfonctionnement de la machinerie photosynthétique, en réponse au régime azoté le plus bas.

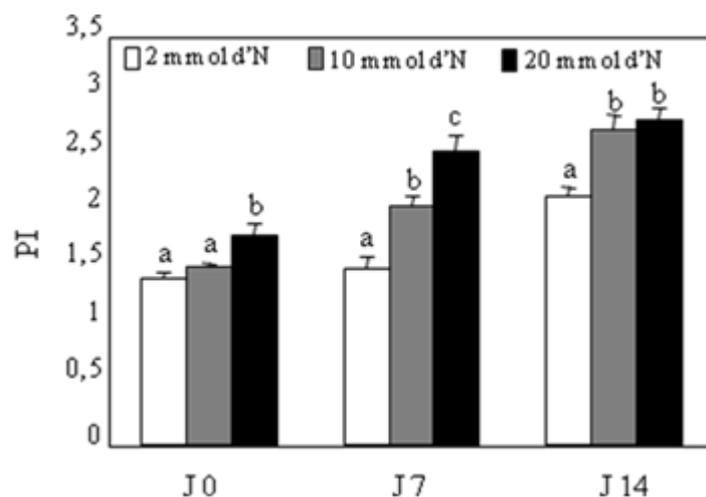


Figure 5.2. Evolution de l'indice de performance photosynthétique (PI) chez la laitue Romaine irriguée avec différentes concentrations d'azote (2 mM, 10 mM et 20 mM d'azote). Moyennes de 12 répétitions. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

Un jour après la dernière mesure de fluorescence (faite au jour 51), les teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylles et caroténoïdes) sont déterminées dans des feuilles prélevées sur les laitues des trois régimes (Tab. 5.1). L'analyse statistique montre des différences significatives entre les teneurs en chlorophylle a, b et totale des feuilles provenant des différents régimes, et notamment ceux à 2 et 20 mM d'azote, attestant que l'enrichissement du milieu en azote est accompagné d'une accumulation de ces pigments dans les organes photosynthétiques.

Les caroténoïdes sont connus en tant que métabolites secondaires pouvant assurer des fonctions variées dans la plante, dont la fonction antioxydante (De Pascale et al, 2001). La quantification de ces pigments a révélé aussi que les feuilles des romaines issues du régime le plus pourvu en azote (20 mM), ont produit plus

de caroténoïdes que celles issues des régimes qui en sont le moins pourvus (2 et 10 mM) (Tab. 5.1). Toutefois, les feuilles produites par les laitues issues du régime le moins pourvu en azote n'ont pas manifesté de symptômes visuels de carence en pigments photosynthétiques.

Tableau 5.1. Teneurs en pigments photosynthétiques dans les feuilles de laitue romaine issues des 3 régimes de fertilisation azotée. Moyennes de 5 répétitions. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

	Concentration en azote, mM		
	2	10	20
Chl a, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF	175,8 \pm 13,1 ^a	185,9 \pm 22,5 ^a	229,0 \pm 18,2 ^b
Chl b, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF	296,3 \pm 13,8 ^a	322,3 \pm 29,2 ^a	385,6 \pm 12,1 ^b
Chl T, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF	472,1 \pm 26,9 ^a	508,2 \pm 51,6 ^a	614,6 \pm 30,2 ^b
Car, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF	18,9 \pm 3,8 ^a	16,3 \pm 4,3 ^a	22,0 \pm 6,4 ^b

3.1.2. Etat oxydatif de la feuille de laitue romaine et fertilisation azotée

Les teneurs en MDA (produit de la peroxydation lipidique) et en peroxyde d'hydrogène (espèce oxygénée réactive), qui sont deux marqueurs de stress oxydatif, sont déterminées sur les mêmes prélèvements provenant de 5 plantes par régime d'azote (Tab. 5.2). L'analyse des résultats montre que ces deux marqueurs, le produit de la peroxydation lipidique comme le H_2O_2 , n'ont pas subi de variations statistiquement différentes entre les 3 régimes de fertilisation azotée, suggérant l'absence de stress dans les laitues différemment alimentées en azote.

Tableau 5.2. Teneurs en MDA et en H_2O_2 des feuilles de laitue romaine issues des trois régimes azotés. Moyennes de 5 répétitions. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements

	Concentration en azote, mM		
	2	10	20
MDA, $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ MF	1,9 \pm 0,5 ^a	1,8 \pm 0,1 ^a	2,2 \pm 0,2 ^a
H_2O_2 , $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}$ MF	6,4 \pm 2,7 ^a	5,2 \pm 3,1 ^a	6,3 \pm 2,8 ^a

Il ressort de cette analyse que l'état oxydatif des laitues romaines n'est pas altéré par les différents régimes de fertilisation azotée. L'hypothèse de l'induction d'un état de stress oxydatif dans les feuilles des laitues romaines faiblement alimentées en azote (2 mM), postulée par les résultats du paragraphe précédent (Figs. 5.1 et 5.2), n'est donc pas confirmée. De plus, ces feuilles n'ont manifesté aucun symptôme visuel de carence en pigments photosynthétiques.

3.1.3. Effet de la fertilisation azotée sur les statuts en azote et en polyphénols de la feuille de laitue

Les teneurs en azote total, en nitrate et en polyphénols sont aussi déterminées sur les mêmes prélèvements de feuilles utilisés précédemment. L'analyse des résultats du tableau 5.3 montre clairement que plus le milieu de culture est riche en azote plus les contenus foliaires en ces deux fractions azotées sont importants.

Tableau 5.3. Teneurs en azote total, en nitrate et polyphénols des feuilles de laitue romaine issues des 3 régimes de fertilisation azotée. Moyennes de 4 répétitions. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements

	Concentration en azote, mM		
	2	10	20
Azote total, g.100 g ⁻¹ MS	2,00 ± 0,05 ^a	4,42 ± 0,08 ^b	4,54 ± 0,11 ^b
Nitrate, g.kg ⁻¹ MS	11,88 ± 0,36 ^a	975,25 ± 11,72 ^b	1037,48 ± 65,83 ^c
Polyphénols, mg EAG.g ⁻¹ MS	9,25 ± 0,15 ^a	5,42 ± 0,12 ^b	3,75 ± 0,24 ^c

En ce qui concerne les composés phénoliques, nous n'avons présenté que les teneurs en polyphénols totaux, exprimées en mg d'équivalents acide gallique (EAG), les principaux composés identifiés par HPLC (comme les acides chicorique et chlorogénique) n'étant pas révélés dans nos échantillons. L'analyse statistique des teneurs en polyphénols totaux des 3 modalités de fertilisation azotée montre des différences significatives indiquant une stimulation progressive de la production de ces métabolites au fur et à mesure de l'abaissement de l'apport d'azote au milieu de culture. En effet, les niveaux d'accumulation des polyphénols

dans les feuilles de la laitue cultivée en présence de 2 mM d'azote représentent environ le double et le triple de ceux estimés dans les feuilles des traitements azotés de 10 et 20 mM respectivement.

3.1.4. Effet de la fertilisation azotée sur la réponse de la laitue aux deux champignons, *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*

La figure 5.3 présente l'évolution des surfaces de lésion enregistrées sur la période de 04 jours suivant l'inoculation avec *Botrytis cinerea* (BC87) ou *Sclerotinia minor* (SM), chez les laitues romaines issues des trois régimes azotés. Pour ce qui est du champignon SM, il apparaît une augmentation des surfaces de lésion avec la concentration en azote et avec le temps. L'analyse statistique de ces surfaces (Tab. A1, Annexe) révèle des différences significatives nettes entre les trois traitements azotés, notamment au 4^{ème} jour (J4). En effet, la surface de nécrose causée par SM est passée de 9.03 cm² au régime de 2 mM d'azote à 14.7 cm² au régime le plus riche (20 mM), attestant d'une diminution de la résistance de la laitue à ce champignon en réponse à l'enrichissement du milieu en azote. Un comportement similaire est noté chez les laitues inoculées avec BC87 où l'augmentation de la dose en azote dans le milieu est aussi accompagnée d'une diminution de leur résistance à ce pathogène. Toutefois, les variations observées dans ce cas sont beaucoup plus atténuées, surtout au jour 4 (J4).

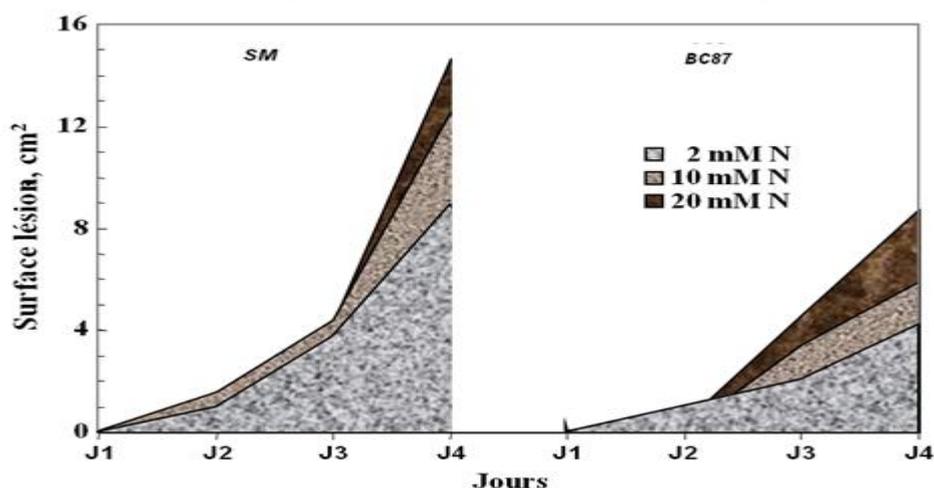


Figure 5.3. Evolution de la surface de lésion induite par les deux pathogènes (BC87 et SM) chez les laitues romaines cultivées sur milieux différemment enrichis en azote. Moyennes de 10 répétitions et intervalles de sécurité au seuil de 5 %. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements. Tab. A1 (Annexe).

On retiendra à la fin de cette analyse que, d'une part, l'accroissement de la concentration en azote dans le milieu nutritif entraîne une augmentation de la sensibilité des laitues romaines aux deux champignons testés. D'autre part, la comparaison des surfaces de lésion causées par les deux champignons, BC87 et SM, permet de suggérer une moindre sensibilité à l'azote de BC87. En effet, au 4^{ème} jour (J4), la surface de lésion causée par ce champignon n'a pas dépassé les 50 % de celles causées par SM, aux régimes de 2 et 10 mM d'azote, et elle a atteint les 60 % au régime le plus riche (20 mM).

Cette analyse basée sur la comparaison des surfaces de lésion causée par les deux champignons atteste que la dose de 2 mM d'azote est celle qui autorise aux laitues romaines une meilleure résistance à ces champignons.

Dans ce qui suit, cette dose d'azote sera utilisée avec la dose d'UV-C retenue d'après les résultats du 3^{ème} chapitre pour étudier l'effet des rayonnements UV-C sur le comportement de la feuille de laitue vis-à-vis de BC87 et de SM.

3.2. Effets des rayonnements UV-C sur la résistance de la laitue romaine à BC87 et SM

3.2.1. Effets de l'irradiation avec des UVC sur les teneurs en azote total et nitrique des feuilles avant inoculation. Vingt quatre heures après exposition aux UV-C, les teneurs des deux fractions azotées, et notamment celles de l'azote nitrique, ont subi une augmentation significative dans les feuilles de laitue romaine (Tab. 5.4). Pour cette dernière fraction, les niveaux atteints dans les feuilles traitées aux UV-C (24 $\mu\text{mol NO}_3^-$ par gramme de matière sèche) représentent environ le double de ceux déterminés dans leurs homologues non traités. Ceci suggère que les radiations UV-C ont stimulé l'absorption et le transport de ce nutriment et/ou ont inhibé sa réduction par leur effet dépressif sur les activités enzymatiques qui en sont responsables (nitrate et nitrite réductase).

Tableau 5.4. Teneurs en azote total et nitrique des feuilles des laitues traitées ou non avec une dose d'UV-C de 0,85 kJ.m⁻². Moyennes de 5 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité p=0,05. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

	Doses d'UV-C, kJ.m ⁻²	
	0	0,85
Azote total, g N.100 g ⁻¹ MS	2,00 ± 0,05 ^a	2,32 ± 0,04 ^b
Nitrate, µmol NO ₃ .g ⁻¹ MS	11,88 ± 0,36 ^a	24,30 ± 0,60 ^b

3.2.2. Effets des UV-C sur le comportement de la feuille de laitue vis-à-vis de l'inoculation avec BC87 et SM

Surface de lésion. Vingt quatre heures après l'irradiation aux UV-C (à la dose de 0.85 kJ.m⁻²) des laitues romaines cultivées sur milieu nutritif additionné de 2 mM d'azote, la surface de nécrose développée sur les feuilles inoculées avec du mycélium de BC87 ou de SM est mesurée pendant les 4 jours suivant l'inoculation puis exprimée en % de la surface totale de la feuille (Fig. 5.4). L'analyse statistique des valeurs absolues (exprimées en cm²) des surfaces de lésion causée par BC87 (Tab. A2, Annexe) montre des différences significatives entre les deux modalités, mais seulement au 4^{ème} jour (J4). Effectivement, à ce stade, les lésions qui ont envahi en moyenne 41 % de la surface totale chez les feuilles témoins (non prétraitées avec des UV-C), n'en ont touchée qu'environ au quart, chez les feuilles exposées à la dose d'UV-C de 0.85 kJ.m⁻². Ceci suggère que le prétraitement des laitues romaines avec des UV-C a conduit à une diminution de leur sensibilité à ce champignon.

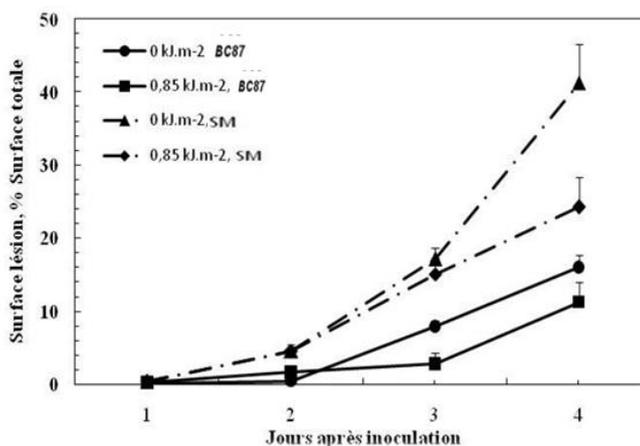


Figure 5.4. Evolution en fonction du temps de la surface de lésion (en pourcents de la surface totale de la feuille) causée dans les feuilles des laitues romaines prétraitées ou non avec des UV-C puis inoculées avec l'un des deux pathogènes (SM et BC87). Moyennes de 10 répétitions et intervalles de sécurité au seuil de 5 %. Tab. A2 (Annexe).

Pour ce qui est des surfaces de lésion causées par le champignon *BC87*, les résultats (Fig. 5.4) indiquent une évolution croissante en fonction du temps, mais qui est moins rapide dans les feuilles prétraitées avec les UV-C, et tout particulièrement à partir du troisième jour (J3). L'effet le plus marqué est observé au jour J4, où la surface de lésion causée par *BC87* sur les feuilles ainsi traitées est diminuée de 30 % par comparaison avec celles des organes n'ayant pas subi ce prétraitement. Ainsi, l'exposition aux UV-C à la dose de 0.85kJ.m⁻² a amélioré la capacité de la laitue romaine à résister aux champignons. Toutefois, la comparaison des surfaces de lésions causées par les deux pathogènes, *SM* et *BC87*, permet d'affirmer que la laitue est plus sensible au premier qu'au second pathogène. En effet, les surfaces atteintes par ces lésions sont toujours plus réduites chez ce dernier, et ce indépendamment du traitement (Fig. 5.4).

Teneurs en pigments photosynthétiques. La figure 5.5 présente les variations en fonction du temps des teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylle a, chlorophylle b, chlorophylle totale et caroténoïdes) dans les feuilles de laitue romaine prétraitées ou non avec des UV-C puis inoculées avec *BC87*. L'analyse de

cette figure permet de constater, d'une part, que l'exposition des laitues romaines aux rayonnements UV-C a stimulé après 24 heures (J0) la biosynthèse de ces pigments photorécepteurs. En effet, une amélioration nette du statut en chlorophylles (a, b et totale) et en caroténoïdes est observée dans les feuilles des laitues ayant été exposées à la dose d'UV-C de 0.85 kJ.m⁻². D'autre part, par comparaison avec les feuilles témoins, ces feuilles ont maintenu par la suite un meilleur statut en chlorophylles, notamment en chlorophylle a, et en caroténoïdes, malgré une augmentation (au jour J1) suivie d'une baisse enregistrée dans les deux types de feuilles aux jours suivants (J2 et J4). Toutefois, l'écart le plus marqué noté au jour J1, soit 24 heures après l'inoculation, s'est atténué au cours du temps, si bien qu'au terme de 4 jours, les teneurs ont atteint dans les deux catégories de feuilles des niveaux peu ou pas significativement différents. Au vu de ces résultats, il apparaît une corrélation positive entre la résistance des laitues romaines contre ces champignons pathogènes et l'enrichissement de leurs feuilles en pigments chlorophylliens et en caroténoïdes.

Pour ce qui est de la réponse des laitues à l'inoculation avec du mycélium de SM (Fig 5.6), globalement des variations similaires des teneurs des différents pigments photosynthétiques sont enregistrées au cours des 4 jours qui ont suivi l'inoculation. Toutefois, on assiste à un enrichissement plus marqué en chlorophylles et, surtout en caroténoïdes, dans les feuilles exposées aux radiations UV-C avant d'être inoculées. En effet, le statut en caroténoïdes de ces organes s'est maintenu à des niveaux supérieurs à ceux enregistrés avant l'inoculation et dans les feuilles prétraitées aux UV-C par comparaison avec les feuilles témoins. Cet enrichissement en caroténoïdes pourrait expliquer la résistance acquise des laitues romaine contre ce pathogène.

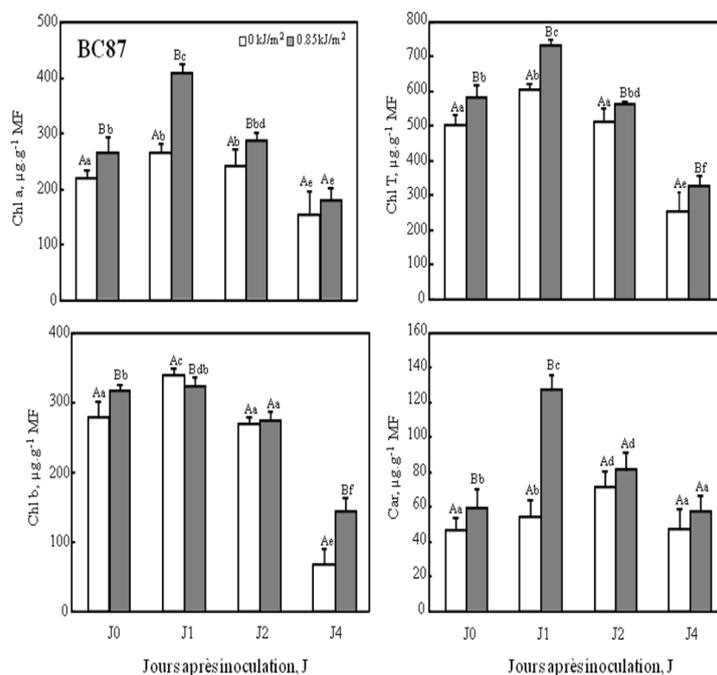


Figure 5.5. Variations en fonction du temps des teneurs en pigments photosynthétiques des feuilles. Au jour J0, les feuilles, exposées un jour avant aux UV-C, sont détachées des plantes puis inoculées avec du mycélium de BC87. Moyennes de 5 répétitions et intervalles de sécurité au seuil de 5 %. Les lettres accolées aux histogrammes correspondent aux résultats des tests statistiques effectués pour l'analyse des différences dues aux deux facteurs, «traitement» (lettres majuscules) et «temps» (lettres minuscules). La même lettre indique l'absence de différences significatives.

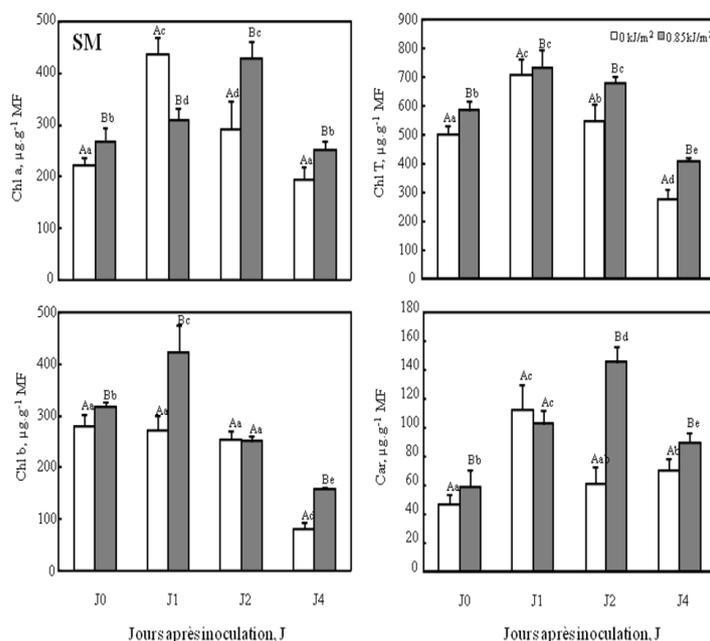


Figure 5.6. Variations en fonction du temps des teneurs en pigments photosynthétiques chez les laitues romaines prétraitées ou non avec des UV-C puis inoculées avec du mycélium de SM. Moyennes de 5 répétitions et intervalles de sécurité au seuil de 5 %. Les lettres accolées aux histogrammes correspondent aux résultats des tests statistiques effectués pour l'analyse des différences dues aux deux facteurs, «traitement» (lettres majuscules) et «temps» (lettres minuscules). La même lettre indique l'absence de différences significatives.

Teneurs en polyphénols totaux. Pour ce qui est des polyphénols totaux, leur accumulation dans les feuilles exposées aux UV-C, a atteint après 24 heures (jour J0) un niveau supérieur qui dépasse environ de 30 % celui des feuilles non exposées (Fig. 5.7). Donc, l'exposition des laitues romaines à la dose de 0.85 kJ.m⁻² a renforcé la production de ces métabolites dans leurs feuilles. Toutefois, après inoculation de ces organes avec BC87 ou SM (Fig. 5.7), la teneur de ces métabolites a subi une baisse considérable, notamment au jour J2, quoique les niveaux atteints dans les feuilles prétraitées avec les UV-C sont restés plus élevés par comparaison avec ceux de leurs homologues non prétraités. Il est à noter que la meilleure production de polyphénols est toujours observée au 4^{ème} jour après l'inoculation avec les deux champignons et, en particulier, avec BC87.

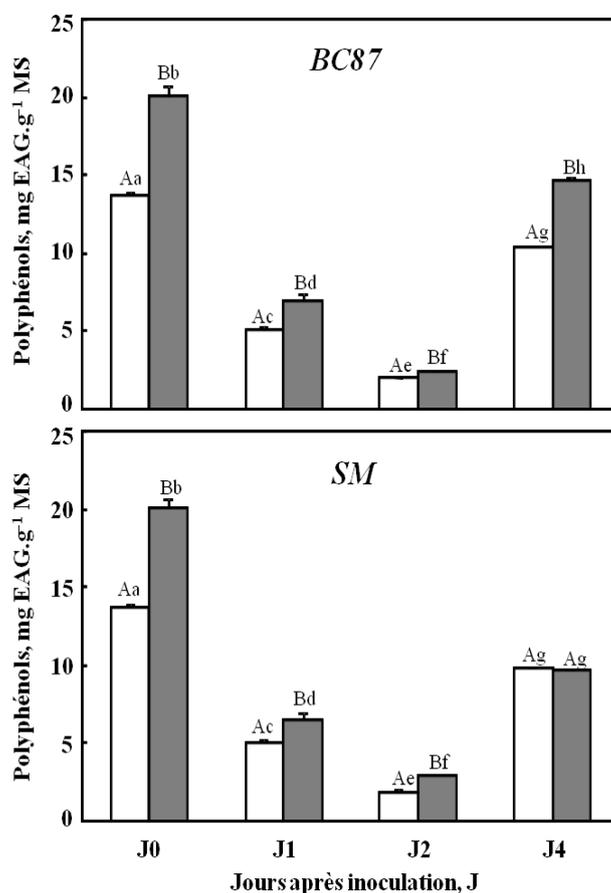


Figure 5.7. Variations en fonction du temps des teneurs en polyphénols totaux chez les laitues romaines prétraitées ou non avec des UV-C puis inoculées avec du mycélium de *Botrytis cinerea* (BC87) ou celui de *Sclerotinia minor* (SM). Moyennes de 3 répétitions et intervalles de sécurité au seuil de 5 %. Les lettres accolées aux histogrammes correspondent aux résultats des tests statistiques effectués pour l'analyse des différences dues aux deux facteurs, «traitement» (lettres majuscules) et «temps» (lettres minuscules). La même lettre indique l'absence de différences significatives.

Il apparaît ainsi que, durant le stockage des laitues romaines inoculées avec du mycélium de BC87 ou de SM, une diminution significative et importante des teneurs en polyphénols totaux est obtenue durant les premières 48 heures après inoculation. Cette baisse est suivie ensuite d'une reprise ayant ramené les teneurs à des niveaux supérieurs, surtout dans les feuilles exposées auparavant aux UV-C (jour J4), mais qui n'ont jamais atteints ceux de départ (jour J0).

Teneurs en MDA et en H₂O₂. Le malondialdéhyde (MDA) est issu de la dégradation des acides gras polyinsaturés des lipides membranaires, phénomène connu sous le nom de peroxydation lipidique. Les résultats de la figure 5.8 indiquent une légère augmentation, mais statistiquement significative, des teneurs en MDA dans les feuilles de laitue sous l'effet de l'irradiation avec des UV-C. Cet écart est maintenu en dépit d'une baisse significative des teneurs après inoculation des feuilles avec l'un ou l'autre des deux champignons au jour J1 (24 heures après l'inoculation). Au-delà, soit après 48 (J2) et 96 heures (J4), une augmentation des teneurs est notée chez les deux modalités de laitue, mais les niveaux atteints sont significativement plus bas dans les laitues prétraitées avec les UV-C. Ceci laisse supposer un ralentissement de la lipoperoxydation membranaire chez les plantes ainsi traitées, et donc une meilleure protection des membranes contre l'attaque par ces pathogènes. Cet aspect de protection membranaire est corrélé avec le développement de la surface de lésion causée par les deux pathogènes.

Le peroxyde d'hydrogène est une forme réactive de l'oxygène dont la teneur dans les organes des plantes peut être utilisée comme outil de diagnostic de l'état de stress oxydatif. L'analyse statistique des teneurs estimées dans les feuilles de laitue permet de conclure, qu'exposées à une dose de 0.85kJ.m⁻², ces organes ont produit presque autant, si non moins de H₂O₂, par comparaison avec les feuilles non exposées (au jour J0). Au vu de ces légères variations, il semble que, 24 heures après l'exposition aux UV-C, les feuilles de laitue romaine n'ont pas manifesté d'état de stress pouvant être à l'origine de dommages oxydatifs. Par la suite, les teneurs foliaires en H₂O₂ chez les deux lots de laitue romaine ont subi une légère augmentation au départ, mais qui s'est accentuée par la suite, notamment au 2^{ème}

(J2) et au 4^{ème} jour (J4) après inoculation avec du mycélium de BC87 ou de SM (Fig. 5.8). Cependant, l'accumulation de H₂O₂ dans les feuilles précédemment inoculées avec des UV-C s'est toujours maintenue à des niveaux beaucoup plus bas que ceux des feuilles non inoculées. Par exemple, ces niveaux représentent environ le tiers au jour J2 (48 heures après inoculation) dans les feuilles traitées avec les UV-C puis inoculées avec BC87 par comparaison avec les feuilles témoins, et ont atteint au jour J4 (4 jours après inoculation) les 50 % dans leurs homologues inoculées avec SM. Ces résultats suggèrent que la moindre accumulation du H₂O₂ dans les feuilles de laitue prétraitées avec les UV-C puis inoculées peut être, en partie, à l'origine de la baisse de la lipoperoxydation membranaire attestée par les variations de MDA, surtout à partir du jour J2.

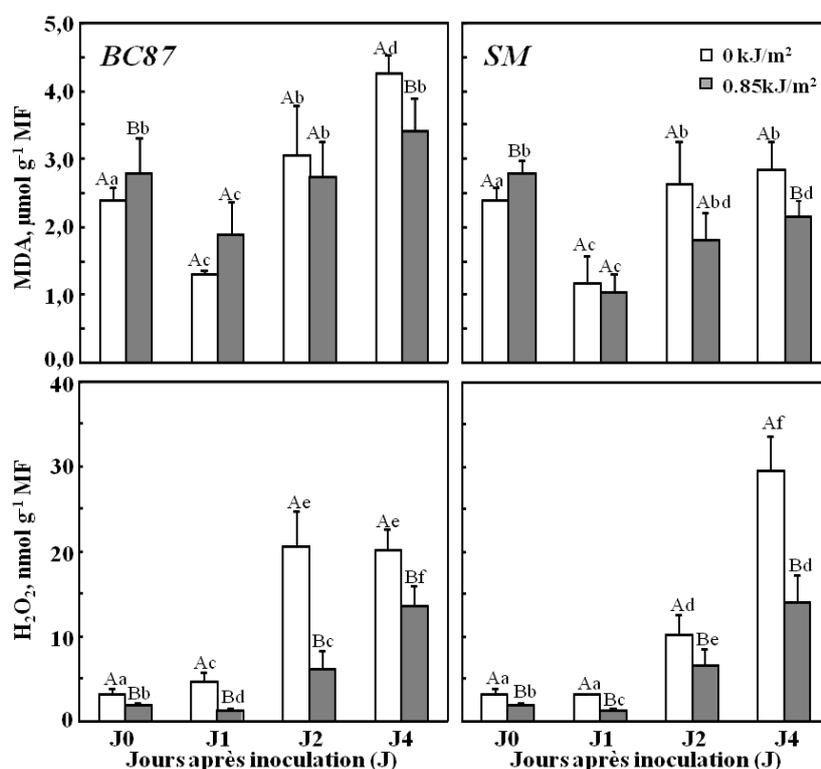


Figure 5.8. Variations en fonction du temps des teneurs en MDA et en H₂O₂ chez les laitues romaines prétraitées ou non avec des UV-C puis inoculées avec du mycélium de *Botrytis cinerea* (BC87) ou celui de *Sclerotinia minor* (SM). Moyennes de 5 répétitions et intervalles de sécurité au seuil de 5 %. Les lettres accolées aux histogrammes correspondent aux résultats des tests statistiques effectués pour l'analyse des différences dues aux deux facteurs, «traitement» (lettres majuscules) et «temps» (lettres minuscules). La même lettre indique l'absence de différences significatives.

4. Discussion

Le développement des champignons dépend des pratiques culturales et des conditions atmosphériques. Le travail présenté dans ce chapitre a un double objectif : i) choisir la dose d'azote qui garantit à la plante une meilleure résistance à *Botrytis cinrea* (BC87) et à *Sclerotinia minor* (SM) et ii) étudier l'effet de la dose d'UV-C choisie au chapitre III sur la réponse des laitues romaines à ces deux champignons.

Pour la première partie de ce travail, des mesures hebdomadaires de paramètres de la fluorescence chlorophyllienne, à l'aide d'un Handy PEA, ont montré un niveau bas de l'indice de performance photosynthétique (PI) chez les plantes se développant sur milieu nutritif additionné de 2 mM d'azote. Cette diminution apparaît aussi au niveau des différentes composantes du PI, à savoir $(1-V_j)/V_j$ (transfert d' e^- par photon piégé), RC/Abs (concentration en centres réactionnels actifs) et F_v/F_0 (rendement quantique de la photochimie primaire). Toutefois, le rendement quantique maximal du PSII, estimé par le rapport F_v/F_m , est resté invariable et proche de 0.84 chez les plantes issues des trois modalités. Ce rapport renseigne sur le taux de réduction du pool des plastoquinones (PQ) et permet de rendre compte des stress affectant le PSII (Srivastava et al, 1997). De ce fait, la stabilité des valeurs enregistrées chez les plantes issues des 3 régimes azotés plaide en faveur d'une absence de stress touchant le PSII dans les feuilles de laitue. Ce constat est appuyé par les analyses des pigments chlorophylliens et en caroténoïdes, dont les teneurs foliaires ont subi une baisse en réponse à la faible dose d'azote dans le milieu nutritif. En dépit de cette altération du métabolisme des pigments photosynthétiques, aucun symptôme visuel ne s'est manifesté sur ces feuilles. De plus, les teneurs foliaires en malondihaldéhyde et en peroxyde d'hydrogène, indicateurs fiables de l'état de stress (Vlikova et al, 2000), n'ont subi que de très faibles variations en réponse à la baisse du régime azoté (2 mM).

Par ailleurs, la laitue est bien connue par sa grande capacité à accumuler le nitrate dans ses feuilles, ce qui pourrait affecter la santé humaine étant donné que ce nutriment est considéré comme un précurseur possible de nitrosamines cancérigènes (Addiscott, 2006; Cometti & Furlani, 2009). De ce fait, le statut azoté

de ces organes, marqué par une baisse des teneurs en azote total et en nitrate en réponse au régime appauvri en azote (2 mM), justifie le choix d'une faible dose d'azote dans le milieu de culture de la laitue. De plus, il est bien établi qu'un statut bas en azote est associé à un enrichissement en métabolites secondaires (Lecompte *et al.*, 2012). En accord avec cette affirmation, nos résultats ont également montré que l'appauvrissement du milieu nutritif en azote (2mM) a conduit à un enrichissement des feuilles en polyphénols totaux, ce qui constitue aussi un avantage nutritionnel pour la santé humaine. En effet, le contenu en polyphénols, dont les propriétés antioxydantes peuvent être recherchées dans une démarche d'amélioration de la qualité nutritionnelle, baisse significativement à mesure que l'on augmente la fertilisation azotée (Coria-Cayupan *et al.*, 2009).

Enfin, nos résultats ont bien mis en évidence une diminution de la sensibilité de la laitue romaine aux deux champignons étudiés en réponse à la diminution de la concentration d'azote dans le milieu. Ces résultats sont conformes à ceux de Navarette *et al.* (2010), qui ont prouvé que l'excès d'azote induit une sensibilité de la laitue vis-à-vis de *Botrytis cinerea* et de *Sclerotinia sclerotirium*. De faibles niveaux de nutrition azotée seraient donc susceptibles de réduire la sévérité des dommages causés par les deux champignons pathogènes sur les salades.

Cependant, d'autres auteurs ont bien observé, sur la tomate, des réactions opposées entre des souches de *Botrytis cinerea* agressives, défavorisées par de fortes teneurs en azote dans la plante, et des souches peu agressives, favorisées par ces teneurs (Lecompte *et al.*, 2010). Hobbs et Waters (1964) ont aussi rapporté des résultats opposés sur des fleurs de chrysanthème en vertu de ces conditions. De même, en 1965, Verhoeff a constaté une diminution de la sensibilité des plantes de tomate à la moisissure grise quand elles ont été cultivées sur sol ayant de fortes concentrations en azote. De son côté, Sol (1967) a constaté que les plantes de *Vicia faba* croissant sur milieu ammoniacal sont plus sensibles à la pourriture grise que celles alimentées avec de l'azote nitrique. Dans d'autres expériences, la nature de la source d'azote s'est révélée sans effet sur la sensibilité des aubergines ou du poivre à la pourriture grise. En revanche, une plus grande proportion de nitrate

dans l'engrais est associée à une diminution de l'incidence de la maladie dans les plants de concombre (Elad et al, 1993).

Au terme de cette première partie, la dose de 2 mM d'azote est retenue pour la suite de ce travail. Cette dose n'altère ni l'aspect visuel des feuilles de la laitue romaine, ni son fonctionnement photosynthétique (fluorescence et pigments), signalant donc l'absence d'un état de stress. Par ailleurs, cette dose d'azote de 2mM a permis aux feuilles d'acquérir une meilleure résistance contre les deux champignons testés dans cette étude, associée à leur enrichissement en polyphénols totaux.

Par ailleurs, l'effet des rayonnements UV-C sur la résistance des végétaux aux champignons au cours de la culture ou pendant le stockage a fait l'objet de plusieurs études. Dans le présent chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets des rayonnements UV-C sur cet aspect de résistance aux champignons, mais seulement au cours du stockage. Sur ce sujet, nos résultats ont montré une résistance accrue de la laitue romaine à l'inoculation avec BC87 ou SM, lorsque celle-ci est précédée par une exposition de ses feuilles à une dose d'UV-C de 0.85 kJ.m⁻². Cette résistance acquise suite à l'irradiation aux UV-C est aussi bien observée chez d'autres espèces végétales. En effet, exposée à une dose d'UV-C de 3.7kJ/m², la tomate au stade vert acquiert une résistance vis-à-vis du Botrytis au cours du stockage (Charles et al, 2008). Ce comportement est lié à l'accumulation de la rishitine, phytoalexine propre à la tomate, à des concentrations inhibitrices du pathogène chez cette espèce. Il est aussi mis en évidence que l'exposition des tomates vertes aux UV-C retarde la maturation entraînant donc un ralentissement de la dégradation des chlorophylles associé à un renforcement de la résistance des tomates à *Botrytis cinerea*. D'autres chercheurs ont aussi montré que la résistance des agrumes matures au *Penicillium digitatum* Sacc (pourriture verte) est renforcée suite à l'irradiation aux UV-C et ce en augmentant la synthèse de la scarpone dans l'épicarpe du fruit (Rodov et al, 1992).

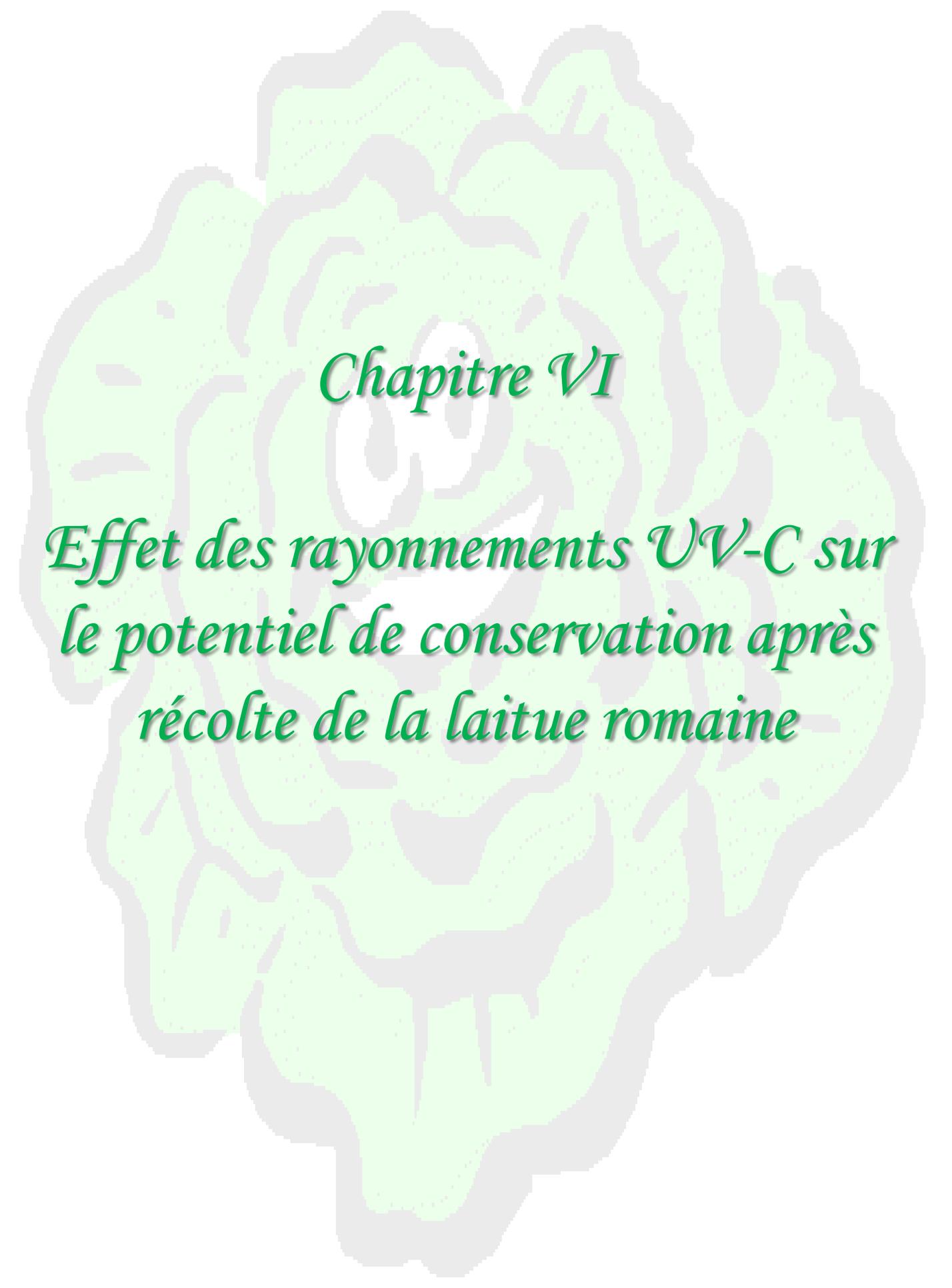
Nos résultats ont également révélé que cette résistance accrue aux deux champignons, suite à l'irradiation aux UV-C, pourrait être due à l'enrichissement en pigments photosynthétiques et, surtout, en caroténoïdes.

La diminution de la sensibilité acquise suite à l'irradiation avec les UV-C peut être la conséquence d'une accumulation plus importante des polyphénols totaux. Cette observation était bien décrite aussi par Charles et al (2008), où ils ont bien mis en évidence que les UV-C induisent l'accumulation des composés phénoliques, ce qui entraîne la formation d'une barrière biochimique formée par des lignines et des subérines empêchant alors la propagation du champignon, *Botrytis cinerea*.

L'état de stress oxydatif est aussi diagnostiqué chez les feuilles des laitues romaines en réponse aux deux champignons *Botrytis cinerea* (BC87) et *sclerotinia minor* (SM). Il est ainsi bien mis en évidence que le stress est atténué suite à un traitement par des rayonnements UV-C, qui semblent protéger les systèmes membranaires contre la peroxydation lipidique.

5. Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre, on s'est intéressé à l'étude de l'effet de la fertilisation azotée sur la résistance de la laitue romaine var. *Claudius* à BC87 et SM afin de choisir la dose d'azote qui lui garantit une meilleure résistance à ces deux champignons. Pour ce faire, trois lots de laitue romaine var *Claudius* ont été cultivés en présence de 3 concentrations d'azote : 2, 10 et 20 mM. L'effet de la dose de 2mM est ensuite étudié sur le développement de ces deux champignons sur la laitue romaine. Nos résultats suggèrent que la carence en azote dans le milieu nutritif confère à la laitue romaine une meilleure résistance BC87 et à SM. En outre, l'exposition des laitues romaines à la dose d'UV-C de 0.85 kJ.m⁻², choisie par les résultats du troisième chapitre, leur a permis de mieux résister à ces deux champignons pathogènes. Cette résistance est bien attestée par les faibles teneurs de leurs feuilles en MDA et en H₂O₂, par le maintien de leur statut en pigments chlorophylliens à des niveaux compatibles avec le métabolisme photosynthétique au cours du stockage et par leur enrichissement en caroténoïdes. Elle est également associée à une meilleure production de polyphénols totaux en conditions d'un faible apport d'azote.



Chapitre VI

*Effet des rayonnements UV-C sur
le potentiel de conservation après
récolte de la laitue romaine*

CHAPITRE 6

EFFET DES RAYONNEMENTS UV-C SUR LE POTENTIEL DE CONSERVATION APRES RECOLTE DE LA LAITUE ROMAINE

Résumé. *Lactuca sativa L. est une plante herbacée annuelle appartenant à la famille des Astéracées. Les laitues romaines se consomment en 4^{ème} gamme et ce terme désigne les produits végétaux frais, commercialisés prêts à l'emploi, c'est-à-dire lavés, épluchés et découpés. Plusieurs travaux ont essayé d'améliorer le potentiel de conservation après récolte de ce produit. Le but de ce travail est d'étudier l'effet d'une faible dose d'UV-C sur le potentiel de conservation après récolte de la laitue Romaine. A la récolte, une moitié des plantes est exposée aux UV-C pendant une minute obtenant la dose de 0,85 kJ.m⁻². Vingt-quatre heures après, les feuilles externes, provenant des deux modalités, ont été lavées, épluchées, découpées et conservées dans des bocaux de 1.5 L puis stockées dans une armoire réfrigérée à 6°C et à l'obscurité pendant 14 jours. Des prélèvements des feuilles ont été effectués aux jours : J0, J2, J3, J7 et J14 pour effectuer des dosages des chlorophylles, des caroténoïdes et de la vitamine C. L'analyse des résultats montre que l'exposition des laitues aux UV-C a ralenti la dégradation des pigments photosynthétiques au cours du stockage et a renforcé les contenus en vitamine C et en polyphénols totaux de leurs feuilles.*

1.Introduction

La laitue romaine est souvent consommée en produit de 4^{ème} gamme. Ce terme désigne les produits prêts à être consommés. Toutefois, au cours du stockage, ces produits perdent leur valeur nutritionnelle. Il est aussi admis que le problème technique posé par la quatrième gamme tient au fait que l'épluchage et la découpe plus ou moins fine amènent d'importantes perturbations dans le métabolisme du végétal et rendent le produit plus périssable. Par ailleurs, une durée de vie commerciale suffisante ne peut donc être obtenue par la simple réfrigération. Et c'est dans ce contexte que certains auteurs du domaine ont essayé de trouver d'autres alternatives, et ce dans le but d'améliorer la qualité nutritionnelle et la durée de vie des produits végétaux au cours du stockage. Donc il a été bien démontré que la brumisation à froid améliore la qualité de la fraise en post récolte (Allais et al, 2009), le prétraitement thermique de la mandarine après récolte maintient sa qualité pendant le stockage et le marketing (Hong et al, 2007), la salinité améliore l'activité antioxydante chez la laitue romaine (Chisari et al, 2009)

,les rayonnements gamma maintiennent la qualité de la laitue romaine au cours du stockage (Zhang et al, 2004) et, enfin, les rayonnements UV-C ont bien amélioré la qualité nutritionnelle de la tomate au cours du stockage (Kim et al, 2008).

L'originalité du travail présenté dans ce 6^{ème} chapitre réside dans le fait que c'est le premier dans son genre qui étudie l'effet des rayonnements UV-C sur le potentiel de conservation après récolte de la laitue romaine.

2. Rappel du protocole expérimental

Les laitues romaines sont cultivées auprès du GRAB jusqu'à l'âge de 80 jours. A la récolte, elles sont réparties en deux lots, un lot témoin ne recevant pas de radiations UV-C et un lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻² (dose non délétère selon les résultats du 3^{ème} chapitre). Vingt quatre heures après l'exposition aux UV-C, les laitues romaines des deux lots sont transformées en produits 4^{ème} gamme en passant par le parage, le lavage, l'essorage et le conditionnement.

Des prélèvements de feuilles sont ensuite effectués en J0 (avant conditionnement), J2 (48 heures après conditionnement), J3 (72 heures après conditionnement), J7 (168 heures après conditionnement) et en J14 (336 heures après conditionnement) pour analyser l'aspect visuel des feuilles, mesurer les paramètres photosynthétiques à l'aide de l'Handy PEA, mesurer l'intensité respiratoire, doser la chlorophylle totale, et déterminer les indicateurs du stress oxydatif (MDA et H₂O₂), les polyphénols totaux et la vitamine C.

3. Résultats

3.1. Effet des UV-C sur l'aspect visuel des feuilles au cours du stockage

Des feuilles des deux modalités, témoin ne recevant pas de radiation UV-C et exposé à une dose de 0.85kJ.m⁻², ont été prélevées les jours J0, J2 J3, J7 et J14. Les notes attribuées aux différentes feuilles prélevées varient entre 0 et 3. La figure 6.1 montre l'effet des UV-C sur l'aspect visuel de ces organes au cours du stockage. L'analyse de cette figure montre bien, qu'exposées aux UV-C, les feuilles de la laitue romaine présentent, tout au long de la période de stockage de 14 jours, un aspect visuel bien meilleur que celui des feuilles du lot témoin n'ayant pas reçu de radiations UV-C.

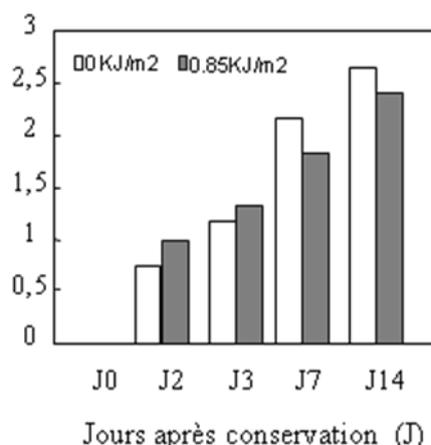


Figure 6.1. Evolution de l'aspect visuel des feuilles des deux lots de romaine, lot témoin et lot traité, et ce au cours des 14 jours du stockage.

3.2. Effet des UVC sur l'indice de performance photosynthétique (PI)

L'indice de performance photosynthétique (PI) est déterminé à l'aide de l'Handy PEA chez les deux modalités de laitue romaine et ce durant les 14 jours du stockage. Les résultats, illustrés sur la figure 6.2, montrent, d'une part, une diminution significative des valeurs du PI au cours du stockage, chez les deux lots de laitue romaine. En effet, ces valeurs passent de 1.8 en J0 à 1.3 en J14 et de 1.84 en J0 à 1.4 en J14, respectivement chez le lot témoin et le lot traité. D'autre part, les différences entre les valeurs des deux lots ne se montrent significatives qu'à partir du J2 et se maintiennent en J3. (Fig. 6.2).

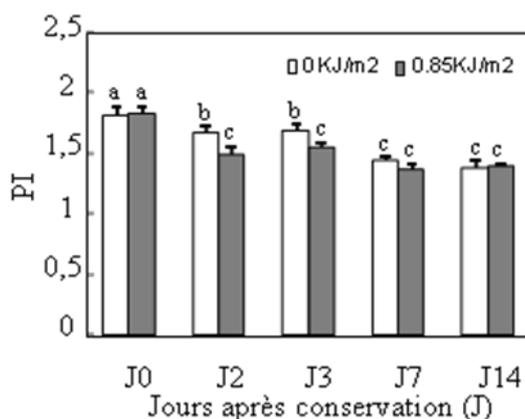


Figure 6.2. Evolution de l'indice de performance photosynthétique (PI) chez la laitue Romaine issue des deux lots, le lot témoin n'ayant pas reçu de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJm⁻². Moyennes de 30 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements

3.3. Effet des UV-C sur l'intensité respiratoire

L'intensité respiratoire est bien mesurée en J0, J7 et J14 chez les deux lots de laitue romaine. L'analyse des résultats montre que l'intensité respiratoire, exprimée en mmol/h/kg, est toujours plus élevée chez le lot de plantes traitées que chez celles du témoin, et ce 24 heures après l'exposition aux UV-C (Fig. 6.3). Toutefois, et tout au long de la période de stockage, on assiste à une diminution significative de l'intensité respiratoire chez le témoin comme chez le traité, mais les valeurs enregistrées chez les plantes du second lot sont maintenues à des niveaux significativement plus élevés. Ces résultats confirment donc que les radiations UV-C ont induit une altération du rythme respiratoire chez la laitue romaine au cours du stockage.

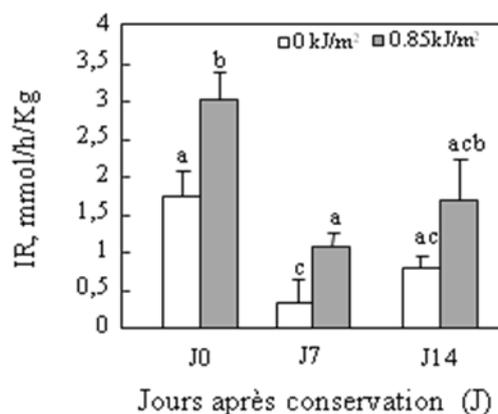


Figure 6.3. Evolution de l'intensité respiratoire (IR) chez la laitue Romaine issue des deux lots, lot témoin ne recevant pas de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJm⁻² Moyennes de 3 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements

3.4. Effet des UV-C sur les teneurs en MDA et en H₂O₂

Les teneurs en MDA (malondialdéhyde) et en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), déterminées aussi chez les deux lots de laitue romaine au cours des 14 jours du stockage, sont représentées respectivement sur les figures 6.4 et 6.5. Les valeurs de MDA enregistrées ne montrent pas de différences significatives entre les deux lots, autrement dit les radiations UV-C appliquées au cours du stockage n'ont pas altéré l'état oxydatif des plantes (Fig. 6.4). Pour ce qui est du H₂O₂, l'analyse

statistique montre aussi que les différences sont majoritairement non significatives entre les différents traitements et même entre les jours.

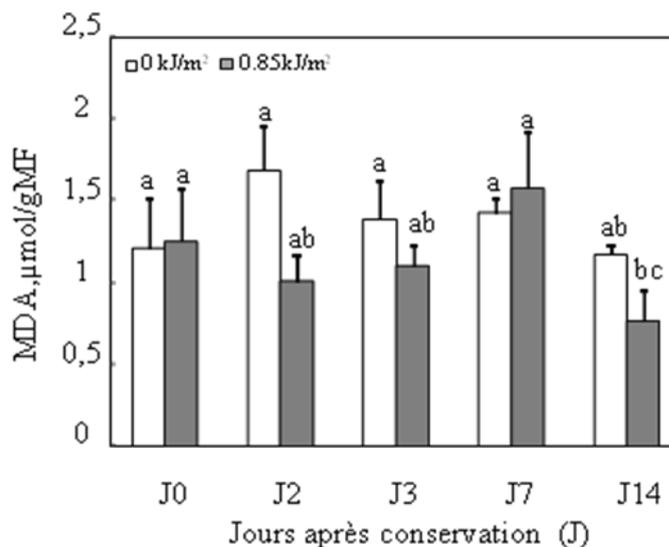


Figure 6.4. Evolution de la teneur en MDA dans des feuilles chez la laitue Romaine issue des deux lots, lot témoin ne recevant pas de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJm⁻² Moyennes de 6 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

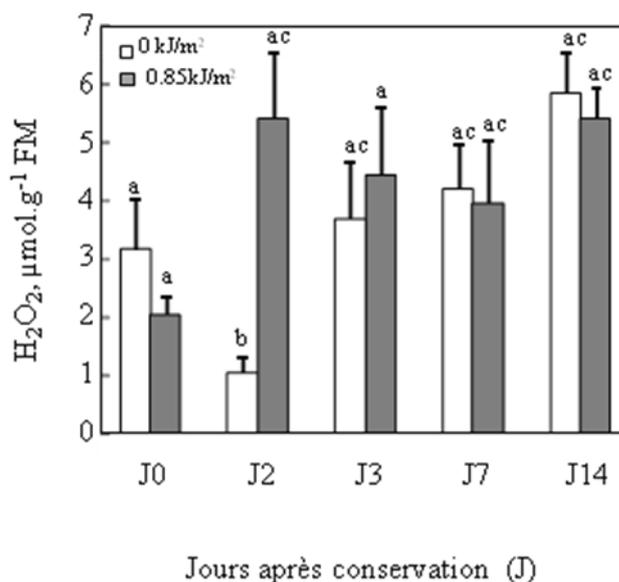


Figure 6.5. Evolution de la teneur en H₂O₂ dans des feuilles chez la laitue Romaine issue des deux lots, lot témoin ne recevant pas de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJm⁻² Moyennes de 6 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

Ces résultats suggèrent que la dose d'UV-C appliquée n'a pas induit de stress oxydant dans les feuilles de la plante confirmant donc le bon choix de la dose fait au chapitre 3 de ce manuscrit.

3.5. Effet des UV-C sur les teneurs en chlorophylle totale

Les teneurs en chlorophylle totale ont été déterminées chez les deux lots de romaine, le lot témoin non exposé aux radiations UV-C et le lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m^{-2} . L'examen des résultats (Fig. 6.6) montre qu'au jour J0 les valeurs enregistrées chez les deux lots de plantes sont statistiquement comparables. C'est aux jours J2 (48 heures après l'exposition aux UV-C) et J14 (à la fin de la période de stockage) que les différences entre ces valeurs deviennent significatives. Les variations en fonction du temps révèlent une baisse des teneurs en chlorophylles dans les deux lots, indiquant une dégradation de ces pigments. Toutefois, cette dégradation semble moins accentuée chez le lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m^{-2} . Autrement dit, les UV-C ont ralenti la dégradation des pigments au cours du stockage, ce qui a eu pour conséquence de retarder la maturation des laitues et de prolonger donc leur durée de vie au cours du stockage.

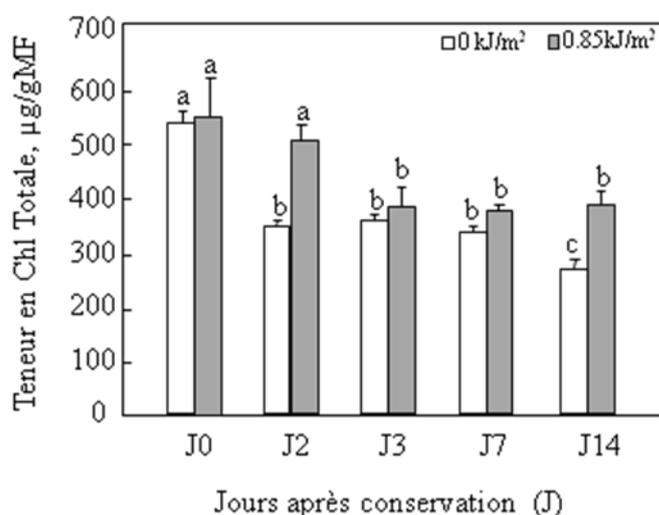


Figure 6.6. Evolution de la teneur en chlorophylle totale dans les feuilles chez la laitue Romaine issues des deux lots, lot témoin ne recevant pas de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJ.m^{-2} . Moyennes de 9 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

3.6. Effet des UV-C sur les teneurs en Vitamine C

La figure 6.7 montre les teneurs en Vitamine C déterminées chez les deux lots de laitue romaine en J0, J2, J3, J7 et J14. L'analyse de cette figure révèle bien que, suite à l'exposition des laitues à une dose de 0.85 kJ.m^{-2} , les teneurs en vitamine C ont subi une diminution significative, en fonction du temps, dans les feuilles de ces deux lots. Il apparaît ainsi que la vitamine C s'est dégradée au cours du stockage, chez les deux lots de laitue romaine. Toutefois, cette dégradation est beaucoup moins accentuée chez le lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m^{-2} . Ceci est attesté par les différences très significatives enregistrées entre les valeurs du lot témoin et celles du lot traité et qui se sont maintenues tout au long des 14 jours du stockage. Ces analyses permettent de confirmer que l'exposition des laitues romaine à la dose de 0.85 kJ.m^{-2} renforce, d'une part, les teneurs en Vitamine C et retarde, d'autre part, sa dégradation au cours du temps du stockage.

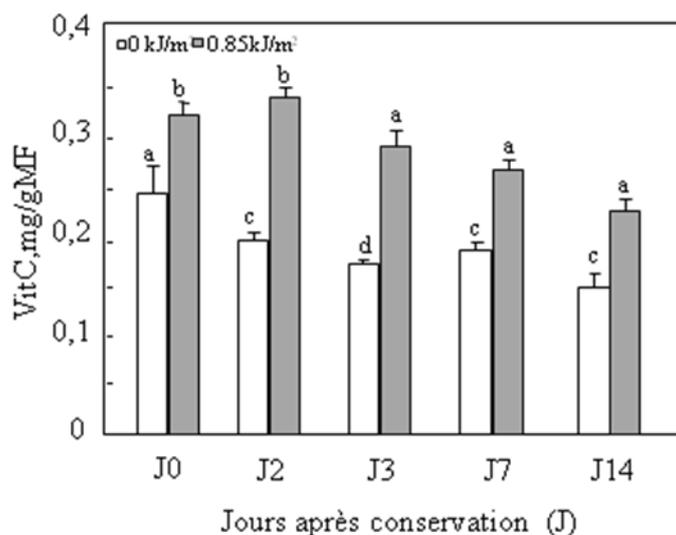


Figure 6.7. Evolution de la teneur en vitamine C dans les feuilles chez la laitue Romaine issue des deux lots, lot témoin ne recevant pas de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJ.m^{-2} . Moyennes de 6 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

3.7. Effet des UV-C sur les teneurs en caroténoïdes au cours du stockage

Les niveaux de caroténoïdes ont été déterminés dans les deux lots de laitue pendant les 14 jours de stockage. L'analyse statistique montre que les niveaux de caroténoïdes étaient

plus élevés dans le lot exposé au rayonnement UV-C. Cette augmentation de caroténoïdes en réponse à UV-C garantie à la laitue romaine une meilleure qualité nutritionnelle. (Fig 6.8).

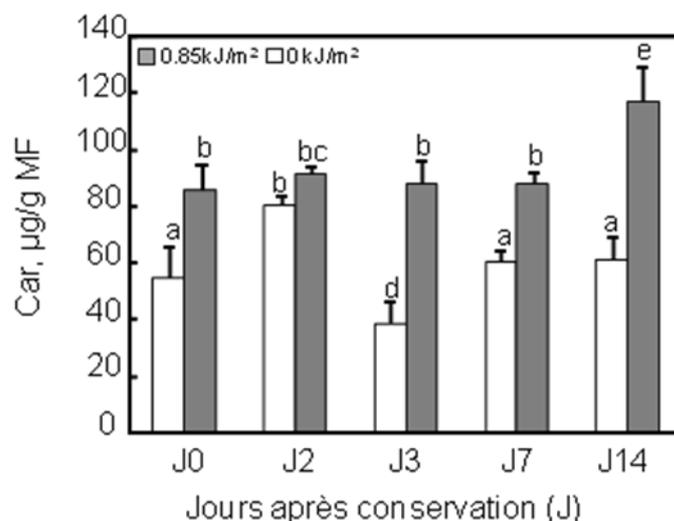


Figure 6.8. Evolution des teneurs en caroténoïdes dans des feuilles chez la laitue Romaine issue des deux lots, lot témoin ne recevant pas de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJm⁻² Moyennes de 3 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

3.8. Effet des UV-C sur les teneurs en polyphénols au cours du stockage

Les teneurs en polyphénols ont été déterminées chez les deux lots de laitue romaine, le lot témoin ne recevant pas de radiations UV-C et le lot traité exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻² et ce en J0, J2, J3, J7 et J14. L'analyse de la figure 6.9 indique qu'au cours du stockage les variations de ces teneurs ont décrit une évolution croissante en fonction du temps, mais seulement chez le lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻². En effet, les valeurs sont passées d'un niveau moyen de 7.96 mg.100 g⁻¹ MF enregistré au jour J0 à un niveau presque double, de 13.4 mg.100 g⁻¹ MF, au jour J14. En revanche, pour ce qui est des valeurs du second lot témoin, après avoir subi une augmentation significative au jour J2, elles se sont stabilisées par la suite à un niveau inférieur à celui enregistré au jour J0.

Ces résultats suggèrent que l'exposition de la laitue romaine à la dose 0.85 kJ.m⁻² a renforcé la biosynthèse des polyphénols au cours du stockage, ce qui leur

a conféré une valeur nutritionnelle plus importante que les plantes du lot non exposé aux UV-C.

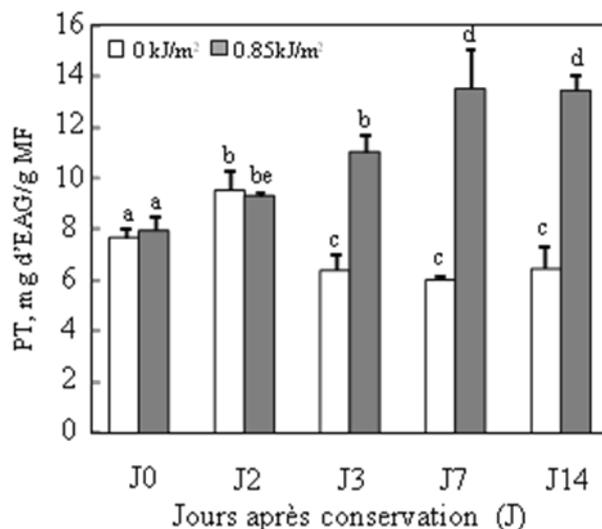


Figure 6.9. Evolution des teneurs en polyphénols totaux dans des feuilles chez la laitue Romaine issue des deux lots, lot témoin ne recevant pas de radiation UV-C et le lot traité à une dose de 0.85 kJm⁻² Moyennes de 3 répétitions. Les différences entre les valeurs des différents traitements ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements.

4. Discussion

La laitue romaine est consommée en produit 4^{ème} gamme et ce terme désigne les produits végétaux frais, commercialisés prêts à l'emploi, c'est-à-dire lavés, épluchés et découpés. Cependant, le problème technique posé par la quatrième gamme tient au fait que l'épluchage et la découpe plus ou moins fine amènent d'importantes perturbations dans le métabolisme du végétal et rendent le produit plus périssable. Ceci a incité les chercheurs à trouver d'autres alternatives afin de d'améliorer la qualité nutritionnelle et la durée de vie des produits végétaux au cours du stockage. L'étude présentée dans ce chapitre a pour objectif d'étudier l'effet de la dose d'UV-C choisie dans le chapitre 3 sur le potentiel de conservation de la laitue romaine.

L'analyse des résultats a bien démontré que, suite à l'exposition aux UV-C des laitues romaines, les feuilles ont présenté un aspect moins dégradé que les feuilles n'ayant pas exposées aux radiations UV-C.

L'intensité respiratoire chez les deux lots témoin et traité a été perturbée au cours du stockage, où on a bien assisté à une baisse du rythme respiratoire. Ce résultat est en accord avec ceux de Costa et *al.* (2005). En effet, en appliquant les doses de 4, 7, 10 et 14 kJ.m⁻² sur *Brassica oleracea* L. var. Italica, cv Cicco, ces auteurs ont noté une diminution de la respiration. Cette même observation était aussi soulignée par Alergia et *al.* (2012), qui ont noté une altération de la respiration chez la carotte cv. Nantes suite à son exposition à une dose d'UV-C de 0.78 kJ.m⁻².

Nos résultats nous ont permis de constater aussi une amélioration du statut en vitamine C des feuilles de laitue due probablement à un retard de sa dégradation au cours du stockage. Ce résultat est bien observé chez *Lycopersicon esculentum* cv. Durita, où l'application des doses de 3.2, 9.6 et 19.2 kJ.m⁻² a retardé la dégradation de la vitamine C même après 7 jours de stockage à une température de 4 à 6 °C (Kim et *al.*, 2008). Toutefois, certains auteurs du domaine ont bien observé une diminution des contenus en vitamine C au cours du stockage chez *Ananas comosus* suite à une exposition de 60 et 90 secondes aux radiations UV-C (Yong-Gui Pan et *al.*, 2012).

Outre ces composés, les polyphénols totaux ont aussi subi des variations similaires dans la laitue romaine suite à son exposition à des UV-C. En effet, un enrichissement de ses feuilles en ces composés est observé au cours des 14 jours de stockage. Ce même résultat était aussi rapporté par Gonz'alez-Aguilar et *al.* (2007). En effet, suite à l'application des doses de 2.46 et 4.93 kJ.m⁻² sur *Mangifera indica* cv "Haden, une accumulation de polyphénols et de flavonoïdes totaux est notée au cours du stockage. Par ailleurs, l'exposition à une dose de 4.1 kJ.m⁻² a induit une surexpression de la phénylalanine ammonialyase associée à une surproduction des polyphénols totaux chez *Fragaria×ananassa* Duch., cv. Toyonoka (Pombo et *al.*, 2011). Selon les travaux de Kim et *al.* (2008), l'application de doses croissantes d'UV-C de 3.2, 9.6 et 19.2 kJ.m⁻² sur *Lycopersicom esculentum* cv Durita a entraîné une augmentation des teneurs en polyphénols totaux au cours du stockage. L'induction de l'accumulation des composés phénoliques et la formation d'une barrière biochimique contenant des lignines et les subérines ont été rapportées aussi par d'autres auteurs (Charles et *al.*, 2008). En revanche, d'autres chercheurs,

comme Costa et *al.* (2005), ont observé, par contre, une diminution des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux chez *Brassica oleracea* L var Italica, cv Cicco suite à son exposition aux doses d'UV-C de 4, 7, 10 et 14 kJ.m⁻².

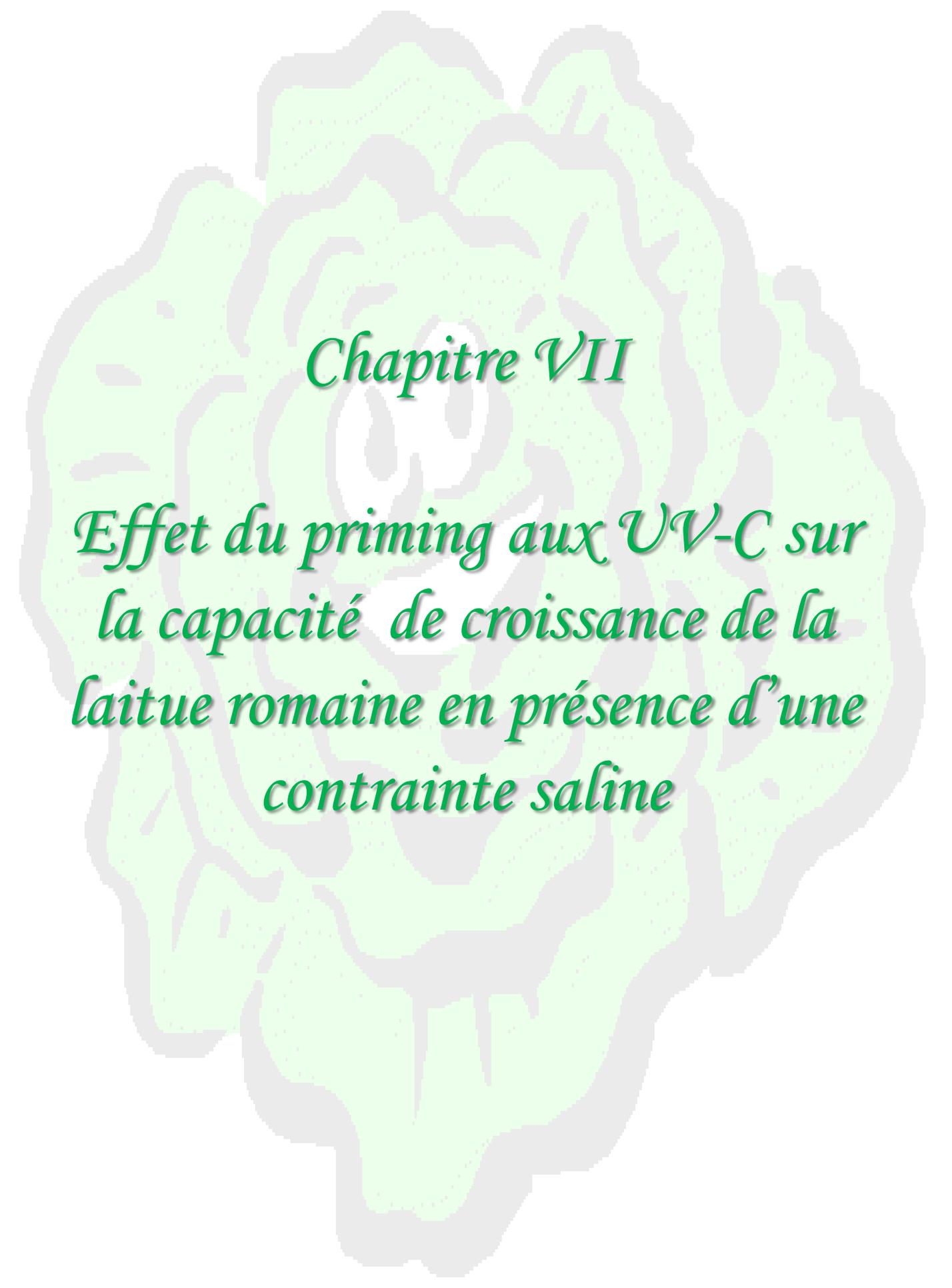
Nos résultats ont bien montré que l'exposition à la dose de 0.85 kJ.m⁻² a également induit un retard de la dégradation de la chlorophylle totale entraînant donc un retard de la maturation du végétal et favorisant donc une vie de conservation encore plus prolongée que celle du témoin n'ayant pas reçu de radiations UV-C. Ce résultat est bien confirmé par Costa et *al.* (2005) qui ont remarqué que la dose de 10 kJ.m⁻² a retardé la dégradation de la chlorophylle à une température de stockage de 20 °C chez *Brassica oleracea* L. var. Italica, cv Cicco. Par ailleurs, des plantes de *Banana* (*Musa* spp) exposées à des doses de 0.03 kJ.m⁻² ont manifesté un brunissement et une dégradation des chlorophylles de leurs feuilles, et ce en inhibant la chlorophyllase (Pongprasert et *al.*, 2011). En outre, Charles et *al.* (2008), ont démontré qu'une dose de 3.7 kJ.m⁻² a retardé la maturation des fruits et par suite la dégradation de la chlorophylle. Cependant, une diminution des teneurs en chlorophylles est trouvée suite à l'exposition d'*Artemisia annua* à une dose d'UV-C de 5.7 kJ.m⁻² (Rashmi Raie et *al.*, 2011).

5. Conclusion

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet de la dose d'UV-C, choisie lors du troisième chapitre, sur le potentiel de conservation de la laitue romaine var *claudius* après récolte. Cette expérience était réalisée en collaboration avec le GRAB d'Avignon. Afin de réaliser cet objectif, des laitues romaines Var *Claudius* ont été récoltées et réparties en 2 lots : un lot témoin ne recevant de radiations UV-C et un lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻². Les plantes issues des deux lots ont été transformées en produits 4^{ème} gamme en passant par le parage, le lavage, l'essorage et le conditionnement. L'analyse des différents paramètres étudiés à savoir, l'aspect visuel, l'indice de performance photosynthétique, l'intensité respiratoire et les teneurs en chlorophylle totale, en Vitamine C, en polyphénols totaux et en indicateurs du stress oxydatif a montré que l'exposition des laitues

romaines à la dose 0.85 kJ.m^{-2} a conféré à la plante un meilleur aspect visuel, a renforcé les teneurs en polyphénols totaux, et a retardé la dégradation de la chlorophylle totale et de la Vitamine C.

L'enrichissement en polyphénols totaux a amélioré la valeur nutritionnelle de la laitue romaine. En outre, le retard de la dégradation de la chlorophylle totale garantit à la laitue une durée de vie prolongée puisque ce retard de dégradation engendre un retard de maturation du végétal étudié. Le maintien de la vitamine C au cours du stockage suite à l'exposition aux UV-C garantit à la plante une meilleure qualité nutritionnelle.



Chapitre VII

*Effet du priming aux UV-C sur
la capacité de croissance de la
laitue romaine en présence d'une
contrainte saline*

CHAPITRE 7

EFFET DU PRIMING AUX UV-C SUR LA CAPACITE DE CROISSANCE DE LA LAITUE ROMAINE EN PRESENCE D'UNE CONTRAINTE SALINE

Résumé. Les graines de la laitue romaine ont été réparties en 3 lots soumis à différentes doses d'UV-C : 0, 0,85 et 3,42 kJ.m⁻². Les plantules issues des graines prétraitées aux UV-C (P) et non prétraitées (NP) ont été cultivées sur milieu hydroponique additionné ou non de NaCl 100 mM. Après 21 jours de traitement, la biomasse des racines et des feuilles, l'élongation des racines, le nombre de feuilles, et la surface des feuilles ont été mesurés. L'accumulation d'ions a été aussi déterminée dans les racines et les feuilles. Les contenus en polyphénols et en flavonoïdes, les activités antioxydante totale et antiradicalaire ont été analysées dans les feuilles de laitue ainsi traitées. Le sel restreint la biomasse d'une manière plus marquée dans les racines que dans les feuilles, et ce en diminuant l'allongement des racines ainsi que le nombre, l'expansion et l'épaisseur des feuilles. Cette baisse de la croissance s'est accompagnée d'une restriction de l'hydratation des tissus, d'une diminution de l'absorption du potassium (K⁺), ainsi qu'une augmentation des niveaux de Na⁺ dans tous les organes. Ces effets ont été partiellement atténués dans les plantes issues de semences prétraitées aux UV-C, mais d'une façon plus prononcée avec la dose d'UV-C 0,85 que la dose 3,42 kJ.m⁻². Les analyses ont montré une augmentation de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes et de l'activité antioxydante totale dans les feuilles des plantes issues des graines prétraitées aux UV-C. Les résultats suggèrent que les plantes provenant de graines prétraitées aux UV-C ont un meilleur potentiel d'adaptation à la contrainte saline.

1.Introduction

Le priming, ou l'amorçage en botanique et en agriculture, est une forme de préparation de la plantation des semences dans laquelle les graines sont préalablement soumises à un prétraitement. En général, la plupart des graines utilisées en expérimentation ont montré un avantage global sur les semences qui ne sont pas prétraitées (Sedghiet et al, 2010).

En général, l'amorçage des graines induit une germination plus rapide et plus uniforme lorsque les semences prétraitées sont ensuite plantées (McDonald, 2000). La technique du priming a été souvent utilisée pour améliorer les performances de la germination des graines et la tolérance au stress des plantes en utilisant de l'eau,

des sels, des hormones, des vitamines et des EOR comme le H₂O₂ (Aboutalebian *et al.*, 2012 ; Abdollahi *et al.*, 2012 ; Mahmoudi *et al.*, 2012 ; Ghoohestani *et al.*, 2012).

Nous nous sommes proposés d'étudier, dans ce chapitre, l'effet du priming aux UV-C sur la capacité de la laitue romaine à croître dans un milieu salin.

2. Rappel du protocole expérimental

Les graines de laitue romaine sont réparties en trois lots, lot témoin n'ayant pas reçu de radiations UV-C, un lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻² et un troisième exposé à 3.42 kJ.m⁻². A l'âge de 28 jours, les plantes issues de chaque lot de graines, sont réparties en 2 lots. Le premier lot, servant de témoin, est irrigué avec la solution nutritive diluée 4 fois (solution T/4). Le second est irrigué avec la même solution, mais additionnée de NaCl 100 mM. Au terme de 15 jours de traitement, les plantes sont récoltées et séparées en feuilles et racines. Plusieurs paramètres sont déterminés avant (élongation racinaire, nombre de feuilles..) et après la récolte finale des plantes des deux traitements (masses de matière fraîche et sèche, surface foliaire, teneur en eau et teneurs en Na⁺, K⁺ des différents organes). Les racines sont auparavant rincées dans trois bains successifs à l'eau distillée froide, puis épongées entre deux bandes de papier filtre. Les produits des récoltes sont rapidement mis dans des sachets de papier aluminium préalablement tarés. Les sachets sont ensuite pesés avant et après dessiccation pendant 48 h dans une étuve à 70 °C, à l'aide d'une balance de précision au 1/10^{ème} de mg. Les masses de matière fraîche et sèche des différents organes ainsi que leurs teneurs en eau et en éléments minéraux (Na⁺ et K⁺) sont enfin déterminées.

La morphogenèse est suivie par des comptages du nombre des feuilles et de l'élongation racinaire à l'aide d'une règle graduée. La surface foliaire a été mesurée à l'aide du logiciel *Optimas*. Six plantes de chaque traitement sont récoltées et utilisées pour le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes, et pour la mesure de l'activité antioxydante totale et du pouvoir anti radicalaire.

Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un article, actuellement publié dans une revue internationale impactée.



Research article

Salt stress mitigation by seed priming with UV-C in lettuce plants: Growth, antioxidant activity and phenolic compounds



Chayma Ouhibi^{a, b, *}, Houneida Attia^a, Fedia Rebah^a, Najoua Msilini^a,
Mohamed Chebbi^a, Jawad Aarouf^b, Laurent Urban^b, Mokhtar Lachaal^a

^a Unité de Physiologie et Biochimie de la réponse des plantes aux contraintes abiotiques, Département de Biologie, FST, Université Tunis El Manar, 1068 Tunis, Tunisia

^b Laboratoire Physiologie des Fruits et Légumes (EA 4279), Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, Campus Agroparc, 301 Rue Baruch de Spinoza, 84916 Avignon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 February 2014

Accepted 23 July 2014

Available online 1 August 2014

Keywords:

Lactuca sativa L

Phenolic compounds

Salinity

UV-C priming

ABSTRACT

Seeds of *Lactuca sativa* L. 'Romaine' were subjected to priming treatments with UV-C radiation at 0.85 or 3.42 kJ m⁻². Seedlings obtained from both primed (Pr) and non-primed (NPr) seeds were grown in an hydroponic culture system supplemented with 0 (control) or 100 mM NaCl. After 21 days of NaCl treatment, root and leaf biomass, root lengths, leaf numbers, and leaf surface area were measured. Ions (Na⁺ and K⁺) accumulation was determined in roots and leaves. Total phenolic compound and flavonoid concentrations, as well as antioxidant and antiradical activities were measured in *L. sativa* leaves. Salt stress resulted in a lower increase in fresh weight of roots and leaves, which was more pronounced in roots than in leaves, due to reduced root elongation, leaf number and leaf expansion, as well as leaf thickness. The lower increase in fresh weight was accompanied by a restriction in tissue hydration and K⁺ ion uptake, as well as an increase in Na⁺ ion concentrations in all organs. These effects were mitigated in plants from the UV-C primed seeds. The mitigating effect of UV-C was more pronounced at 0.85 than at 3.42 kJ m⁻². Salt stress also resulted in an increase in total phenolic compounds and flavonoid concentrations and in the total antioxidant capacity in leaves. The highest diphenylpicrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging activity was found in the leaves of plants from both Pr seeds. Our results suggest that plants grown from seed primed by exposure to moderate UV-C radiation exhibited a higher tolerance to salinity stress.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Salinity affects plant growth via the osmotic stress induced by salt ions around the roots as well as by ion toxicity in leaves. Plant growth responses to salinity have two phases. The first phase is characterized by a decrease in the growth rate caused by salt ions outside the roots, (i.e. the so-called 'osmotic' response). The second phase typically involves an additional reduction in growth caused by toxic levels of salt ions within plants cells, i.e. the so-called 'salt-specific' response, (Munns, 2005). As a consequence of these primary effects, secondary effects such as oxidative damage and nutritional imbalance often occur (Zhu, 2001), which may also affect plant growth. Salinity is one of the major factors that affect

plant growth in Tunisia, where there is a wide variety of saline-sodic soils in depression and in the main sebkhas and chotts (Mtimet, 2001; Mezni et al., 2002). Moreover, in irrigated areas, the low quality of irrigation water charged with dissolved salts has resulted unfortunately in soil secondary salinization responsible for decline in productivity (Mtimet, 2001). Increased tolerance to salinity stress in crop plants, such as lettuce, is necessary in order to increase productivity in conditions of limited water supply and high salinity.

A recent study demonstrated that 'Romaine' lettuce (*Lactuca sativa* L) maintained a moderate growth rate after 2 days of exposure to NaCl concentrations (up to 1 M), but plants were stunted after 15 days of treatment with 200 mM NaCl (Kim et al., 2008). The results of Zapata et al. (2003) indicated a relatively high salt tolerance during seed germination in nine varieties of lettuce, since high concentrations of NaCl (150 mM) delayed germination, but generally did not substantially reduce the germination rate.

* Corresponding author. Tel.: +216 71 872 600; fax: +216 71 885 480.
E-mail address: chayma.ouhibi@gmail.com (C. Ouhibi).

Good seed germination is important in horticulture and agriculture. Uneven or poor germination, and subsequent heterogeneous seedling growth, can lead to financial losses, by reducing opportunities for mechanization, or by negatively impacting the selling price of the harvested produce (Ghiyasi et al., 2008).

Seed priming is a pre-sowing treatment that involves the exposure of seeds to low external water potential that limits hydration. Hydration remains sufficient to permit pre-germinative metabolic events, but is insufficient to allow radicle protrusion through the seed coat. This technique has become a common seed treatment that can increase the rate, percentage, and uniformity of seed germination or seedling emergence, mainly under unfavorable environmental conditions (Rozbeh et al., 2011). Nasri et al. (2011) reported that lettuce seeds priming with potassium nitrate (KNO_3) solution improve germination percentage, root and shoot length and seedling fresh weight of the seeds under salinity compared to non-primed seeds. In general, seed priming induces faster and more uniform germination over a broader temperature range when the primed seeds are subsequently planted (McDonald, 2000). This practice has been applied commercially to many crops to improve their germination rate and, in lettuce (*L sativa* L.), to alleviate thermo-inhibition (i.e. the failure of seeds to germinate when imbibed at high temperatures) by increasing the maximum temperature at which germination can occur (Gonai et al., 2004).

Ultraviolet (UV) light, although known for its deleterious effects on plants including DNA damage, loss of chloroplast function, and degradation of protein synthesis (Frohnmeyer and Staiger, 2003) has shown a promise mean to extend the shelf-life of fresh commodities. In recent studies, low doses of UV-C light (200–280 nm) were found to be beneficial by reducing the growth of microbial populations on fresh cut products (Marquenie et al., 2002; Allende et al., 2006; Fonseca and Rushing, 2006). Other studies have shown that UV-C can also be used to reduce chilling injury in pepper (Vicente et al., 2005), decay in strawberry (Pan et al., 2004), and senescence in broccoli florets (Costa et al., 2006) and in tomato fruit (Maharaj et al., 1999). Radiation hormesis is initiated in living organisms by a low dose of radiation hormetic such as ultraviolet light-C (UV-C), X-rays, and γ - rays (Luckey, 1991). Depending on the crop, research has shown that UV-C doses of 0.4–20 kJ m^{-2} are sublethal. However, at this range, some post-harvest fruit and vegetable commodities showed external damage as a result of radiation treatment (Stevens et al., 1996). It has been observed that moderate UV-C doses (4.06 and 8.14 kJ m^{-2}) were effective in delaying senescence and deterioration of fresh cut lettuce, although the surface of leaves became shinier and firmer (Allende and Artés, 2003). The use of two-sided UV-C radiation at 1.18, 2.37 or 7.11 kJ m^{-2} was effective for reducing the natural microflora of fresh-cut 'Red Oak Leaf' lettuce up to 10 days at 5 °C, although 7.11 kJ m^{-2} induced tissue softening and browning after 7 days at 5 °C (Allende and Artés, 2003).

Much evidence shows that UV-C radiation has strong biological effects. However, the potential to use UV-C on seeds to increase the salt tolerance of plants has not been examined so far, to our knowledge. The purpose of this study was to test the hypothesis that exposing lettuce seeds to UV-C radiation before germination would improve the tolerance of the resulting seedlings to salt stress after germination. Our strategy consisted on testing two levels of UV-C radiations (0.85 or 3.42 kJ m^{-2}). The former had been observed not to be harmful to lettuce plants, whereas the latter was found to induce the appearance of necrotic spots on lettuce leaves (Ouhibi et al., 2013).

2. Material and methods

2.1. Plants and culture conditions

For seed priming, two durations and doses of UV-C irradiation were applied on lettuce seeds. UV-C was applied for 1 or 4 min equal to doses of 0.85 kJ m^{-2} or 3.42 kJ m^{-2} , respectively. Non-irradiated lettuce seeds were used as controls (NPr). Each dose was applied to two batches of lettuce seeds placed under a bank of 60 W germicidal UV lamps (VL-215 C 254 nm, Vilbert Lourmat, France) equipped with a 254 nm bandpass filter at 1.4 mW cm^{-2} mounted at a distance of 10 cm from the seeds. The intensity of irradiation was determined using a photo-radiometer (HD2102.2; Delta OHM, Padova, Italy). After treatment, the seeds were surface-sterilized in 70% (v/v) ethanol for 5 min, rinsed five-times with sterile water, and then placed in Petri dishes on a double-layer of filter paper. The Petri dishes were placed in the dark for 4 days at room temperature ($25^\circ \pm 2^\circ\text{C}$). Emerged seedlings were transferred to 0.33 l pots (8.2 cm in diameter) containing an hydroponic nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950) diluted to 1/8th strength, so that the final solution was consisted of: 0.25 mM magnesium sulfate (MgSO_4), 0.125 mM monopotassium phosphate (KH_2PO_4), 0.625 mM calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$), 0.625 mM potassium nitrate (KNO_3), 0.5 μM manganese sulfate (MnSO_4), 0.25 μM zinc sulfate (ZnSO_4), 5 μM boric acid (H_3BO_3), 0.025 μM ammonium molybdate ($(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24}$), and 1.5 μM FeEDTA. The seedlings were grown hydroponically in conditions of non-limiting supply of water, air and minerals, in pots (one plant per pot) with a photoperiod of 16 h at 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR at plant level. The day/night temperatures and relative humidity regimes were 22°/18 °C and 60/80% respectively.

2.2. Plants morphology and growth

On day 21 after seed germination, 100 mM NaCl was added to the nutrient solution of 50% of the plants. Twenty-one days later, seven plants per treatment were sampled (final harvest). Shoot and root fresh weights (Fw) were determined immediately. Morphological parameters (root length, leaf surface area, and leaf number) were measured on each plant using a scanner and Optimas® software. The samples were then oven-dried for 48 h at 70 °C to determine the dry weight. Specific leaf area (SLA), degree of succulence and degree of sclerophylly were determined and were calculated as follows:

SLA = leaf area/dry mass (Beadle, 1993)

Degree of succulence = water mass/leaf area (Delf, 1912)

Degree of sclerophylly = dry mass/leaf area (Witkoswski and Lamont, 1991)

2.3. Ion accumulation

At the final harvest, the roots (but not other organs) were rinsed in 100 ml cold distilled water (three successive rinses of 30 s each), then gently blotted between paper towels. (K^+ and Na^+) ions were extracted from a 25 mg sample of each dried tissue with 0.5% nitric acid, HNO_3 , (v/v) for 48 h, and measured by flame photometry (Eppendorf) using butane-air flame.

2.4. Phenolics extraction

Harvested leaves from three individual plants were dried at room temperature for one week. Extracts were obtained by magnetic stirring 2.5 g of dry leaf powder with 25 ml 80% (v/v) acetone for 30 min. The extracts were then kept at 4 °C for 24 h, filtered

through a filter paper Whatman N°4, evaporated to dryness under vacuum, and stored at 4 °C until analyzed.

2.5. Total phenolics concentrations

Many available methods of quantification of total phenolic content in biological samples are based on the reaction of phenolic compounds with a colorimetric reagent, which allows measurement in the visible portion of the spectrum (Magalhães et al., 2006). Total phenolics were assayed using the Folin–Ciocalteu reagent, following the method of Singleton and Rosi (1965), based on the reduction of a phosphowolframite–phosphomolybdate complex by phenolics to form blue reaction products, slightly modified by Dewanto et al. (2002). An aliquot of each diluted sample was added to 0.5 ml of distilled water and 0.125 ml Folin–Ciocalteu reagent (Fluka, 47641).

The mixture was shaken and, after 6 min, it was added with 1.25 ml sodium carbonate (Na_2CO_3) (7%) (v/v). The solution was then adjusted to a final volume of 3 ml with distilled water and thoroughly mixed. After incubation in the dark, its absorbance was read at 760 nm against the prepared blank. Total phenolic leaf concentrations were expressed in mg gallic acid equivalents per gram dry weight (mg GAE g^{-1} DW) using a calibration curve with gallic acid. All samples were analyzed in triplicate.

2.6. Total flavonoid concentrations

Total flavonoid concentrations were measured using the colorimetric assay developed by Dewanto et al. (2002). An aliquot of diluted sample or a standard solution of (+)-catechin was added to 75 μl of 7% (v/v) sodium nitrite (NaNO_2) solution and mixed for 6 min, before adding 0.15 ml 10% (v/v) aluminium chloride (AlCl_3). After 5 min, 0.5 ml of 1 M sodium hydroxide (NaOH) was added. The final volume was adjusted to 2.5 ml, mixed thoroughly and its absorbance was determined at 510 nm. Total flavonoid concentrations were expressed in mg (+)-catechin equivalents g^{-1} DW (mg CE g^{-1} DW), using a calibration curve of (+)-catechin (0–400 $\mu\text{g ml}^{-1}$ range). All samples were analyzed in triplicate.

2.7. Total antioxidant capacity

The assay was based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the extract and the subsequent formation of a green phosphate/Mo(V) complex at acidic pH (Prieto et al., 1999). A 0.1 ml of the acetic leaf extract (see above) was added to 1 ml of reagent solution (0.6 M sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate, and 4 mM ammonium molybdate). The tubes were incubated in a thermal block at 95 °C for 90 min. Thereafter, the mixture was kept at ambient temperature and the absorbance of each solution was measured at 695 nm (Anthelie Advanced 2, SECOMAN) against a blank. Antioxidant capacity was expressed in mg GAE g^{-1} DW using calibration curve from 0 to 500 $\mu\text{g gallic acid ml}^{-1}$. All samples were analyzed in triplicate.

2.8. DPPH-radical-scavenging activity

Diphenylpicrylhydrazyl radical ($\text{DPPH}\cdot$) scavenging activity was estimated according to Hanato et al. (1988). Each dried plant extract was diluted in absolute methanol at different concentrations, and then two ml was added to 0.5 ml of the 0.2 mmol^{-1} DPPH methanolic solution. The mixture was shaken vigorously and left standing at room temperature for 30 min in the dark. The absorbance was then measured at 517 nm. The DPPH scavenging activity was calculated, for each dilution of the leaf extract, as $100 (A_0 - A_1)/A_0$, where A_0 was the absorbance of the control at 30 min, and

A_1 was the absorbance of the sample at 30 min. The free radical scavenging was finally expressed as IC_{50} (mg ml^{-1}), the extract concentration required to cause 50% inhibition. A lower IC_{50} value corresponded to a higher antioxidant activity of the plant extract. All samples were analyzed in triplicate.

2.9. Statistical analysis

All data were initially analyzed for a normal distribution by the student Fisher test, then by analysis of variance (two-way ANOVA) using Statistica® (StatSoft France). Means (\pm standard error) were separated and ranked using the Newman–Keuls for post hoc test ($P = 0.05$).

3. Results

3.1. Growth and development

The effects of UV-C priming of seed and salinity on the growth of lettuce plants was examined (Fig. 1). Salt treatment resulted in a decrease in whole plant DW from non-primed seed (NPr), the effect of salt was being more pronounced in roots (–85%) than in leaves (–66%). Plants grown from UV-C primed seed under salinity conditions showed a decrease in the DW of roots and leaves more pronounced with a high UV-C priming dose (3.42 kJ m^{-2}) than with a low dose (0.85 kJ m^{-2}), but the effect of salt stress was still less pronounced than that observed for plants grown from non-primed seeds.

The decreases in root DW under salinity (NPr seeds or 0.85 kJ m^{-2} primed seeds) was due in part to a reduction in their root elongation (Table 1). This observation did not apply to plants grown from UV-C primed seed with the higher dose of UV-C (3.42 kJ m^{-2}). The difference between non-saline control and salt treatments was not significant at $P = 0.05$ (the actual P value was 0.26).

Most of the leaves present at the final harvest were initiated during the treatment. The salt treatment resulted in a restriction of leaf development (Table 1). This restriction concerned mainly the total leaf surface area (45% less than the control), the leaf number biomass deposition (50%), and the leaf thickness, but salt did not modify the leaf expansion (individual leaf surface area). Salt-treated plants displayed a significant increase of the specific leaf area (64% higher at 100 mM NaCl than the control). Leaf succulence was measured as water content per unit area in lettuce grown in

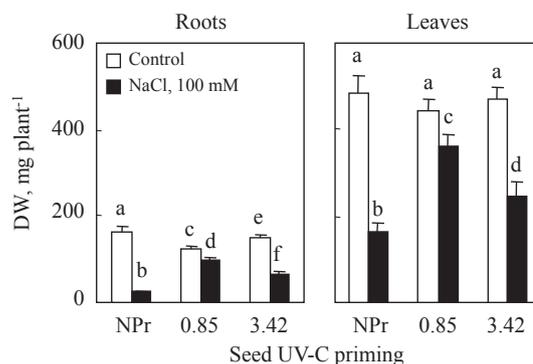


Fig. 1. Dry weights (DW) of roots and leaves of lettuce. Twenty one-days-old plants derived from non-primed (NPr) or UV-C primed (0.85 and 3.42 kJ m^{-2}) seeds were grown for 21 days in the absence (control) or in the presence of 100 mM NaCl. Mean of seven plants and confidence interval for $P = 0.05$. Mean values with the same letter in each panel are not significantly different at $P = 0.05$ (ANOVA and mean comparison with Newman–Keuls post hoc test).

Table 1

Morphology parameters: root elongation, total leaf area and number of leaf stages of lettuce. Twenty one-days-old plants derived from non-primed (NPr) or UV-C primed (0.85 and 3.42 kJ m^{-2}) seeds were grown for 20 days in the absence (C) or in the presence of 100 mM NaCl (S). Mean of seven plants and confidence interval for $P = 0.05$. Mean values with the same letter in each panel are not significantly different at $P = 0.05$ (ANOVA and mean comparison with Newman–Keuls post hoc test).

	NPr		UV-C seed priming			
			0.85 kJ m^{-2}		3.42 kJ m^{-2}	
	C	S	C	S	C	S
Root elongation	22 ± 1 ^a	18 ± 2 ^b	22 ± 2 ^a	19 ± 1 ^b	22 ± 2 ^a	23 ± 1 ^a
Leaf number	13 ± 1 ^a	6 ± 0.0 ^b	12 ± 0 ^c	11 ± 1 ^c	12 ± 0 ^a	9 ± 0 ^d
Total leaf area, $\text{plant}^{-1} \text{cm}^2$	25 ± 2 ^a	14 ± 1 ^b	24 ± 1 ^a	21 ± 2 ^c	27 ± 1 ^d	18 ± 0 ^e
Individual leaf area $\text{cm}^2 \text{leaf}^{-1}$	2.0 ± 0.2 ^{ab}	2.2 ± 0.2 ^a	2.1 ± 0.1 ^{ab}	1.9 ± 0.1 ^b	2.2 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^{ab}
Leaf thickness cm	0.5 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.1 ^{ac}	0.4 ± 0.0 ^{ab}	0.5 ± 0.1 ^c
Specific leaf area $\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$	0.05 ± 0.0 ^a	0.09 ± 0.0 ^b	0.05 ± 0.0 ^a	0.06 ± 0.0 ^a	0.06 ± 0.0 ^a	0.07 ± 0.0 ^c
Leaf sclerophyllly mg cm^{-2}	19 ± 1 ^a	12 ± 2 ^b	18 ± 1 ^{ac}	17 ± 1 ^c	17 ± 1 ^a	14 ± 2 ^d
Leaf succulence mg cm^{-2}	214 ± 23 ^a	56 ± 11 ^b	196 ± 12 ^c	171 ± 15 ^d	191 ± 11 ^c	134 ± 14 ^e

the absence and the presence of NaCl 100 mM for 21 days. Under NaCl treatment, the degrees of leaf sclerophyllly and succulence were significantly reduced by 38 and 74% respectively compared with the control (Table 1). Plants grown from primed seeds with different UV-C doses, also show a decrease or an increase in these parameters, but less affected under salinity stress, especially with 0.85 kJ m^{-2} UV-C, in which recorded values were, mostly, comparable to those from primed seed and cultured without NaCl.

3.2. Water content

Under control conditions (without NaCl), leaves of plants grown from primed and non-primed seeds looked similar, and no differences in water content were observed (Fig. 2). Sodium chloride treatment reduced root water content in all plants derived from primed and non-primed (NPr) seeds. Leaf tissue hydration was also drastically reduced by NaCl 100 mM, but only in plants derived from (NPr) seeds (Fig. 2).

3.3. Ion accumulation

In plants grown over 3 weeks at 100 mM NaCl, roots and leaves showed a significantly higher sodium accumulation, regardless of UV-C treatment (Fig. 3). However, roots showed a higher capacity than leaves to accumulate Na^+ under salt treatment. Plants grown from UV-C priming seeds showed an increase in Na^+ accumulation in roots at 100 mM NaCl, more pronounced with a low dose of UV-C than the high one. On the contrary, in photosynthetic organs, we

observed a decrease and an increase of Na^+ accumulation, respectively at 0.85 kJ m^{-2} and 3.42 kJ m^{-2} UV-C in comparison to the control (NPr).

Regardless of NaCl treatment, K^+ concentration was found to be higher in aerial parts than in roots. UV-C treatment resulted in an increase of K^+ concentration, especially with 0.85 kJ m^{-2} in leaves, as compared to root tissue which was not affected by different doses of UV-C. In the presence of salt, potassium ions were strongly restricted in roots of plants NPr and primed with 3.42 kJ m^{-2} UV-C. These restrictions were partially compensated in these organs for plants priming with 0.85 kJ m^{-2} UV-C and in leaves for all treatments NPr and priming with UV-C (Fig. 3).

3.4. Leaf polyphenol total and flavonoid concentrations

The total phenolic assay was performed on dry weight basis (Fig. 4A). Under control conditions, leaf concentrations of these

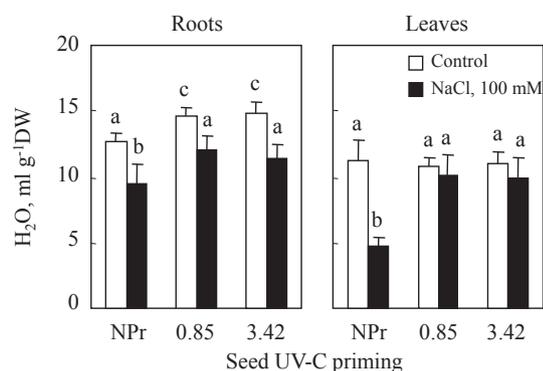


Fig. 2. Water content in roots and leaves of lettuce. Twenty one-days-old plants derived from non-primed (NPr) or UV-C primed (0.85 and 3.42 kJ m^{-2}) seeds were grown for 21 days in the absence (control) or in the presence of 100 mM NaCl. Mean of seven plants and confidence interval for $P = 0.05$. Mean values with the same letter in each panel are not significantly different at $P = 0.05$ (ANOVA and mean comparison with Newman–Keuls post hoc test).

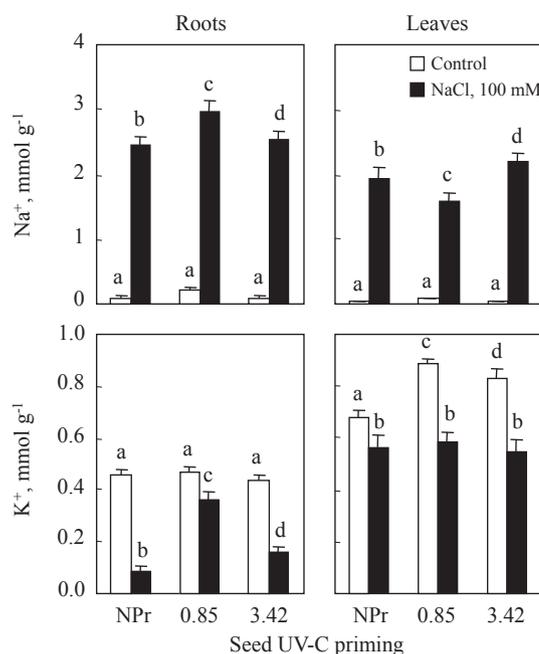


Fig. 3. Na^+ and K^+ contents in roots and leaves of lettuce. Twenty one-days-old plants derived from non-primed (NPr) or UV-C primed (0.85 and 3.42 kJ m^{-2}) seeds were grown for 21 days in the absence (control) or in the presence of 100 mM NaCl. Mean of seven plants and confidence interval for $P = 0.05$. Mean values with the same letter in each panel are not significantly different at $P = 0.05$ (ANOVA and mean comparison with Newman–Keuls post hoc test).

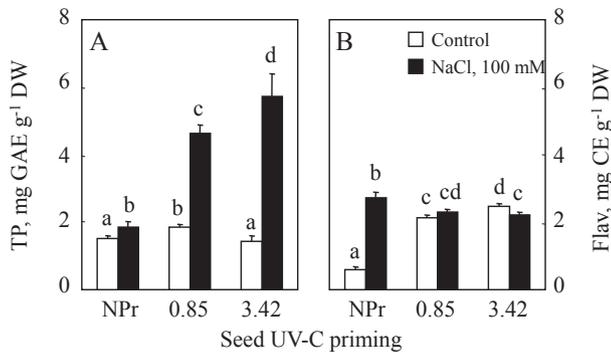


Fig. 4. Total polyphenol (TP) (A) and flavonoids content (B) in leaves of lettuce. Twenty one-days-old plants derived from non-primed (NPr) or UV-C primed (0.85 and 3.42 kJ m⁻²) seeds were grown for 21 days in the absence (control) or in the presence of 100 mM NaCl. Mean of three plants and confidence interval for $P = 0.05$. Mean values with the same letter in each panel are not significantly different at $P = 0.05$ (ANOVA and mean comparison with Newman–Keuls post hoc test).

compounds showed similar values (with a slight significant difference) for all treatments (NPr and priming plants). Values ranged from 1.5 to 2 mg GAE g⁻¹ DW in the control. Under NaCl 100 mM, they were enhanced by 252% and 403% in plants derived from primed seeds, respectively, with UV-C 0.85 kJ m⁻² and 3.42 kJ m⁻².

Flavonoid of lettuce leaf extracts was expressed as mg (+)-catechin equivalent per gram dry weight (Fig. 4B). Our results revealed a significant positive effect on leaf flavonoid concentration in plants (NPr) under salt stress. However, priming plants showed a higher effect on the accumulation of these molecules both in absence and presence of NaCl 100 mM. Salt stress had no effect on total flavonoids in all priming plants with UV-C 0.85 kJ m⁻² or 3.42 kJ m⁻².

3.5. Leaf total antioxidant capacity and anti-radical activity

Under non-saline conditions, leaf antioxidant capacity showed very low values in priming plants, in particular with UV-C 0.85 kJ m⁻², compared to non-primed seeds. Indeed, this activity was reduced by 93% and 44% in UV-C primed seeds with 0.85 and 3.42 kJ m⁻², respectively, in comparison to the control (Fig. 5A). Three-week salt treatment, however, significantly increased this antioxidant response in all plants except for the priming plants with the highest dose of UV-C (3.42 kJ m⁻²) (Fig. 5A).

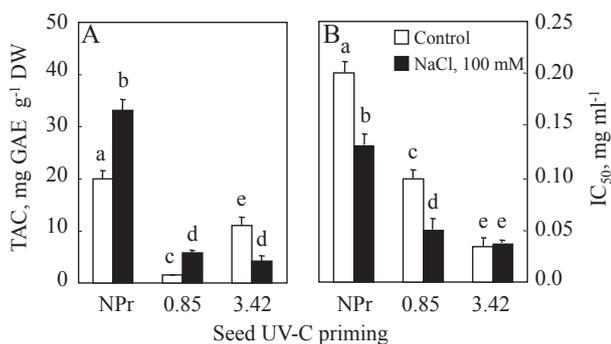


Fig. 5. Total antioxidant capacity (TAC) (A) and scavenging ability, expressed as IC₅₀ values (mg ml⁻¹), on DPPH radicals (B) in leaves of lettuce. Twenty one-days-old plants derived from non-primed (NPr) or UV-C primed (0.85 and 3.42 kJ m⁻²) seeds were grown for 21 days in the absence (control) or in the presence of 100 mM NaCl. Mean of three plants and confidence interval for $P = 0.05$. Mean values with the same letter in each panel are not significantly different at $P = 0.05$ (ANOVA and mean comparison with Newman–Keuls post hoc test).

Leaves of NPr plants grown under control conditions showed a low anti-radical activity (IC₅₀ value exceeding 0.2 mg ml⁻¹) (Fig. 5B). Priming plants led also to a high antioxidant response more pronounced at a dose of UV-C radiations of 3.42 kJ m⁻² (IC₅₀: 0.10 mg ml⁻¹) than at 0.85 kJ m⁻² (IC₅₀: 0.03 mg ml⁻¹). Salt treatment significantly decreased IC₅₀ values both in NPr plants (35%) and in priming plants with 0.85 kJ m⁻² (50%), but not with 3.42 kJ m⁻², in which leaf anti-radical activity appeared similar to that of plants grown without salt in the medium.

4. Discussion

Salt stress, like many other abiotic stresses, inhibits plant growth. A recent study demonstrated that Romaine lettuce was stunted after 15 days of treatment with 200 mM NaCl (Kim et al., 2008). Thus, the decrease in total dry matter may be due to considerable decreases in plant growth, photosynthesis and canopy structure during salt stress (Shao et al., 2008). The reduction in growth may be an adaptive response to stress (Zhu, 2001). A decrease in growth rate under unfavorable conditions allows the conservation of energy, thereby helping launching appropriate defense response and reducing the risk of damages (Chaparzadeh et al., 2004). To improve salt tolerance of the plants, especially horticultural commodities, at different stages of their life cycle, we need more methods for improving the crops under salt stressed condition by simple, un-expensive and environment friendly ways. Seed priming is one of such type of methods and UV-C priming has shown improved growth of lettuce under stressed conditions. Results show that priming increased roots and leaves dry weight of lettuce in saline conditions compared to non priming, especially at 0.85 kJ m⁻² UV-C. These results indicated that seed priming may be helpful in reducing the risk of poor stand establishment, under stress condition and permit more uniform growth under saline condition (Rozbeh et al., 2011).

Salt stress also reduced leaf growth of lettuce; this effect was associated with reduction in their leaf number and thickness. Mahmoudi et al. (2012) signaled that lettuce showed a moderate tolerance to NaCl as shown by the reduction of a number of morphological traits (leaf area, rosette diameter, leaf number, and root length). Green leaves and dry matter production per plant were reported to be reduced with the increase in soil salinity (Bal and Dutt, 1984). Inhibition of the formation of leaf primordia under salinity stress could be the probable reason for low leaf number (Alamgir and Ali, 2006). Mahmoudi et al. (2012) confirmed that in lettuce plants, salinity modified growth through its effects on leaf expansion and on the initiation of new leaves.

Salt stress induced a significant decline in the degree of leaf succulence and in its degree of sclerophylly. In accordance with our results, leaf succulence was found to decrease in three varieties of salt-stressed sunflower plants and two wheat cultivars (Welch and Rieseberg, 2002; Aldesuquy et al., 2012). This may be explained on the basis that less absorbed water means less water content of the growing leaves, indicated by less relative water content and more saturation water deficit as well as less succulence (Aldesuquy et al., 2012). On the contrary, in *Bruguiera parviflora*, leaf succulence increased with increasing salinity (Parida et al., 2004). Increased leaf succulence might have resulted from increases in water uptake and turgor pressure as a result of cells having higher solute concentration (Jennings, 1976). According to Edwards et al. (2000), the functional significance of sclerophylly remains controversial, with three main groups of hypotheses proposed to explain its adaptive significance. These centre on sclerophylly as (i) an adaptation to drought stress, (ii) an adaptation or a consequence of a nutritional and/or (iii) lack of improved leaf longevity by increasing its carbon gain.

Plants may avoid accumulation of potentially toxic ions in leaf tissues by restricting ion uptake or translocation, and our data suggest that lettuce has a limited ability to regulate both processes for Na^+ . In our conditions, the capacity of the roots to sequester ions appears to be exceeded after 3 weeks of treatment (Fig. 3), resulting in increases of Na^+ accumulation in roots. The ability of plant to limit Na^+ transport into the shoot is critically important for the maintenance of high growth rates and protection of the metabolic processes in elongation cells from the toxic effects of Na^+ (Razmjoo et al., 2008). This could be attributed to the ability of root to exclude Na^+ from the xylem sap flowing to the shoot, which would imply the better growth of shoot than root (Kaya et al., 2007).

UV-C priming plants reduced leaf Na^+ content. This indicates that seed priming with UV-C (0.85 kJ m^{-2}) induced a reduction of Na^+ absorption and toxicity. This could explain the mitigation effect of UV-C on growth of lettuce. Further, the antagonistic relation between Na^+ and K^+ as a result of UV-C treatment indicates that, UV-C could play, probably, a role in modifying K^+/Na^+ selectivity under salt stress.

Lettuce is a widely consumed vegetable and a good source of phenolic compounds (Ribas-Agustí et al., 2011). Several studies have shown that abundance of phenolic compounds in lettuce tissues can be affected by genetic (variety), agronomical (fertilisation, crop protection strategies, etc.) and environmental factors (DuPont et al., 2000; Manach et al., 2004).

Phenolic compounds are excellent oxygen radical scavengers because the electron reduction potential of phenolics is lower than the electron reduction potential of oxygen radicals (Bors et al., 1990; Grace, 2005). In fact, phenoxyl radicals are generally less reactive than oxygen radicals (Bors et al., 1994). The Folin–Ciocalteu (F–C) assay is the appropriate method and has been proposed as a standardized method for routinely quantify phenolic compounds in food products and dietary supplements (Prior et al., 2005). This protocol describes a rapid, small-scale, high-throughput assay for approximating the total phenolics substrates on the basis of the improved F–C assay of Singleton and Rosi (1965), using gallic acid as a standard.

Based on the absorbance values after reaction with Folin–Ciocalteu reagent, our results showed that leaves of salt treated plants accumulated more phenolic compounds. Hence, the maintenance of lettuce plants at 100 mM NaCl after 3-week salt treatment could be explained by the accumulation of non-enzymatic antioxidant systems. Our results are in agreement with those of Oueslati et al. (2010) and Karray-Bouraoui et al. (2010) who found an increase in total polyphenols and antiradical activities in *Mentha pulegium*. Navaro et al. (2006) also demonstrated that total phenolic concentration increased with salinity level in red pepper fruits.

Considering the multifaceted aspects of antioxidants and their reactivity, several antioxidant assays were applied. In fact, depending on the reaction involved, these assays can roughly be classified into two types: assays based on hydrogen atom transfer reactions and assays based on electron transfer (Huang et al., 2005). The result of a single method can give only a reductive view of the antioxidant properties of the extracts (Hayouni et al., 2007). Accordingly, we combined several complementary analyses. Among them total antioxidant capacity and DPPH are the most commonly used for determining antioxidant activities of plant extracts (Ksouri et al., 2009).

Global antioxidant capacity of *L. sativa* was expressed as the number of gallic acid equivalents. The phosphomolybdenum method was based on the reduction of Mo(VI) to Mo(V) by the antioxidant compound and the formation of a green phosphate/ Mo(V) complex with a maximal absorption at 695 nm. Our study reveals a strong antioxidant activity of *L. sativa* leaves of NPr plants

grown under control conditions ($20 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$) (Fig. 5). This high value might be attributed to the presence of phytochemicals such as phenolic compounds (Falleh et al. 2008). Recent studies have shown that many flavonoids and related polyphenols contribute significantly to the total antioxidant capacity of many fruits such as red grape (Negro et al., 2003), vegetables (Luo et al., 2002) and medicinal plants (Bourgou et al., 2008).

A rapid, simple and inexpensive method to measure antiradical activity of food involves the use of the free radical, DPPH. This method is widely used to test the ability of compounds to act as free radical scavengers or hydrogen donors, and to evaluate antioxidant activity of foods (Soares et al., 1997). The DPPH method can be used for solid or liquid samples and is not specific to any particular antioxidant component, but applies to the overall antioxidant capacity of the sample.

The reduction capability of DPPH radical was determined by the decrease in absorbance induced by plant antioxidants. The scavenging effect of methanol extracts on the DPPH radical expressed as IC_{50} values was 0.2 mg ml^{-1} in leaves of NPr plants grown under non-saline conditions (Fig. 5). Thus, lower IC_{50} value indicates a higher DPPH free radical-scavenging activity. It has been found that antioxidant molecules such as ascorbic acid, tocopherols, flavonoids, and tannins reduce and discolor DPPH thanks to their hydrogen donating ability (Kumaran and Karunakaran, 2007). Phenolic compounds of *L. sativa* extracts were probably involved in radical scavenging activity. In this way, Younos et al. (2005) and Ksouri et al. (2009) showed that *Tamarix* species are rich in phenolics which are involved in several biological activities including antioxidant ones.

In this work, IC_{50} value decreased in the presence of salt indicating that the antioxidant capacity of the leaf extract was stimulated by salt treatment. Similar results were found in *Mentha pulegium* and *Carthamus tinctorius* by Karray-Bouraoui et al. (2010, 2011) who suggested that the hard environmental conditions, mainly salinity, may enhance phenolic biosynthesis and consequently antioxidant activities. The antioxidant activity of safflower leaves was also evaluated by the effect of extract samples on DPPH radical scavenging activity under non-saline and saline conditions (Karray-Bouraoui et al., 2011). Total antioxidant capacity is only remotely correlated to the content in phenolic compounds since others antioxidant molecules contained in plants can participate in antioxidant activity (Tawaha et al., 2007). Concerning antiradical activity against DPPH, this test is specific to antioxidant compounds that can liberate hydrogen atom to quench DPPH^{\cdot} radical. Only some phenolics were able to neutralize this radical. In addition, other phenolics release protons (react with the radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$) or chelate free radicals (Bourgou et al., 2008). Moreover, enhancing the antioxidant pool improves the capacity of plant to tolerate the oxidative stress associated with salinity but is not directly correlated to growth responses (Ksouri et al., 2007).

The enhancing effect of UV on the total phenolic compounds of fruits and vegetables has been well studied over the last few years. Scientific evidence is now accumulating to show that the DNA-damaging effect of UV light induces the accumulation of UV-absorbing flavonoids and other phenolics compounds, predominantly in the epidermal tissues of fruit (Strack, 1997). This effect arises due to increased expression and activity of the enzyme phenylalanine ammonia-lyase, a key enzyme in the production of phenylpropanoids, which leads to an increase of phenols, phytoalexins and lignins (Ryalls et al., 1996). Bravo et al. (2012) showed that the UV-C treatments significantly increased the total phenolic content and the antioxidant capacity of treated tomatoes compared to untreated samples, but no clear effect was observed for individual phenolic compounds. These results indicate that UV-C treatments induce stress and the accumulation of phenolic

compounds in the fruit due to the activation of the phenolic biosynthesis pathway (Bravo et al., 2012).

Our results showed that the leaf extracts from seed primed with moderate dose of UV-C (0.85 kJ m^{-2}) exhibited higher phenolic concentrations, small increase in total antioxidant capacity but higher antiradical activity in the presence of NaCl in culture medium. These results appear to support the UV-C hormesis model. Luckey (1980) indicated that if radiation hormesis really exists, it should be possible to produce experimental evidence to support the following criteria: (1) hormesis should be expected following a low or sublethal dose of UV-C that allows stimulation of beneficial biological response; (2) high doses above the optimum low dose(s) decreases biological performance. The first criterion is applicable to our above results of this experiment that follow the application of a low dose UV-C. Brown et al. (2001) showed that the application of hormetic low dose UV-C (3.6 kJ m^{-2}) to cabbage seeds reduced black rot, improved quality, delayed maturity and improved growth response of developing cabbage plants. And, seeds treated at higher dosages of $4.8\text{--}7.5 \text{ kJ m}^{-2}$ increased susceptibility to black rot of cabbage plants, decreased growth response e.g. cabbage head weight and diameter and vegetable quality (Brown et al., 2001).

In conclusion, when grown for 3 weeks in the presence of NaCl 100 mM, *L. sativa* plants showed a pronounced decline in biomass production, an accumulation in sodium resulted in a nutrient uptake disturbance by an antagonist effect on the essential cations such as K^+ in the absorption sites which could explain the reduction of biomass production. Salt stress also induced stimulation of polyphenol content, flavonoids and total antioxidant capacity and a higher DPPH scavenging ability and seed priming with UV-C may have alleviated the adverse effect of salinity on plant growth. These findings suggest that UV-C priming could be used as a simple and cost effective strategy to alleviate the NaCl induced stress in lettuce.

Author contribution

The two first authors Chayma Ouhibi and Houneida Attia contributed equally in the culture, experiments and writing of this manuscript. Fedia Rebah, Najoua Msilini and Mohamed Chebbi, helped us with protocols and chemicals. Jawad Aarouf, Laurent Urban and Mokhtar Lachaal contributed to the English language corrections and critical reading of this article.

References

- Alamgir, A.N.M., Ali, M.Y., 2006. Effects of NaCl salinity on leaf characters and physiological growth attributes of different genotypes of rice (*Oryza sativa* L.). *Bangladesh J. Bot.* 35 (2), 99–107.
- Aldesuquy, H.S., Baka, Z.A., El-Shehaby, O.A., Ghanem, H.E., 2012. Varietal differences in growth vigor, water relations, protein and nucleic acids content of two wheat varieties grown under seawater stress. *J. Stress Physiol. Biochem.* 8, 24–47.
- Allende, A., Artés, F., 2003. UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. *Food Res. Int.* 36, 739–746.
- Allende, A., McEvoy, J.L., Luo, Y., Artes, F., Wang, C.Y., 2006. Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed 'Red Oak Leaf' lettuce. *Food Microbiol.* 23, 241–249.
- Bal, A.R., Dutt, S.K., 1984. Effect of soil salinity on growth of *Coix lachryma* Jobi L. *Indian J. Plant Physiol.* 27, 398–400.
- Beadle, C.L., 1993. Growth analysis. In: Hall, D.C., Scurlock, J.M.O., Bolhar, H.R., Leegod, R.C., Long, S.P. (Eds.), *Photosynthesis and Production in a Changing Environment. A Field and Laboratory Manual*. Chapman and Hall, London, pp. 36–46.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 186, 343–355.
- Bors, W., Michel, C., Saran, M., 1994. Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol.* 234, 420–429.
- Bourgeois, S., Ksouri, R., Bellila, A., Skandrani, I., Falleh, H., Marzouk, B., 2008. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots. *C. R. Biol.* 331, 48–55.
- Bravo, S., García-Alonso, J., Martín-Pozuelo, G., Gómez, V., Santaella, M., Navarro-González, I., Periago, J.M., 2012. The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, β -carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. *Food Res. Int.* 49, 296–302.
- Brown, J.E., Lu, T.Y., Stevens, C., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., Collins, D.J., Wilson, M.A., Igwegbe, E.C.K., Chalutz, E., Drobny, S., 2001. The effect of low dose ultraviolet light-C seed treatment on induced resistance in cabbage to black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*). *Crop Prot.* 20, 873–883.
- Chaprazadeh, N., Amico, M.L., Nejad, R.K., Izzo, R., Izzo, F.N., 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 695–701.
- Costa, L., Vicente, A.R., Civello, P.M., Chaves, A.R., Martínez, G.A., 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccolini florets. *Postharvest Biol. Technol.* 39, 204–210.
- Delf, E.M., 1912. Transpiration in succulent plants. *Ann. Bot.* 26, 409–440.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K.K., Liu, R.H., 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3010–3014.
- DuPont, M.S., Mondin, Z., Williamson, G., Price, K.R., 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J. Agr. Food Chem.* 48, 3957–3964.
- Edwards, C., Read, J., Sanson, G., 2000. Characterising sclerophylly: some mechanical properties of leaves from heath and forest. *Oecologia* 123, 158–167.
- Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouaraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 331, 372–379.
- Fonseca, J.M., Rushing, J., 2006. Effect of ultraviolet-C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biol. Technol.* 40, 256–261.
- Frohnmeier, H., Staiger, D., 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated response in plants: balancing damage and protection. *Plant Physiol.* 133, 1420–1428.
- Ghiyasi, M., Abbasi, S.A., Tajbakhsh, M., Amirnia, R., Salehzadeh, H., 2008. Effect of osmopriming with polyethylene glycol (8000) on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds under salt stress. *Res. J. Biol. Sci.* 3, 1249–1251.
- Gonai, T., Kawahara, S., Tougo, M., Satoh, S., Hashiba, T., Hirai, N., Kawaide, H., Kamiya, Y., Yoshioka, T., 2004. Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellins. *J. Exp. Bot.* 55, 111–118.
- Grace, S.C., 2005. Phenolics as antioxidants. In: Smirnoff, N. (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 141–168.
- Hanato, T., Kagawa, H., Yasuhara, T., Okuda, T., 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem. Pharm. Bull.* 36, 2090–2097.
- Hayouni, A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., 2007. The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem.* 105, 1126–1134.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water culture method for growing plants without soil. *Cal. Agr. Exp. Stat. Cir.* 347.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856.
- Jennings, D.H., 1976. The effects of sodium chloride on higher plants. *Biol. Rev.* 51, 453–458.
- Karray-Bouaraoui, N., Hamrouni, M.H., Rabhi, M., Harbaoui, F., Attia, H., Oueslati, S., Ksouri, R., Lachaal, M., 2010. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of two *Mentha pulegium* provenances to salt stress. *J. Med. Plant Res.* 4, 2518–2524.
- Karray-Bouaraoui, N., Harbaoui, F., Rabhi, M., Jallali, I., Ksouri, R., Attia, H., Msilini, N., Lachaal, M., 2011. Different antioxidant responses to salt stress in two different provenances of *Carthamus tinctorius* L. *Acta Physiol. Plant* 33, 1435–1444.
- Kaya, C., Tuna, A.L., Ashraf, M., Altunlu, H., 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environ. Exp. Bot.* 60, 397–403.
- Kim, H.J., Fonseca, J.M., Kubota, C., Kroggel, M., Choi, J.H., 2008. Quality of fresh-cut tomatoes as affected by salt content in irrigation water and post-processing ultraviolet-C treatment. *J. Sci. Food Agric.* 88, 1969–1974.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., Abdelly, C., 2007. Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritime*. *Plant Physiol. Biochem.* 45, 244–249.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magne, C., Abdelly, C., 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food Chem. Toxicol.* 47, 2083–2091.
- Kumaran, A., Karunakaran, R.J., 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Leb. Wiss. Technol.* 40, 344–352.
- Luckey, T.D., 1980. Hormesis with Ionizing Radiation. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p. 222.
- Luckey, T.D., 1991. Radiation Hormesis. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, p. 306.
- Luo, X.D., Basile, M.J., Kennelly, E.J., 2002. Polyphenolic antioxidants from the fruits of *Chrysophyllum canitio* L. (star apple). *J. Agr. Food Chem.* 50, 1379–1382.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L., Rangel, A.O., 2006. Automatic method for the determination of Folin–Ciocalteu reducing capacity in food products. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5241–5246.

- Maharaj, R., Arul, J., Nadeau, P., 1999. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. *Capello*) by delaying senescence. *Postharvest Biol. Technol.* 15, 13–23.
- Mahmoudi, H., Baatour, O., Ben Salah, I., Nasri, N., Wissal, A., Huang, J., Zargouni, H., Hannoufa, A., Lachaâl, M., Ouerghi, Z., 2012. Enhanced accumulation of root hydrogen peroxide is associated with reduced antioxidant enzymes under isoosmotic NaCl and Na₂SO₄ salinities. *Afr. J. Biotechnol.* 11, 8500–8509.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Marquenie, D., Lammertyn, J., Geeraerd, A.H., Soontjens, C., Van Impe, J.F., Nicolaï, B.M., Michiels, C.W., 2002. Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 74, 27–35.
- McDonald, M.B., 2000. Seed priming. In: Black, M., Bewley, J.D. (Eds.), *Seed Technology and its Biological Basis*. Sheffield Academic Press Ltd., Sheffield, UK, pp. 287–325.
- Mezni, M., Albouchi, A., Bizid, E., Hamza, M., 2002. Effet de la salinité des eaux d'irrigation sur la nutrition minérale chez trois variétés de Luzerne pérenne (*Medicago sativa*). *Agronomie* 22, 283–291.
- Mtimet, A., 2001. Soils of Tunisia. In: Zdruli, P., Steduto, P., Lacirignola, C., Montanarella, L. (Eds.), *Soil Resources of Southern and Eastern Mediterranean Countries*, Bari, Italy, pp. 243–262.
- Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167, 645–663.
- Nasri, N., Kaddour, R., Mahmoudi, H., Baatour, O., Bouraoui, N., Lachaâl, M., 2011. The effect of osmopriming on germination, seedling growth and phosphatase activities of lettuce under saline condition. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 14366–14372.
- Navaro, J.M., Flores, P., Garrido, C., Martínez, V., 2006. Changes in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 96, 66–73.
- Negro, C., Tommasi, L., Miceli, A., 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour. Technol.* 87, 41–44.
- Oueslati, S., Karray, B.N., Attia, H., Rabhi, M., Ksouri, R., Lachaâl, M., 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiol. Plant* 32, 289–296.
- Ouhibi, C., Attia, H., Urban, L., Lachaâl, M., AArrouf, J., 2013. Effet de différentes doses d'UV-C sur l'aspect visuel et les paramètres de fluorescence chlorophyllienne de la laitue Romaine. *Tunis. J. Med. Plant Nat. Prod.* 9 (4).
- Pan, J., Vicente, A.R., Martínez, G.A., Chaves, A.R., Civeello, P.M., 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1831–1838.
- Parida, A.K., Das, A.B., Mitra, B., 2004. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. *Trees* 18, 167–174.
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal. Biochem.* 269, 337–341.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290–4302.
- Razmjoo, K., Heydarizadeh, P., Sabzalain, M.R., 2008. Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile*. *Int. J. Agric. Biol.* 10, 451–454.
- Ribas-Agustí, A., Gratacós-Cubarsí, M., Sárraga, C., García-Regueiro, J.A., Castellari, M., 2011. Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa* L.) by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochem. Anal.* 22, 555–563.
- Rozbeh, F., Saeed, S., Delfie, M., 2011. The effect of NaCl seed priming on salt tolerance, antioxidant enzyme activity, proline and carbohydrate accumulation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) under saline condition. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 1363–1370.
- Ryalls, J., Neuenschwander, U., Willits, M., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M., 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809–1819.
- Shao, H.B., Chu, L.Y., Shao, M.A., Jaleel, A.C., Mi, H.M., 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Compt. Rendus Biol.* 331, 433–441.
- Singleton, V.L., Rosi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 16, 144–158.
- Soares, J.R., Dins, T.C.P., Cunha, A.P., Almeida, L.M., 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radic. Res.* 26, 469–478.
- Stevens, C., Khan, V.A., Lu, J.Y., Wilson, C.L., El-Ghaouth, A., Chalutz, E., Droby, S., 1996. Low dose UV-C light as a new approach to control decay of harvested commodities. In: Pandalai, S.G. (Ed.), *Recent Res Devel in Plant Pathology. Research Signpost, India*, pp. 155–169.
- Strack, D., 1997. Phenolic metabolism. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press, London.
- Tawaha, K., Alali, F.Q., Gharaibeh, M., Mohammad, M., El-Elimat, T., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* 104, 1372–1378.
- Vicente, A.R., Pineda, C., Lemoine, L., Civeello, P.M., Martínez, G.A., Chaves, A.R., 2005. UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharvest Biol. Technol.* 35, 69–78.
- Welch, M.E., Rieseberg, L.H., 2002. Habitat divergence between a homoploid hybrid sunflower species, *Helianthus paradoxus* (Asteraceae), and its progenitors. *Am. J. Bot.* 89, 472–479.
- Witkowski, E.T.F., Lamont, B.B., 1991. Leaf specific mass confounds leaf density and thickness. *Oecologia* 84, 362–370.
- Younos, C., Soulimani, R., Seddiqi, N., Baburi, O., Dicko, A., 2005. Étude ethnobotanique et historique des tamaris (*Tamarix* sp., tamaricacée) et leurs usages actuels en Afghanistan. *Phytothérapie* 6, 248–251.
- Zapata, J.P., Serrano, M., Pretel, M.T., Amoros, A.M., 2003. Changes in ethylene evolution and polyamines profiles of seedlings of nine cultivars of lettuce in response to salt stress during germination. *Plant Sci.* 164, 557–563.
- Zhu, J.K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6, 66–71.



*Conclusion
Générale
&
Perspectives*

CONCLUSIONS GENERALES

&

PERSPECTIVES

Le travail de recherche, objet de cette thèse, est le premier qui s'est intéressé à l'étude de l'effet des UV-C sur la réponse de la laitue romaine à des pathogènes se produisant au cours de la culture et au cours du stockage. Il s'est proposé aussi d'étudier l'effet des UV-C sur le potentiel de conservation après récolte de cette espèce cultivée. Le priming des graines avec des rayonnements UV-C est enfin étudié sur leur comportement germinatif ainsi que sur la croissance ultérieure des plantules issues de ces graines.

Dans une démarche expérimentale logique, nous avons d'abord recherché une dose d'UV-C non délétère pour la physiologie de la laitue romaine var *Claudius*. Les effets de cette dose sur la réponse de la laitue à des contraintes abiotiques et biotiques sont ensuite étudiés. Partant du fait que les laitues romaines sont la cible de plusieurs champignons et ravageurs, une grande partie de ce travail s'est intéressée à étudier l'effet de la dose d'UV-C choisie sur la résistance de ce végétal à *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*. Pour ce qui est des contraintes abiotiques, notre choix s'est porté sur la salinité, une contrainte majeure qui touche environ 10% des terres agricoles (Hachicha et al, 1994).

Une première expérience est réalisée (chapitre 3) pour choisir la dose d'UV-C qui n'altère pas le fonctionnement physiologique de la laitue romaine, *Lactuca sativa* L. Pour ce faire, des laitues romaines ont été réparties en quatre lots, un lot témoin ne recevant pas de radiations UV-C, un premier, où les plantes sont exposées à une dose de 0.85 kJ.m⁻², un second exposé à une dose de 1.71 kJ.m⁻² et un troisième lot exposé à une dose de 3.42 kJ.m⁻². L'aspect visuel des feuilles a montré que seul le lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻² présente un aspect similaire à celui du lot témoin. Les résultats obtenus avec l'Handy PEA ont dévoilé une perturbation de la machinerie photosynthétique des deux lots exposés respectivement aux doses 1.71 et 3.42 kJ.m⁻². Cette perturbation est bien associée à une dégradation de la chlorophylle totale chez

ces deux lots, alors que le lot exposé à la dose 0.85 kJ.m^{-2} a toujours montré un comportement photosynthétique similaire à celui du témoin. La dose de 0.85 kJ.m^{-2} qui s'est révélée non délétère, est retenue pour la suite des expériences afin d'étudier son impact sur la réponse de la laitue romaine à deux types de contrainte, biotiques (champignons) et abiotiques (salinité).

Une deuxième expérience (chapitre 4) est réalisée afin d'étudier l'effet de la dose d'UV-C 0.85 kJ.m^{-2} (choisie au chapitre 3) sur la résistance de la laitue romaine à *Botrytis cinerea* (BC87) et *Sclerotinia minor* (SM). Les analyses des résultats confirment que l'exposition des laitues à une faible dose d'UV-C semble renforcer leur résistance aux 2 pathogènes testés dans notre étude. Cette résistance accrue est liée à une augmentation de l'acide gallique, considéré comme un antioxydant, et à une diminution des indicateurs du stress oxydatif (MDA et de H_2O_2).

Partant du fait que la maîtrise de la fertilisation azotée joue un rôle aussi important dans la résistance des plantes contre les pathogènes, nous avons étudié ensuite (chapitre 5) l'effet de la fertilisation azotée et des rayonnements UV-C sur la réponse de la laitue romaine à SM et BC87. Dans un premier volet, on s'est intéressé à étudier l'effet de la fertilisation azotée sur la résistance de la laitue romaine var. *Claudius* à BC87 et SM. Pour cela, les effets de trois doses d'azote : 2, 10 et 20 mM sont étudiés sur le développement de BC87 et SM sur la laitue romaine. L'analyse des surfaces de lésion a bien montré que plus on augmente la concentration en azote dans le milieu plus on augmente la sensibilité de la laitue romaine aux deux pathogènes testés dans cette étude. La concentration d'azote 2 mM est retenue pour étudier son effet conjugué à la dose 0.85 kJ.m^{-2} sur la résistance de la laitue romaine à BC87 et SM. L'analyse des différents paramètres étudiés a confirmé que l'exposition à la dose 0.85 kJ.m^{-2} confère à la laitue romaine une meilleure résistance contre ces deux pathogènes. Cette résistance accrue, attestée par une baisse des teneurs en MDA et du H_2O_2 , est due à un enrichissement en caroténoïdes et en polyphénols totaux.

La laitue romaine est un légume feuille consommé en produit 4^{ème} gamme. Le but de la quatrième partie (chapitre 6) de la thèse est d'étudier l'effet de la dose d'UV-C, choisie lors du troisième chapitre, sur le potentiel de conservation de la laitue

romaine var *Claudius* après récolte. Cette expérience était réalisée en collaboration avec le GRAB d'Avignon. Afin de réaliser cet objectif, des laitues romaines sont récoltées et réparties en 2 lots : lot témoin ne recevant pas de radiations UV-C et un lot exposé à la dose de 0.85 kJ.m⁻². Les plantes issues des deux lots ont été transformées en produits 4^{ème} gamme en passant par le parage, le lavage, l'essorage et le conditionnement. L'analyse des différents paramètres étudiés à savoir, l'aspect visuel, l'indice de performance photosynthétique, l'intensité respiratoire, les teneurs en chlorophylle totale, en vitamine C, en polyphénols totaux et en indicateurs du stress oxydatif a montré que l'exposition des laitues romaines à la dose 0.85 kJ.m⁻² confère à la plante un meilleur aspect visuel, stimule la production des polyphénols totaux, et retarde la dégradation de la chlorophylle totale et de la vitamine C. L'enrichissement en polyphénols totaux renforce la valeur nutritionnelle de la laitue romaine. En outre, le retard de la dégradation de la chlorophylle totale garantit à la laitue une durée de vie prolongée puisque ce retard engendre un retard de maturation du végétal. Le maintien de la vitamine C au cours du stockage suite à l'exposition aux UV-C garantit à la plante une meilleure qualité nutritionnelle.

Dans la dernière partie de ce travail (chapitre 7), nous avons étudié l'effet du priming aux UV-C sur la capacité de la laitue romaine de croître sur milieu salé. Des graines de laitue romaine ont été ainsi réparties en 3 lots soumis à différentes doses d'UV-C : 0, 0,85 et 3,42 kJ.m⁻². Les plantules issues des graines prétraitées aux UV-C (Pr) et non prétraitées (NP) ont été cultivées sur milieu hydroponique additionné ou non de 100 mM NaCl. L'analyse des différents paramètres étudiés montre que le sel restreint la production de la biomasse d'une manière plus marquée dans les racines que dans les feuilles. Cette baisse de la croissance est accompagnée d'une restriction de l'hydratation des tissus, d'une diminution de l'absorption de potassium (K⁺), ainsi que d'une augmentation des niveaux de Na⁺ dans tous les organes. Ces effets ont été partiellement atténués dans les plantes issues de semences pré traitées aux UV-C, mais d'une manière beaucoup plus prononcée avec la dose d'UV-C de 0,85 qu'avec celle de 3,42 kJ.m⁻². Les analyses ont également montré une augmentation des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et de l'activité antioxydante totale dans les feuilles des plantes issues des graines pré-traitées aux UV-C. Les résultats

ont montré que les plantes provenant de graines pré-traitées aux UV-C ont présenté un potentiel élevé d'adaptation à la contrainte saline.

Perspectives

*L'utilisation des rayonnements UV-C n'est pas récente dans notre domaine mais ça reste toujours une piste vierge. En effet, et par rapport aux UV-B, les mécanismes d'action des UV-C ne sont pas encore identifiés, les récepteurs surtout. Donc, je compte développer comme axe postdoctoral, l'étude des cibles moléculaires des UV-C.

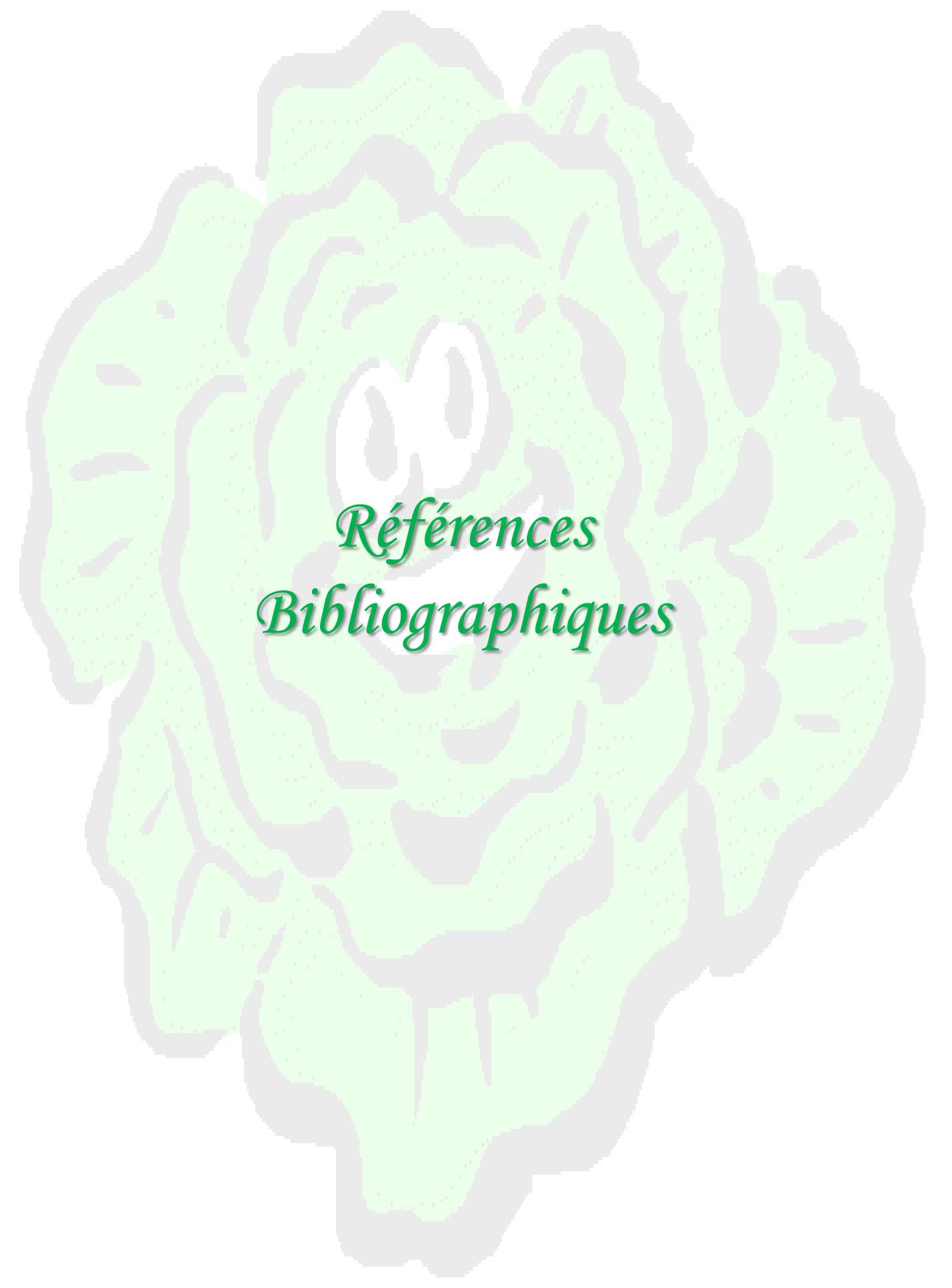
* Nos résultats suggèrent que l'application des UV-C en post récolte induit une amélioration de la résistance de la laitue romaine var *Claudius* aux pathogènes *Botrytis cinerea* et *Sclerotinia minor*. En activité postdoctorale, je compte étudier l'effet de l'application des UV-C au cours de la culture de la laitue romaine ou d'un autre modèle végétal sur ce même aspect de résistance aux champignons. Pour ce faire, une manipulation d'optimisation s'impose, afin de choisir le stade de développement, pendant lequel l'application des UV-C aurait un effet efficace sur l'aspect étudié. Lors de la réalisation de mes travaux de thèse, au cours de l'étude du stress oxydatif, on s'est contenté de voir les indicateurs de ce stress au niveau membranaire (MDA et H₂O₂). L'aspect enzymatique fera l'objet de mes premières perspectives en activités postdoctorales. On compte aussi étudier les activités des enzymes impliquées dans l'indication du stress oxydatif à savoir la SOD, la CAT. Durant ce travail, on s'est basé sur la réponse au stress oxydatif par le biais des polyphénols totaux, on s'est restreint à étudier leurs quantités. Ça serait, donc, primordial de voir leur aspect qualitatif et d'étudier les activités des enzymes impliquées dans leur synthèse et leur régulation, comme la phenylalanine lyase (PAL) et la chalcone synthase (CHS). Lors de mes deux parties de phytopathologie réalisées, je me suis limitée à étudier l'effet des rayonnements UV-C sur l'aspect biochimique de mes plantes, donc, pour la suite de mes travaux, je compte s'intéresser aux aspects moléculaires et histologiques. En outre, je compte voir sur le plan histologique l'évolution de la nécrose causée par les champignons.

* Afin d'approfondir ma maîtrise de l'axe de la technique de la 4^{ème} gamme, je compte étudier, en activités postdoctorales, l'effet des rayonnements UV-C sur le potentiel de conservation d'autres modèles végétaux à intérêt économique et nutritionnel (petit pois, haricot, melon..). La démarche scientifique adaptée dans ce travail sera semblable à celle que j'ai utilisée lors de la réalisation de mes travaux de thèse. Une expérience préliminaire s'impose, donc, afin de choisir une dose hormique d'UV-C propre à chaque modèle végétal.

* Une autre piste aussi que je compte conquérir est celle de l'étude des effets des atmosphères modifiées sur le potentiel de conservation d'un certain nombre de végétaux. Le conditionnement sous atmosphère modifiée repose sur l'altération de la composition de gaz en contact avec la nourriture en remplaçant l'air par un seul gaz ou un mélange de gaz. Il est alors associé à un stockage à faible température, moins de 3 degrés. Le but des emballages sous atmosphère modifiée est d'exclure ou de fortement réduire les niveaux d'oxygène, pour garder l'humidité de la nourriture et pour empêcher la croissance de microbes aériens.

* Toujours dans le domaine de la 4^{ème} gamme, j'envisage d'étudier les effets d'autres facteurs sur le potentiel de conservation après récolte des végétaux (aspersion avec les huiles essentielles, imbibition avec une solution saline, température de conservation...).

*En dernier chapitre de ma thèse, il s'est avéré que le priming des graines aux UV-C induit une réponse favorable sur le développement de la laitue romaine en présence d'une concentration de Na Cl 100 mM. Dans l'avenir je compte étudier l'effet d'un double priming sur ce même aspect mais je compte varier les modèles végétaux et les concentrations salines du milieu.



*Références
Bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

~A~

Abdollahi F & Jafari L. 2012. Effect of NaCl and KNO₃ priming on seed germination of canola (*Bassica Napus L.*) under salinity conditions. *Int J Agr : research and Review.* 2 (5): 573-579.

Aboutalebian MA, Zare Ekbatani G & Sepehri A. 2012. Effects of on-farm seed priming with zinc sulfate and urea solutions on emergence properties, yield and yield components of three rainfed wheat cultivars. *Ann of Bio Research.* (10): 4790-47.

Addiscott T. 2006. Is it nitrate that threatens NN Cometti *et al.* 553 *Hortic. bras.* v. 29, n. 4, out. dez. 2011 life or the scare about nitrate? *J. Sci. Food Agr.* 86: 2005-2009.

Agastian P, Kingsley SJ & Vivekanandan M. 2000. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosyn.* 38: 287-290.

Ait-Barka EA, Kalantari S., Makhlouf J & Aral J. 2000. Effects of UV-C irradiation on lipid peroxidation makers during ripening of tomato fruit. *Australian J Plant Physiol.* 27: 147-152.

Alamgir ANM & Ali MY. 2006. Effects of NaCl salinity on leaf characters and physiological growth attributes of different genotypes of rice (*Oryza sativa L.*). *Bangladesh J Bot.* 35(2): 99-107.

Alegria C, Joaquina P, Margarida D, Elsa MG, Margarida MM & Marta A. 2012. Fresh-cut carrot (cv. Nantes) quality as affected by abiotic stress Heat shock and UV-C irradiation) pre-treatments. *Food Sci Technol.* 48: 197-203.

Alia KVS, Prasad P & Pardha Saradhi P. 1995. Effect of zinc on free radicals and praline in *Brassica* and *Cjanus*. *Phytochem.* 42(1): 45-47.

Allende A & Artes F. 2003. UV-C radiation as a novel technique for keeping quality of fresh processed 'Lollo Rosso' lettuce. *Food Res Int* .36: 739-746.

Allende A, McEvoy JL, Luo Y, Artes F & Wang CY. 2006. Effectiveness of two-sided UV-C treatments in inhibiting natural microflora and extending the shelf-life of minimally processed 'Red Oak Leaf' lettuce. *Food Microbiol.* 23:241-249.

Al-Oudat M, Baydoun SA & Mohammad A. 1998. Effects of enhanced UV-B on growth and yield of two Syrian crops wheat (*Triticum durum* var. Horani) and broad beans (*Vicia faba*) under field conditions. *Environ Exp Bot.* 40 : 11-16.

Ambasht NK & Agrawal M. 1998. Physiological and biochemical responses of *Sorghum vulgare* plants to supplemental ultraviolet- B radiation. *Can J Bot* .76: 1290-1294.

Arnon DI & Hoagland DR. 1940. Crops production in artificial solution and in soils with special reference to factors affecting yields and absorption of inorganic nutrients. *Soil Sci.* 50: 463-484.

Arnott T & Murphy TM. 1991. A comparison of the effects of a fungal elicitor and ultraviolet radiation on ion transport and hydrogen peroxide synthesis by rose cells. *Environ Exp Bot.* 31: 209-216.

Artetxe U, Garcia-Plazaola JI, Hernandez A & Becerril JM. 2002. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 859-863.

Attia H, Arnould N, Karray N, Rabhi M & Lachaal M. 2008. Long-term effects of mild salt stress on growth, ion accumulation and superoxide dismutase expression of *Arabidopsis* rosette leaves. *Physiol Plant.* 132: 293-305.

Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ & Lea PJ. 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant.* 104: 280-292.

Azooz MM. 2009. Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *Int J Agric Biol.* 11:343-350.



Bal AR & Dutt SK. 1984. Effect of soil salinity on growth of *Coix lachryma* Jobi L. *Indian J Plant Physiol.* 27: 398-400.

Balakumar T, Hani V, Vincent B & Paliwal K. 1993. On the interaction of UV-B radiation (280-315 nm) with water stress in crop plants. *Physiol Plant* 87: 217-22.

Balasundram N, Sundram K & Samman S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by products: Antioxydant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem:* 99: 191-203.

Barker DH, Seaton GGR & Robinson SA. 1997. Internal and external photoprotection in developing leaves of the CAM plant *Cotyledon orbiculata*. *Plant Cell Environ.* 20: 617-624.

Barnes PW, Flint SD & Caldwell MM. 1990. Morphological responses of crop and weed species of different growth forms to ultraviolet-B radiation. *American J Bot.* 77: 1354-60.

Barta C, Ka'lai T, Hideg K, Vass I & Hideg E. 2004. Differences in the ROS-generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. *Func Plant Biol.* 31: 23-28.

Beckman CH. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. *Physiol Mol Plant Pathol.* 57: 101-110.

Beninni E, Takahashi H, Neves C & Fonseca I. 2002. Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropônico convencional. *Hort Brasileira,* 20: 183-186.

Binzel ML, Hess FD, Bressan RA & Hasegawa PM. 1988. Intercellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol .* 86: 607-614.

Björn, LO. 2002. Impact of UV and visible light. In Brune D, Hellborg R, Persson BRR, Pääkkönen R (eds) Radiation at home, outdoors and in the workplace. *Scan Science Publisher.* 260-275.

Blumwald E & Poole RJ. 1987. Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet. Induction of Na⁺/K⁺ antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiol.* 83: 884-887.

Boriss H. 2005. Commodity Profile: Lettuce, *Agricultural Issues Center, University of California.* [Consulté le 25 novembre 2010]. <http://aic.ucdavis.edu>.

Bornman JF, Evert RF & Mierzwa RJ. 1983. The effect of UV-B and UV-C radiation on sugar beet leaves. *Protoplasma.* 117: 7-16.

Braun Y, Hassidin M, Lerner HR & Reinhold L. 1986. Studies on H⁺-translocating ATPase in plants of varying resistance to salinity. I. Salinity during growth modulates the protons pump in the halophyte *Atriplex nummularia*. *Plant Physiol.* 81: 1050-1056.

Bravo S, García-Alonso J, Martín-Pozuelo G, Gómez V, Santaella M, Navarro-González I & Periago JM. 2012. The influence of post-harvest UV-C hormesis on lycopene, β-carotene, and phenolic content and antioxidant activity of breaker tomatoes. *Food Res Int.* 49: 296-302.

Brouillard R & Dangles O. 1993. The Flavonoids. Advances in research since 1986, éd. J. B. Harborne, *Chapman and Hall*, London. 565-588.

Brouillard R. 1982. Anthocyanins as Food Colors, éd. P. Markakis, *Academic Press*, New York. 1-40.

Brügnoli E & Bjorkman O. 1992. Growth of cotton under continuous salinity stress /influence on allocation pattern, stomatal and non-stomatal components of photosynthesis and dissipation of excess light energy. *Planta.* 187: 335-347.

Burger J & Edwards GE. 1996. Photosynthetic efficiency, and photodamage by UV and visible radiation, in red versus green leaf *Coleus* varieties. *Plant Cell Physiol.* 37 : 395-399.

~C~

Calabrese EJ & Baldwin LA. 1997. The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *Inter J Toxicology.* 16: 545-559.

Caldwell MM, Robberecht R & Flint SD. 1983. Internal filters:Prospects of UV-acclimation in higher plants. *Physiol Plantarum.* 58: 445-450.

Caldwell MM., Teramura AH & Tevini M. 1989. The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol E.* 4 : 363–366.

Campanella L, Bonanni A & Favero G. 2003. Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor. *Anal Bioanal Chem.* 375: 1011-1016.

Campos JL, Figueras X, Pinol MT, Boronat A & Tiburcio AF. 1991. Carotenoid and conjugated polyamine levels as indicators of ultraviolet-C induced stress in *Arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol.* 53: 689-693.

Chalker-Scott L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem Photobiol.* 70: 1–9.

Chaparzadeh N, Amico ML, Nejad RK, Izzo R & Izzo FN. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. *Plant Physiol Biochem.* 42: 695–701.

Charles MT, Benhamou N & Arul J. 2008a. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit III. Ultrastructural modifications and their impact on fungal colonization. *Postharvest Biol Tec.* 47: 27-40.

Charles MT, Goulet A & Arul J. 2008. Physiological basis of UV-C induced resistance to *Botrytis cinerea* in tomato fruit IV. Biochemical modification of structural barriers. *Postharvest Biol Tec.* 47 : 41–53.

Charles MT, Mercier J, Makhlouf J & Arul J. 2008b. Physiological basis of UV-C-induced resistance to *B. cinerea* in tomato fruit I. Role of pre- and post-challenge accumulation of the phytoalexin-rishitin. *Postharvest Biol Tec.* 47: 10-20.

Chew O & Whelan J. 2003. Dual targeting ability of targeting signals is dependent on the nature of the mature protein. *Func Plant Biol.* 30: 805-812.

Chisari M, Tdaro A, Barbagallou N & Spagna G. 2010. Salinity effects on enzymatic browning and antioxidant capacity of fresh-cut baby Romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.CV.Duende). *Food Chem.* 119: 1502-1506.

Cicco N, Lanorte M, Paragio M & Viggiano M. 2009. A reproducible rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro- method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchem.J.* 91: 107-110.

Coley PD & Kusar TA. 1996. Anti-herbivore defences of young tropical leaves: physiological constraints and ecological tradeoffs. In: Mulkey SS, Chazdon RL, Smith AP, eds. *Tropical forest plant ecophysiology.* New York: Chapman and Hall. 305-335.

Cometti N & Furlani P. 2009. Hidroponia e segurança alimentar. In: FERREIRA A; LIMA ABP; MATTA FP; AMARAL JAT; LOPES JC; PEZZOPANE JEM; FERREIRA MFS; POLANCZYK RA; SOARES TCB. *Tópicos Especiais em Produção Vegetal* I.1 ed. Alegre, ES : Centro de Ciências Agrárias. 517-528.

Coria-Cayupan YS, De Pinto MIS & Nazareno MA. 2009. Variations in Bioactive Substance Contents and Crop Yields of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Cultivated in Soils with Different Fertilization Treatments. *J Agr Food Chem.* 57 : 10122-10129.

Costa II, Gallego SM & Tomaro ML. 2002. Effects of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. *Plant Sci.* 162: 939-945.

Costa L, Vicente AR, Civello PM, Chaves AR & Martínez GA. 2006. UV-C treatment delays postharvest senescence in broccoli florets. *Postharvest Biol Tec.* 39: 204-210.

Crookes PR & Grierson D. 1983. Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cellwall degradation. *Plant Physiol.* 72: 1088-1093.



Dai Q, Yan B, Huang S, Liu X & Peng S. 1997. Response of oxidative stress defense system in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiol Plantarum.* 101: 301-308.

Dat JF, Inze D & Van Breusegem F. 2001. Catalase-deficient plants: Tools for in Planta studies on the role of hydrogen peroxide. *Redox Rep.* 6: 37-42.

Datnoff LE, Elmer WH & Huber DM. 2007. Mineral nutrition and plant disease. *American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul.*

Davis RM, Subbarao KV, Raid RN & Kurtz EA. 1997. Compendium of lettuce diseases.vii-79.

Day TA & Vogelmann TC. 1995. Alterations in photosynthesis and pigment distributions in pea leaves following UV-B exposure. *Physiol Plant.* 94: 433-440.

DeLong JM & Steffen KL. 1997. Phytosynthetic function, lipid peroxidation and tocopherol content in spinach leaves during exposure to UV-B radiation. *Canadian J Plant Sci.* 77: 453-459.

Dewanto V, Wu XZ, Kafui KA & Liu RH. 2002. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3010-3014.

Dionisio-Sese ML & Tobita S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135: 1-9.

Dixon RA & Steele CL. 1999. Flavonoids and isoflavonoids: a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4 (10): 394-400.

Dodd IC, Critchley C, Woodall GS & Stewart GR. 1998. Photoinhibition in differently coloured juvenile leaves of *Syzygium* species. *J. Exp. Bot.* 49: 1437-1445.

Droby S, Chalutz E, Horev B, Cohen V, Gaba V, Wilson CL & Wisniewski M. 1993. Factors affecting UV-induced resistance in grapefruit against the green mould decay caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Pathol.* 42: 418-424.

Dsikan R, Mackerness AHM, Hancock JT & Neill SJ. 2001. Regulation of the Arabidopsis transcriptosome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127: 159-172.

Duncan DB. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* .11: 1-42.

Dupont MS, Mondin Z, Williamson G & Price KR. 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive. *J Agr food Chem* .48:3957-3964.

Durand M & Lacan D. 1994. Sodium partitioning within the shoot of soybean. *Physiol Plant.* 91: 65-71.

~E~

Edwards C, Read J & Sanson G. 2000. Characterising sclerophylly: some mechanical properties of leaves from heath and forest. *Oecologia* .123:158-167.

Elad Y, Yunis H & Volpin H. 1993. Effect of nutrition on susceptibility of cucumber, eggplant and pepper crops to *Botrytis cinerea*. *Can J Bot.* 71: 602-8.

El-Ghorab AH, Shibamoto T & Ozcan M. 2007. Chemical composition and antioxidant activities of buds and leaves of capers (*Capparis ovata* Desf. Var. *Canesencene*) cultivated in Turkey. *J Essent Oil Res.* 19: 72-77.

Erkan M, Wang SY & Wang CY. 2008. Effect of UV treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and decay in strawberry fruit. *Postharvest Biol Tec.* 48: 163-171.

Esptein E, Norlyn JD, Rush DW, Kingsbury RW, Kelly DB, Cunningham GA & Wrona AF. 1980. Saline culture of crops : A genetic approach. *Science* .210: 399-404.

~F~

Fonseca JM & Rushing J. 2006. Effect of ultraviolet-C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biol Tec* . 40: 256-261.

Foot JP, Caporn SJM, Lee JA & Ashenden TW. 1996. The effect of long-term ozone fumigation on the growth, physiology and frost sensitivity of *Calluna vulgaris*. *New Phytol.* 133: 503-11.

Frohnmeier H & Staiger D. 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated response in plants: balancing damage and protection. *Plant Physiol* . 133: 1420-1428.

Furuya M & Glaston A. 1965. Flavonoid complexes in *Pisum sativum* L. *J Phytochem.*4: 285.

~G~

Ghiyasi M, Abbasi Seyahjani A, Tajbakhsh M, Amirnia R & Salehzadeh H. 2008. Effect of osmopriming with polyethylene glycol (8000) on germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds under salt stress. *Res J Biol Sci.* 3: 1249-1251.

Ghoohestani A, Ghelsary H, Morteza Z & Dolathkhali I. 2012. Effect of seed priming of Tomato with salicylic acid, ascorbic acid and hydrogen peroxide on germination and plantlet growth in saline conditions. *Inter J of Agr Plant Prod.* 3 (5): 700-712.

Gonai T, Kawahara S, Tougou M, Satoh S, Hashiba T, Hirai N, Kawaide H, Kamiya Y & Yoshioka T. 2004. Abscisic acid in the thermoinhibition of lettuce seed germination and enhancement of its catabolism by gibberellins. *J Exp Bot.* 55: 111-118.

González-Aguilar GA, Villa-Rodriguez JA, Fernando Ayala-Zavala J & Yahia EM. 2010. Improvement of the antioxidant status of tropical fruits as a secondary response to some postharvest treatments. *J Food Sci Tec.* 21: 475-482.

Gonzalez-Aguilar GA, Wang CY, Buta JG & Krizek DT. 2001. Use of UV-C irradiation to prevent decay and maintain postharvest quality of ripe 'Tommy Atkins' mangos. *Int J Food Sci Tec.* 36: 767-773.

González-Aguilar GA, Zavaleta-Gatica R & Tiznado-Hernández ME. 2007. Improving postharvest quality of mango 'Haden' by UV-C treatment. *Postharvest Biol Tec.* 45: 108-116.

Goodman RN, Kiraly Z & Wood KR. 1986. The Biochemistry and Physiology of Plant Disease. *Columbia MO. University of Missouri Press.*

Gorham J, Wyn Jones RG & Bristol A. 1990. Partial characterization of the trait for enhanced K⁺-Na⁺ discrimination in the D genome of wheat. *Planta.* 180: 590-597.

Gould KS, Kuhn DN, Lee DW & Oberbauer SF. 1995. Why leaves are sometimes red. *Nature.* 378: 241-242.

Gow CY, Pin-Der D & Hui-LT. 2002. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food Chem.* 79: 307-313.

Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A & Mansfield J. 2000. The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 123: 441-450.

Greenberg BM, Wilson MI, Gerhardt KE & Wilson KE. 1996. Morphological and physical responses of *Brassica napus* to Ultraviolet B radiation: photomodification of ribulose 1-5 biphosphate carboxylase/ oxygenase and potential acclimation processes. *J Plant Physiol.* 148: 78-85.

Grunberg K & Taleisnik E. 1991. Salt tolerance in tomato: An assessment of the contribution of phloem retranslocation of the sodium balance of growing leaves. *Plant Physiol Biochem.* 29: 559-564.

Guerrier G. 1983. Capacité germinative des semences en fonction des doses graduelles en NaCl. Importance des transferts sur milieux sodés ou témoin. *Rev Gén Bot.* 90: 3-21.



Hachicha M & Mtimet A. 1994. Les sols salés et la salinisation en Tunisie. *Bulletin de la direction des sols.* 15:270-324.

Halva S & Craker LE. 1996. Manual for Northern Herb Growers. *HSMP Press.*

Hanato T, Kagawa H, Yasuhara T & Okuda T. 1988. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull.* 36: 2090-2097.

Harbone JB. 1982. Introduction to Ecological Biochemistry, 2nd edition, *Academic Press*, New York.

Harborne JB. 1988. The flavonoids: recent advances. In: Goodwin TW, ed. *Plant pigments*. London: *Academic Press*. 299–343.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK & Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant physiol Plant Mol Biol*. 51: 463-499.

Heller W & Geiger H. 1988. The Flavonoids, Advances in Research since 1980, éd. J. B. Harborne, Chapman and Hall, London. 399-425.

Hernandez M, Fernandez-Garcia N, Diaz-Vivancos P & Olmos E. 2010. A different role for hydrogen peroxide and the antioxidative system under short and long salt stress in *Brassica oleracea* roots. *J Exp Bot*. 61: 521-535.

Hernández FA, Roblesa PA, Gómez PA, Callejasa AT & Artésa F. 2010. Low UV-C illumination for keeping overall quality of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biol Tec*. 55: 114–120.

Hoagland DR & Arnon DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Experiment Station, Berkley*. Circular 347

Hobbs, EL & Waters, WE. 1964. Influence of nitrogen and potassium on susceptibility of *Chrysanthemum morifolicum* to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 54: 674-684.

Hoffland E, Jeger M & Van Beusichem ML. 2000. Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant soil*. 218: 239-247.

Hogarth PJ. 1999. The biology of mangroves. *Oxford University Press, New York.*

Hong S-I, Lee HH & Kim D. 2007. Effects of hot water treatment on the storage stability of satsuma mandarin as postharvest decay control. *Postharvest Biol Tec.* 43 : 271-279.

Houghton JT, Ding Y, Griggs DJ, Nogueir M, Van Der Linden PJ, Dai X, Maskell K & Johnson CA. 2001. Climate change. Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). *New York: Cambridge University Press.*

Houghton RA, Lawrence KT, Hackler JL & Brown S. 2001. The spatial distribution of forest biomass in the Brazilian Amazon: a comparison of estimates. *Global Change Biology.* 7: 731-746.

Huber DM & Thompson IA. 2007. Nitrogen and plant disease. In : L. E. Datnoff, W. H. Elmer, D. M. Huber (Eds.), *Mineral nutrition and plant disease.* APS Press, Saint Paul, MN, USA. 31-44.

Hyun-Jin K, Jorge MF, Chieri K, Mark K & Ju-Hee C. 2008. Quality of fresh-cut tomatoes as affected by salt content in irrigation water and post-processing ultraviolet-C treatment. *Sci Food Agric.* 88: 1969-1974.

~I~

Imaida K, Fukushima T, Shivai T, Ohtani M, Nakanishi K & Ito N. 1983. Promoting activities of butylatedhydroxyanisole and butylatedhydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of c₃-glutamyltranspeptidase-positive foci development in the liver of rats. *Carcinogen.* 75(4): 895-899.

Iyengar ERR & Reddy MP. 1996. Photosynthesis in highly salt tolerant plants. In "Pesserkali, M. (Ed.), *Handbook of photosynthesis*". Marshal Dekar, Baten Rose, USA. 897-909.



Jacoby GA. 1994. Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *Eur J Clin Microbiol.* 13(1): 2-11.

Jagadeesh SL, Charles MT, Garipey Y, Goyette B, Raghavan GSV & Vigneault C. 2009. Influence of postharvest UV-C hormesis on the bioactive components of tomato during post-treatment handling. *Food Bioprocess Technol.* doi:10.1007/s11947-009-0259-y.

James RA, Davenport RJ & Munns R. 2006. Physiological Characterization of two genes for Na⁺ exclusion in Durum Wheat, Nax1 and Nax2. *Plant Physiology.* 142(4): 1537.

Jansen MAK, Gaba V & Greenberg BM. 1998. Higher plants and UV-B radiation: balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci.* 3: 131-135.

Jayasinghe C, Gotoh N & Aoki T. 2003. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric Food Chem.* 51: 4442-4449.

Jeschke WD, Wolf O & Hartung W. 1992. Effect of NaCl on flows and partitioning of C, N and mineral ions in whole plants of white lupin, *Lupinus alba*. L. *J. Exp. Bot.* 43: 777-788.

Johannes S. 2003. Ultraviolet B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends Plant Sci.* 11: 526-533.

Jordan BR, He J, Chow WS & Anderson JM. 1992. Changes in mRNA levels and polypeptide subunits of ribulose 1,5- Biphosphate carboxylase in response to supplementary Ultraviolet B radiation. *Plant Cell Environ.* 15: 91- 98.

Jourdan E, Ongena M & Thonart P. 2008. Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnologie Agronomie. Société Environnement.* 12: 437-449.



Kaliamoorthy S & Rao AS. 1994. Effect of salinity on anthocyanins accumulation in roots of maize. *Ind J Plant Physiol.* 37: 169-70.

Karishma J, Sunita K & Guruprasad KN. 2004. Effect of UV-B radiation on antioxidant enzymes and its modulation by benzoquinone and α - tocopherol in cucumber cotyledons. *Current Sciences.* 87 (1).

Karray-Bouraoui N, Hamrouni H, Rabhi M, Harbaoui F, Attia H, Oueslati S, Ksouri R & Lachaâl M. 2010. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of two *Mentha pulegium* provenances to salt stress. *J Med Plant Res.* 4: 2518-2524.

Karray-Bouraoui N, Harbaoui F, Rabhi M, Jallali I, Ksouri R, Attia H, Msilini N & Lachaâl M. 2011. Different antioxidant responses to salt stress in two different provenances of *Carthamus tinctorius* L. *Acta Physiol Plant.* 33: 1435-1444.

Kaya C, Tuna AL, Ashraf M & Altunlu H. 2007. Improved salt tolerance of melon (*Cucumis melo* L.) by the addition of proline and potassium nitrate. *Environ Exp Bot.* 60: 397-403.

Ken GR, Ewald ES, Chris W, Kenneth R & Markham M. 2001. Flavonoids and UV Photoprotection in *Arabidopsis* Mutants *Z. Naturforsch.* 56c: 745-754.

Khavarinejad RA & Mostofi Y. 1998. Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars. *Photosyn.* 35: 151-154.

Kim HJ, Fonseca JM, Kubota C, Kroggel M & Choi JH. 2008. Quality of fresh-cut tomatoes as affected by salt content in irrigation water and post-processing ultraviolet-C treatment. *J Sci Food Agric.* 88: 1969-1974.

Klaper R, Frankel S & Berenbaum MR. 1996. Anthocyanin content and UV-B sensitivity in *Brassica rapa*. *Photochem Photobiol.* 63: 811-813.

Krizek DT, Britz SJ & Mirecki RM. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire lettuce. *Physiol Plant.* 103: 1-7.

Krol M, Gray GR, Hurry VM, O'quist G, Malek L & Huner NPA. 1995. Low-temperature stress and photoperiod affect an increased tolerance to photoinhibition in *Pinus banksiana* seedlings. *Can J Bot.* 73: 1119-27.

Kumer S, Naidu KM & Sehtiya HI. 1994. Causes of growth reduction in elongating and expanding leaf tissue of Sugarcane under saline conditions. *Aust J Plant Physiol.* 21: 79-83.

Kyparassis A, Petropoulou Y & Manetas Y. 1995. Summer survival of leaves in a soft leaved shrub(*Phlomis fruticosa* L.;Labiatae) under mediterranean field conditions: avoidance of photoinhibitory damage through decreased chlorophyll contents. *J. Exp. Bot.* 46: 1825-1831.



Larson RA. 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*. 27: 969-978.

Lecompte F, Abro MA & Nicot PC. 2010. Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant Pathol*. 59: 891-899.

Lecompte F, Abro MA & Nicot PC. 2012. Can plant sugar mediate the effect on nitrogen fertilization on lettuce susceptibility of two necrotrophic pathogens: *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Pathol* .DOI 10.1007/s1 1104-012-1577-9.

Lee DW. 1986. Unusual strategies of light absorption in rain-forest herbs. In: Givnish TJ, ed. On the economy of plant form and function. Cambridge: *Cambridge University Press*. 105-131.

Lepeduš H, Cesar V & Krsnik-Rasol M. 2004. Guaiacol peroxidases in carrot (*Daucus carota* L.) root. *Food Technol Biotechnol*. 42(1): 33-36.

Lichtenthaler HK. 1988. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology*. 148: 350-383.

Liu C, Han X, Cai L, Ying T & Jiang Z. 2011. Postharvest UV-B irradiation maintains sensory qualities and enhances antioxidant capacity in tomato fruit during storage. *Postharvest Biol Tec*. 59:232-237.

Liu JP, Zhang M & Wang WY. 2004. Chinese herbal medicines for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev*. CD003642.

Loughrin JH & Kasperbauer MJ. 2001. Light reflected from colored mulches affects aroma and phenol content of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *J Agric Food Chem.* 49: 1331-1335.

Lu YR & Yeap Foo L. 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 75: 197-202.

~M~

M'rah S, Ouerghi Z, Eymeryb F, Reyb P, Hajji M, Grignon C & Lachaâl M. 2007. Efficiency of biochemical protection against toxic effects of accumulated salt differentiates *Thellungiella halophila* from *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Physiol.* 164: 375-384.

Maas EV. 1986. Salt tolerance of plants. *Appl Agri Res.* 1: 12-26.

Macías-García P, Ordidge M, Vysini E, Waroonphan S, Battey NH, Gordon MH, Hadley P, John P, Lovegrove JA & Wagstaffe A. 2007. Changes in the flavonoid and phenolic acid contents and antioxidant activity of red leaf lettuce (Lollo Rosso) due to cultivation under plastic films varying in ultraviolet transparency. *J Agric Food Chem.* 25 :10168-10172.

Maharaj R, Arul J & Nadeau P. 1999. Effect of photochemical treatment in the preservation of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. *Capello*) by delaying senescence. *Postharvest Biol Technol.* 15: 13-23.

Mahdavian K, Kalantari KM, Ghorbanli M & Torkzade M. 2008. The effects of salicylic acid on pigment contents in ultraviolet radiation stressed pepper plants. *Biol. Plant.* 52: 170-172.

Mahmoudi H, Baatour O, Ben Salah I, Nasri N, Wissal A, Huang J, Zargouni H, Hannoufa A, Lachaâl M & Ouerghi Z. 2012. Enhanced accumulation of root hydrogen peroxide is associated with reduced antioxidant enzymes under isoosmotic NaCl and Na₂SO₄ salinities. *Afr J Biotechnol.* 11: 8500-8509.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C & Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79:727-747.

Marina AP, Hernán GR, Gustavo AM & Pedro MC. 2011. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria × ananassa*, Duch). *Postharvest Biol Technol.* 59: 94-102.

Markham KR, Tanner GJ, Caasi-Lit M, Whitecross MI, Nayudu M & Mitchell, KA. 1998. Possible protective role for 3,4-dihydroxyflavones induced by enhanced UV-B in a UV-tolerant rice cultivar. *Phytochemistry.* 49: 1913-1919.

Markham KR. 1982. Techniques of Flavonoid Identification. *Academic Press*, London. 36-51.

Marquenie D, Lammertyn J, Geeraerd AH, Soontjens C, Van Impe JF, Nicolaï BM & Michiels CW. 2002. Inactivation of conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructigena* using UV-C and heat treatment. *Int J Food Microbiol.* 74:27-35.

Mars KA, Alfenito MR, Lloyd AM & Walbot V. 1995. A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature.* 375: 397-400.

McDonald MB. 2000. Seed priming. Black M, Bewley JD (eds). *Seed Technology and Its Biological Basis.* Sheffield Academic Press Ltd., Sheffield, UK. 287-325.

Mendez M, Jones DG & Manetas Y. 1999. Enhanced UV-B radiation under field conditions increase anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. *New Phytol.* 144: 275-82.

Mengel K, Kirkby EA, Kosegarten H & Appel T. 2001. Principles of plant nutrition. Dordrecht: Kluwer Academic.

Mercier J, Baka M, Reddy B, Corcuff R, Arul J. 2001. Shortwave Ultraviolet Irradiation for Control of Decay Caused by *Botrytis cinerea* in Bell Pepper: Induced Resistance and Germicidal Effects. *J Amer Soci Hort Sci.* 126: 128-133.

Merlin JC, Statoua A & Brouillard R. 1985. *Phytochemistry.* 24 :1575-1581.

Merzlyak MN & Solovchenko AE. 2002. Patterns of pigment changes in apple fruits during adaptation to high sunlight and sunscald development. *Plant Biochem Physiol.* 40: 679-684.

Mhiri A. 1997. Mobilisation, exploitation et conservation des ressources naturelles sur la rive sud de la Méditerranée. *Synthèse des communications du premier séminaire du centenaire de l'Institut National Agronomique de Tunis.* 10-11-12 Novembre. 1-12.

Middleton EM & Teramura AH. 1993. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. *Plant Physiol.* 103: 741-752.

Míková K. 2002. The regulation of antioxidants in food. In: Watson DH (ed) *Food Chemical Safety, Additives*, vol 2, 1st edn. Woodhead Publishing Limited, Boca Raton.

Mita S, Murano N, Akaike M & Nakamura K. 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta amylase and on the accumulation of anthocyanins that are induced by sugars. *Plant J.* 11: 841-51.

Mol J, Grotewold E & Koes R. 1998. How genes plant flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 3: 212-217.

Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16: 15-24.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25: 239-250.

Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167:645-663.

Murphy TM. 1983. Membranes as targets of ultraviolet radiation. *Physiologiae Plantarum.* 58: 381-388.

Murray JR, Smith AG & Hackett WP. 1994. Differential dihydro-flavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in the juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.). *Planta.* 194: 102-9.

~N~

Naczk M & Shahidi F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 41: 1523-1542.

Nasri N, Kaddour R, Mahmoudi H, Baatour O, Bouraoui N & Lachaâl M. 2011. The effect of osmopriming on germination, seedling growth and phosphatase activities of lettuce under saline condition. *Afr J Biotechnol.* 10: 14366-14372.

Navarrete M, Lecompte F, Collange B & Tchamitchian M. 2010. Systèmes de culture et qualité de la laitue. Comment repenser les systèmes de culture pour réduire l'usage des pesticides et les risques des résidus ? *Innovations Agronomiques.* 9: 67-84.

Navarro JM, Flores P, Garrido C & Martinez V. 2006. Changes in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem.* 96: 66-73.

Noctor G & Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.

~O~

Olsson LC, Veit M, Weissenbock G & Bornman JF. 1998. Differential to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry.* 49: 1021-1028.

Ortuño A, Botía JM., Fuster MD., Porrás I., García-Lidón A & Del Río JA. 1997. Effect of Scoparone (6,7-Dimethoxycoumarin) Biosynthesis on the Resistance of *Tangelo Nova*, *Citrus paradisi*, and *Citrus aurantium* Fruits against *Phytophthora parasitica*. *J Agric Food Chem.* 45 (7): 2740-2743.

Oueslati S, Karray Bouraoui N, Attia H, Rabhi M, Ksouri R & Lachaâl M. 2010. Physiological and antioxidant responses of *Mentha pulegium* (Pennyroyal) to salt stress. *Acta Physiol Plant.* 32: 289-296.

Ouhibi C, Attia H, Urban L, Lachaal M & Aarrouf J. 2014. Effet de différentes doses d'UV-C sur l'aspect visuel et les paramètres de fluorescence chlorophyllienne de la laitue Romaine. *Tun .J. Med Plant Nat Prod.* 9: 4. in press.



Pan J, Vicente AR, Martínez GA, Chaves AR & Civello PM. 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *J Sci Food Agric.* 84: 1831-1838.

Parida AK, Das AB & Das P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J Plant Biol.* 45: 28-36.

Perkins-Veazie P, Collins JK & Howard L. 2007. Blueberry fruit response to postharvest application of ultraviolet radiation. *Postharvest Biol Technol.* 47: 280-285.

Peterson CA & Enstone DE. 1996. Functions of passage cells in the endodermis and exodermises of roots. *Physiol Plant.* 97: 592-598.

Peterson CA. 1988. Exodermal casparian bands: their significance for ion uptake by roots. *Physiol Plant.* 72: 204-208.

Phoenix GK, Gwynm-Jones D, Lee JA & Callaghan TV. 2002. Ecological importance of ambient solar ultraviolet radiation to a sub- arctic health community. *Plant Ecol.* 165: 263-273.

Piazza P. 2002. Members of the c1/pl1 regulatory gene family mediate the response of maize aleurone and mesocotyl to different light qualities and cytokinins. *Plant Physiol.* 128: 1077-1086.

Polle A. 1997. Defense against photooxidative damage in: Scandalios J. (Ed) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.* 785-813.

Pombo MA, Dotto MC, Martínez GA & Civello PM. 2009. UV-C irradiation delays strawberry fruit softening and modifies the expression of genes involved in cell wall degradation. *Postharvest Biol Technol.* 51: 141-148.

Pombo MA, Hernán GR, Gustavo A, Martínez P & Civello M. 2011. UV-C treatment affects the expression and activity of defense genes in strawberry fruit (*Fragaria×ananassa*, Duch.) .*Postharvest Biol Technol.* 59: 94-102.

Pongprasert N, Yoshihiko S, Sumiko S & Hiroshi G. 2011. A novel postharvest UV-C treatment to reduce chilling injury (membrane damage, browning and chlorophyll degradation) in banana peel. *Sci Hortic.* 130:73-77.

Porto CD, Calligaris S, Celloti E & Nicoli MC. 2000. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. *J Agric Food Chem.* 48:4241-4245.

Prieto P, Pineda M & Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 269:337-341.



Rajendran L, Ravishankar GA, Venkataraman LV & Prathiba KR. 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influence by nutrient stress and osmoticum. *Biotech Lett.* 14: 707-12.

Ramanjulu S, Veeranjanyulu K & Sudhakar C. 1993. Physiological changes induced by NaCl in mulberry var. Mysore local. *Ind J Plant Physiol.* 36: 273-5.

Ramzi M, Franck L, Huguet S & Félicie L. 2010. Effect of Water Deficit and Salt Stress on Oxidative Parameters and Antioxidants Systems in Tomato (*Solanum lycopersicum L.*) fruits. *Plant Nutrition and abiotic stress tolerance III. Plant stress.* 5:98-106.

Rashmi R, Ram Prasad M, Shachi Shuchi A, Aparna S, Sanjay Kumar R & Shashi Pandey R. 2011. UV-C and UV-C pre-treatments induce physiological changes and artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua L.* An antimalarial plant. *Journal Photochem Photobiol: Biology.* 105: 216-225.

Rau W, Seigner L & Schrott EL. 1991. The role of carotenoids in photoprotection against harmful effects of UV-B radiation. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 372: 539.

Rausch T, Kirsch M, Low R, Lehr A, Viereck R & Zhigang A. 1996. Salt stress responses of higher plants: The role of proton pumps and Na⁺/H⁺-antiporters. *J Plant Physiol.* 148: 425-433.

Razmjoo K, Heydarizadeh P & Sabzalian MR. 2008. Effect of salinity and drought stresses on growth parameters and essential oil content of *Matricaria chamomile.* *Int J Agric Biol.* 10: 451-454.

Ribas-Agustí A, Gratacós-Cubarsí M, Sárraga C, García-Regueiro JA & Castellari M. 2011. Analysis of eleven phenolic compounds including novel p-coumaroyl derivatives in lettuce (*Lactuca sativa L.*) by ultra-high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. *Phytochem Anal.* 22: 555-563.

Rodov V, Ben-Yehoshua S, Kim JJ, Shapiro B & Ittah Y. 1992. Ultraviolet illumination induces scoparone production in kumquat and orange fruit and improves decay resistance. *J Amer Soc Hort Sci.* 117: 788-792.

Roetzma J, Vandestaaij J, Bjorn LO & Caldwell M. 1997. UV-B as an environmental factor in plant life : Stress and regulation. *Trends Ecol Evol.* 12: 22-28.

Romani A, Pinelli P, Galardi C, Sanib G, Cimato A & Heimler D. 2002. Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chem.* 73: 337-342.

Ross JA & Kasum CM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. *Ann. Review Nut.* 22: 19-34.

Rozbeh F, Saeed S & Delfie M. 2011. The effect of NaCl seed priming on salt tolerance, antioxidant enzyme activity, proline and carbohydrate accumulation of Muskmelon (*Cucumis melo* L.) under saline condition. *Afr J Biotechnol.* 6: 1363-1370.

Ryalls J, Neuenschwander U, Willits M, Molina A, Steiner HY & Hunt M. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell.* 8: 1809-1819.

~S~

Santamaria P. 2006. Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *J Sci Food Agr.* 86: 10-17.

Sarni-Manchado P & Cheynier.V. 2006. Les polyphenols en agroalimentaire. *Edition, science et technologie.*

Schachtman DP & Liu W. 1999. Molecular pieces to the puzzle of the interaction between potassium and sodium uptake in plants. *Trends Plant Sci.* 4 (7): 281-287.

Shalata A & Neumann PM. 2001. Exogenous ascorbic acid (Vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *J Exp Bot.* 52: 2207-2211.

Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel AC & Mi HM. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Compt Rendus Biol.* 331: 433-441.

Sharma M, Kishore K & Gupta SK. 2001. Cardioprotective potential of *Ocimum sanctum* in isoproterenol induced myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem.* 225: 75-83.

Sharma PD. 2006. First edition, University of Dehli, Alpha Science International Ltd. Dheli. *Plant Pathol.* 691.

Sherwin HW & Farrant JM. 1998. Protection mechanisms against excess light in the resurrection plants *Craterostigma wilmsii* and *Xerophyta viscosa*. *Plant Growth Regul.* 24: 203-210.

Siddiqui A, Shahnaz D, Mjaved Z & Neelofar H. 2011. Role of ultra violet (UV-C) radiation in the control of root infecting fungi on groundnut and mung bean. *Pak J Bot.* 43(4): 2221-2224.

Singleton VL & Rosi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 16:144-158.

Slater F. 1984. Overview of Methods Used For Detecting Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology* .105: 283-305.

Smith JL, Burritt DJ & Bannister P. 2000. Shoot dry weight, chlorophyll and UV-B-absorbing compounds as indicators of a plant's sensitivity to UV-B radiation. *Ann Bot.* 86: 1057-1063.

Sol HH. 1967. The effect of different nitrogen sources on (1) the sugars and amino acids leached from leaves and (2) the susceptibility of *Vicia faba* to attack by *Botrytis fabae*, Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. *Gent.* 32: 768-775.

Stapleton AE. 1992. Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell.* 4: 1353-1358.

Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In Dey PM, Harborne JB (eds.) *Plant Biochem*, London, Academic Press.

Strid A & Porra RJ. 1992. Alterations in pigment content in leaves of *Pisum sativum* after exposure to supplementary UV-B. *Plant Cell Physiol.* 33: 1015-1023.

Strid Å, Chow WS & Anderson JM, 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim Biophys Acta.* 1020: 260-268.



Tattini M, Remorini D, Pinelli P, Agati A, Saracini E, Traversi ML & Massai R. 2006. Morpho-anatomical, physiological and biochemical adjustments in response to root zone salinity stress and high solar radiation in two Mediterranean evergreen shrubs, *Myrtus communis* and *Pistacia lentiscus*. *New Phytologist.* 170: 779-794.

Terrentroy A. 1994. Tomate serre: enquête sur le *Botrytis* dans les cultures de tomate précoce. APREL Bulletin N°S-641 Chamber of Agriculture of Bouches du Rhône, France.

Toor RK, Savage GP & Lister CE. 2006. Seasonal variation in the antioxidant composition of the green house grown tomatoes. *J. food comp analysis.* 19: 1-10.

Tsormpatsidis E, Henbest E, Davis DJ, Battey NH, Hadley P & Wagstaffe A. 2007. UV irradiance as a major influence on growth, development and secondary products of commercial importance in Lollo Rosso lettuce 'Revolution' grown under polyethylene films. *Environ Exp Bot.* (submitted for publication).

~V~

Vats V, Grover JK & Rathi SS. 2002. Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 79: 95-100.

Velikova V, Yordancv I & Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151: 59-66.

Verhoeff, K. 1965. Studies of *Botrytis cinerea* in tomatoes. Mycelial development in plants growing in soil with various nutrient levels, as well as in internodes of different age. *Neth. J. Plant Pathol.* 71: 167-75.

Vicente AR, Pineda C, Lemoine L, Civello PM, Martinez GA & Chaves AR. 2005. UV-C treatments reduce decay, retain quality and alleviate chilling injury in pepper. *Postharvest Biol Technol.* 35: 69-78.

~W~

Wade HK, Bibikova TN, Valentine WJ & Jenkins GI. 2001. Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *Plant J.* 25: 675-685.

Wang Y & Nil N. 2000. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic Sci Biotechnol.* 75: 623-627.

~Y~

Yadav R, Flowers TJ & Yeo AR. 1996. The involvement of the transpirational by pass flow in sodium uptake by high and low sodium transporting lines of rice developed through intravariatal selection. *Plant Cell Env.*19:329-336.

Yagi K. 1976. A Simple Fluorometric Assay For Lipoperoxide In Blood Plasma *Biochemical Medicine.* 15:212-216.

Yamasaki H. 1997. A function of colour. *Trends Plant Sci.* 2: 7-8.

Yong-Gui P & He Z. 2012. Effect of UV-C Radiation on the Quality of Fresh-cut Pineapple. *Procedia Engineering.* 37: 113-119.

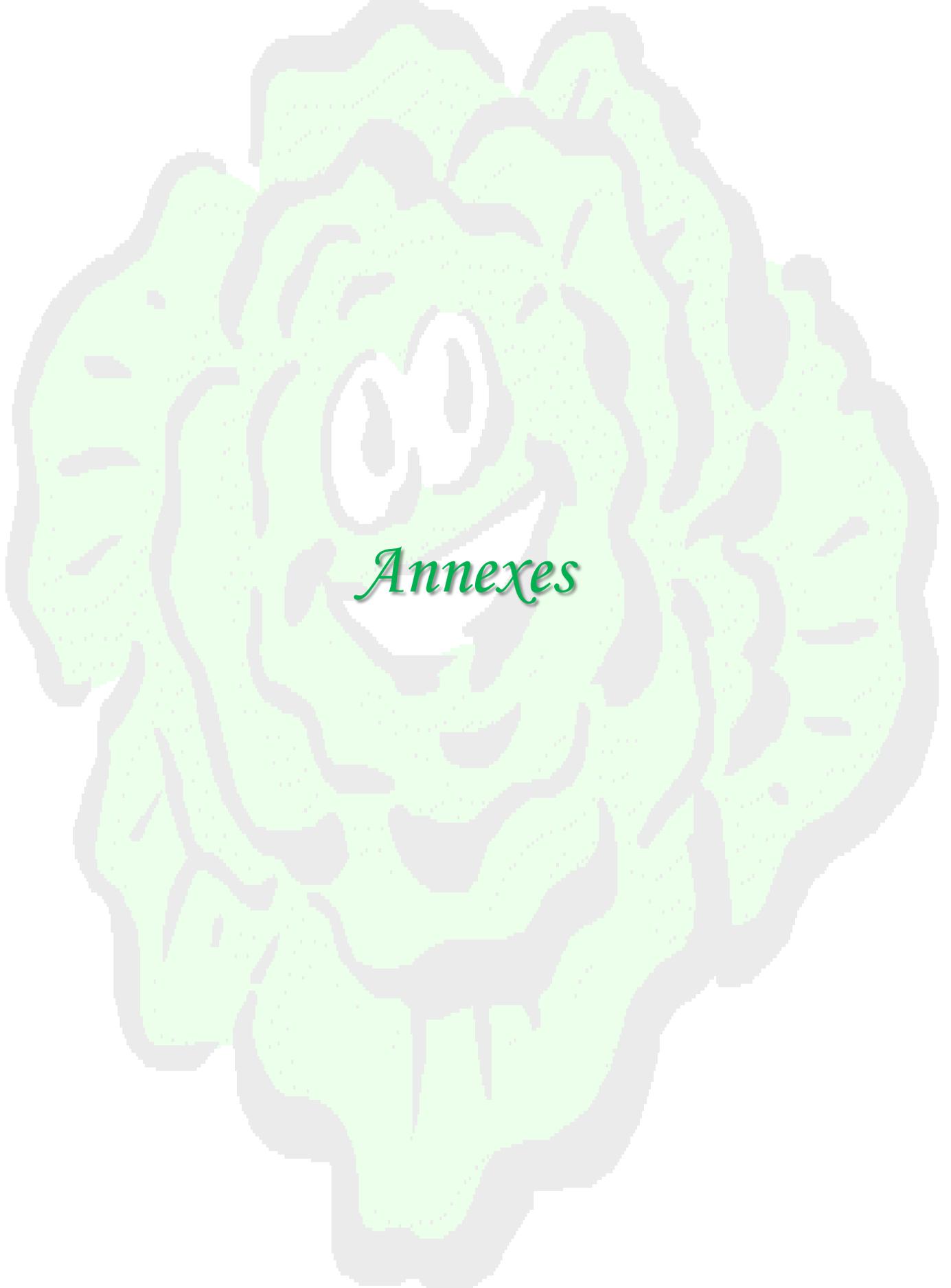
~Z~

Zapata JP, Serrano M, Pretel MT & Amoros AM. 2003. Changes in ethylene evolution and polyamines profiles of seedlings of nine cultivars of lettuce in response to salt stress during germination. *Plant Sci.* 164: 557-563.

Zhang H, Yamamoto Y, Ishikawa Y, Zhang W, Fisher G & Wydrzynski T. 1997. A fourier transform infrared spectroscopic study of the effects of hydrogen peroxide and high light on protein conformations of photosystem II. *Photosynthesis Research.* 52: 215-223.

Zhang L, Zhaoxin L , Fengxia L & Xiaomei B. 2006. Effect of sigma irradiation on quality-maintaining of fresh-cut lettuce. *Food Control*. 17 : 225-228.

Zhu JK. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci* .6:66-72.



Annexes

ANNEXES

Tableau A.1. Evolution de la surface de lésion (exprimée en cm²) induite par les deux pathogènes (BC87 et SM) chez les laitues romaines cultivées sur milieux différemment enrichis en azote. Moyennes de 10 répétitions. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements

Jours, J	Concentration en azote, mM		
	2	10	20
	<i>Sclerotinia minor</i> (SM)		
J1	0,08±0,01 ^a	0,08±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b
J2	1,04±0,2 ^a	1,6±0,2 ^b	1,2±0,3 ^a
J3	3,8±0,4 ^a	4,4±0,3 ^b	4,29±0,5 ^{ab}
J4	9,03 ±0,8 ^a	12,6±0,1 ^b	14,7±1,7 ^c
	<i>Botrytis cinerea</i> (BC87)		
J1	0,04±0,003 ^a	0,04±0,004 ^a	0,05±0,007 ^b
J2	1,11±0,003 ^a	0,11±0,06 ^a	0,42±0,2 ^b
J3	2,1±0,21 ^a	3,4±0,84 ^b	4,6±0,21 ^c
J4	4,3±0,41 ^a	5,9±0,05 ^b	8,79±0,93 ^c

Tableau A.2. Evolution de la surface de lésion (cm²) causée par les deux pathogènes chez les laitues romaines traitées ou non avec des UV-C durant les 4 jours suivant l'inoculation. Moyennes de 10 répétitions. Les différences entre les valeurs des trois traitements azotés ont été analysées avec ANOVA et la comparaison des moyennes avec le test de Duncan au seuil de probabilité $p=0,05$. La même lettre indique qu'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre ces traitements

Jours, J	Doses UV-C, kJ.m ⁻²	
	0	0,85
<i>Sclerotinia minor</i>		
J1	0,08 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,01 ^a
J2	1,04 ± 0,15 ^b	1,09 ± 0,2 ^b
J3	3,84 ± 0,37 ^c	3,72 ± 0,44 ^c
J4	9,03 ± 0,82 ^d	6,02 ± 0,94 ^e
<i>Botrytis cinerea</i>		
J1	0,04 ± 0,003 ^a	0,006 ± 0,01 ^b
J2	0,10 ± 0,03 ^c	0,50 ± 0,27 ^d
J3	2,14 ± 0,20 ^e	0,70 ± 0,33 ^f
J4	4,25 ± 0,41 ^g	2,96 ± 0,62 ^h