

# ETUDE COMPARATIVE DES MECANISMES BIOCHIMIQUES DE RESISTANCE AU STRESS HYDRIQUE DE DEUX VARIETES DE BLE DUR

W. Zerrad, B.S. Maataoui<sup>1</sup>, S. Hilali<sup>1</sup>, S. El Antri et A. Hmyene

Laboratoire de Biochimie, d'Environnement et d'Agroalimentaire, Faculté des Sciences et  
Techniques de Mohammedia, Maroc

<sup>1</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement et du Développement, Faculté des Sciences et  
Techniques de Settât, B.P. 577, 26000 Settât, Maroc  
s.hilali@yahoo.fr

(Received 2 May 2007 - Accepted 30 May 2008)

## RESUME

*Au Maroc, les cultures céréalières, importantes cultures, se concentrent principalement dans les zones arides et semi arides là où les conditions climatiques limitent sérieusement le potentiel de production. En raison du caractère imprévisible de la contrainte hydrique, la tolérance s'avère la stratégie la plus efficace dans les situations de stress sévère et prolongé. Lors de cette tolérance on assiste à des modifications de structures ou de fonctions qui augmentent la probabilité de survie et de production des plantes lors de ces conditions.*

*Dans ce travail, nous avons fixé comme objectif d'évaluer l'effet du stress hydrique sur des paramètres moléculaires tels que, la synthèse de la proline, des sucres totaux et réducteurs et des protéines totales, et d'examiner les différences en ces paramètres entre deux variétés de blé dur Karim et Tomouh.*

*L'analyse des résultats a montré que, lors de la restriction de l'alimentation en eau, le comportement des plantes se manifeste différemment d'un jour de stress à un autre et d'une variété à une autre.*

*En général, les conditions de contrainte hydrique, ont entraîné chez les deux variétés étudiées une réduction du potentiel hydrique, une accumulation d'osmoticums dont la proline et les sucres totaux et réducteurs ainsi qu'une augmentation dans la synthèse des protéines.*

*En conclusion, l'étude a montré que les deux variétés étudiées ont utilisé les mêmes stratégies de tolérance au stress hydrique à la différence des taux de synthèse des marqueurs moléculaires étudiés.*

**Mots clés :** blé dur, stress hydrique, tolérance

## ABSTRACT

*In Morocco, cereal crops, important crops, concentrate mainly in arid and semi arid areas where climatic conditions limit severely the production potential. Due to the unpredictable nature of the water stress, tolerance is the most effective strategy in the situation of severe and prolonged stress. During this tolerance we assist in modification of*

structures or functions that increase the probability of survival and production plants in these conditions.

The purpose of this study is to evaluate the effect of water stress on molecular parameters such as the synthesis of proline, total and reducing sugars and proteins total, and to examine the differences in these parameters between two varieties of durum wheat Karim et Tomouh.

The examination results showed that at the restriction of water supply, the behaviour of plants manifests itself differently in stressful day to another and from one variety to another.

In general, water conditions have resulted in two varieties studied a reduction of water potential, an accumulation of osmolytes whose proline and sugars total and reducing and an increase in protein synthesis.

In conclusion, the study showed that the two varieties studied used the same strategies of tolerance vis-à-vis the water stress but the only difference is at the rate of synthesis of molecular markers studied.

**Keywords:** wheat, water stress, tolerance, molecular markers

## INTRODUCTION

Les stress environnementaux, notamment le stress hydrique, limitent sérieusement la croissance des plantes ainsi que la productivité végétale (Wang *et al.*, 2003).

Au Maroc, le déficit hydrique constitue un important facteur limitant pour la production des cultures céréalières, puisque 60% de la superficie réservée aux céréales se situe dans les zones arides et semi-arides (El Mourid *et al.*, 1996) qui se caractérisent par une forte irrégularité des précipitations et de fortes températures sur une grande partie de l'année (Boutfirass *et al.*, 1994).

Plusieurs études ont montré que, lors d'un déficit hydrique, les plantes adoptent des stratégies d'adaptation qui diffèrent d'une espèce à une autre et qui font intervenir une large combinaison de facteurs morphologiques, physiologiques et biochimiques (Monneveux & Belhassen, 1997).

En effet, pour maintenir la balance de la force osmotique, après la chute du potentiel hydrique causée par le stress hydrique (El Mourid, 1988; Casals, 1996), les plantes accumulent un certain nombre d'osmolytes tel que la proline, les carbohydrates et la betaine (Wang *et al.*, 2003) qui, en association avec d'autres facteurs tels que la réduction de la transpiration par la fermeture des stomates et la réduction de la surface foliaire (Karrou *et al.*, 2001), permettent de garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevé que possible (Monneveux & Nemmar, 1986; Bouzoubaa *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003).

Cette chute du potentiel hydrique stimule non seulement le phénomène d'osmorégulation mais également l'inhibition (Bewley & Larsen, 1980) ou la synthèse de nouvelles protéines (Kermode & Bewley, 1989) dont les protéines LEA qui assurent une protection de l'ensemble vitale des protéines cellulaires (David & Grongnet, 2001) et les protéines de choc thermique qui permettent un maintien des structures protéiques et membranaires de la cellule végétale (Baker *et al.*, 1988).

La présente étude vise à évaluer l'effet du stress hydrique sur des paramètres moléculaires tels que, la synthèse de la proline, des sucres totaux et réducteurs et des protéines totales, et d'examiner les différences en ces paramètres entre deux variétés de blé dur : Karim et Tomouh.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de deux variétés de blé dur Karim et Tomouh fournies gracieusement par l'Institut National des Recherches Agronomiques de Settat.

Les graines ont été imbibées pendant 4 heures dans l'eau de robinet puis mises en culture à température ambiante et à l'obscurité pendant 7 jours avec un arrosage une fois par jour.

### Mise en stress hydrique

Après 7 jours de germination, les germes de blé des deux variétés ont subi un stress hydrique de 3, 5, 7 et 9 jours par arrêt d'arrosage. Une partie de chaque variété a été arrosée normalement et a été considérée comme témoin. Les coléoptiles des germes de blé, ainsi obtenus, ont été séparés des racines.

### Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée en plaçant des échantillons de poids déterminé dans une étuve portée à 75°C.

Les échantillons ont été pesés, à des intervalles de temps réguliers, jusqu'à obtention d'un poids constant.

### Extraction et dosage des protéines totales

L'extraction des protéines totales a été faite par broyage, au mortier, d'un poids déterminé de chaque échantillon avec du tampon Tris-HCl 0.1M (pH 7.2), contenant du  $\beta$  mercaptoéthanol à 1% (v/v) et du glycérol à 5% (v/v). Les broyats ainsi obtenus ont été centrifugés à 4500 g à 4°C pendant 15 min. les surnageants ont été récupérés puis conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de Lowry *et al.* (1952), en présence d'une gamme étalon de sérum albumine bovine.

### Extraction et dosage de la proline

L'extraction de la proline a été effectuée par chauffage, au bain marie à 85°C, de 50 mg de substance végétale avec 2 ml de méthanol à 40 % (v/v) pendant 30 min. La proline libre ainsi obtenue a été dosée par la méthode de Troll et Lindsley (1955).

### Extraction et dosage des sucres totaux et réducteurs

L'extraction des sucres totaux et réducteurs a été effectuée par broyage dans le mélange éthanol-eau : 80-20 (v/v). Les broyats ainsi obtenus ont été centrifugés à 4500 g à

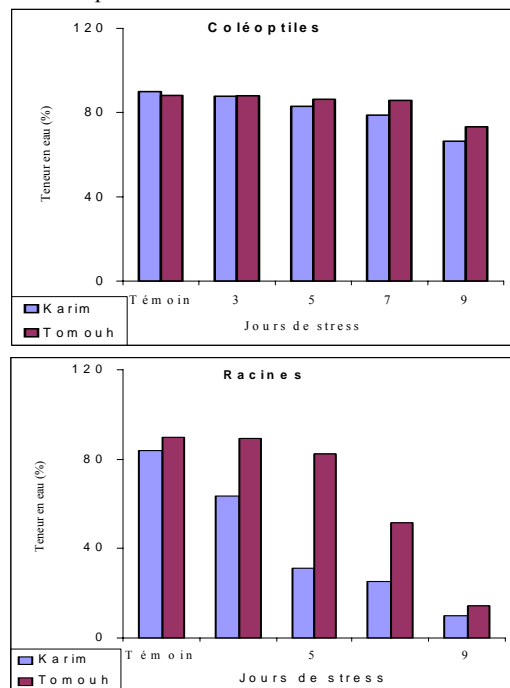
4°C pendant 15 min. les surnageants contenant les sucres ont été récupérés puis conservés à – 20 °C jusqu'à utilisation. Le dosage des sucres totaux a été effectué par la méthode de Ashwel (1957) et celui des sucres réducteurs par la méthode de Nelson (1944) modifiée par Samogy (1952) en présence d'une gamme étalon de glucose.

Pour tous les paramètres étudiés, les dosages ont été effectués en triple.

## RESULTATS

### Teneur en eau

La comparaison de l'évolution de la teneur en eau des deux variétés de blé dur (Figure 1) a montré que le stress hydrique entraîne une chute du pourcentage d'eau aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles. Cette chute devient de plus en plus nette au fur et à mesure que le niveau de stress s'accroît. Ce résultat est conforme avec les résultats obtenus par El Mourid (1988), Samir (1993) et Casals (1996), qui ont également signalé que l'effet dépressif de la carence en eau sur l'état hydrique de la plante peut être irréversible, si la période de stress est prolongée. On note chez les deux variétés, une diminution plus nette de la teneur en eau au niveau racinaire en comparaison avec les coléoptiles. Cette diminution reste beaucoup plus accentuée pour la variété Karim que la variété Tomouh aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles.

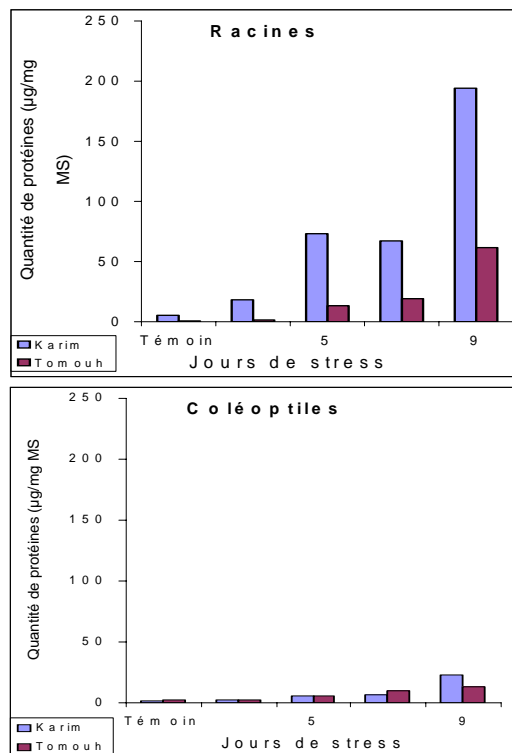


**Figure 1. Evolution de la teneur en eau dans les racines et les coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress.**

**Protéines totales**

L'évolution des teneurs en protéines totales, extraites à partir des coléoptiles et des racines des deux variétés a montré (Figure 2) qu'il y a une corrélation positive entre la sévérité du stress hydrique et le niveau de protéines totales produites aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles. Plusieurs auteurs ont décrit que le stress peut provoquer une baisse ou une hausse des protéines totales (Rai *et al.*, 1983 ; Kumar & Singh, 1991).

Pour les deux variétés étudiées, la synthèse protéique racinaire en réponse au déficit hydrique débute très tôt pour atteindre des taux qui dépassent nettement ceux des coléoptiles. Cette synthèse est plus marquée au niveau de la variété Karim aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles que la variété Toumouh.



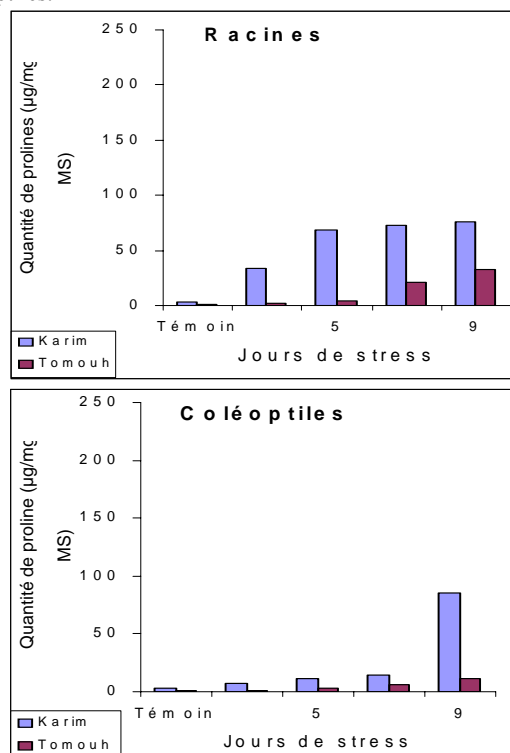
**Figure 2. Evolution des teneurs en protéines totales des racines et des coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress.**

**Dosage de la proline**

Le dosage a montré, en comparant l'évolution de la quantité de proline au niveau des racines et des coléoptiles des deux variétés en fonction de la durée du stress hydrique

(Figure 3), que l'augmentation de la quantité de proline est en corrélation positive avec le degré du stress hydrique. Ce résultat est en conformité avec les recherches de plusieurs auteurs dont Monneveux et Nemmar (1986), Bellinger *et al.* (1991) et Gorham (1993).

Au niveau des coléoptiles des deux variétés étudiées, la teneur en proline demeure très faible durant les sept premiers jours de stress et l'accumulation de cet acide aminé ne commence à être visible qu'à partir du 9<sup>ème</sup> jour. Pour les racines, la synthèse de proline commence bien précocement surtout chez la variété Karim. En absence de contrainte hydrique, le taux de proline chez les deux variétés reste très faible et presque stable pour les racines et les coléoptiles.



**Figure 3. Evolution de la quantité de proline des racines et des coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress.**

**Dosage des sucres totaux**

Le dosage des sucres totaux, extraits à partir des racines et des coléoptiles des deux variétés étudiées, a montré (Figure 4) qu'il y a, généralement, une corrélation positive entre la quantité de sucres accumulés et la durée du stress hydrique. Ce résultat est en accord avec ceux de certains chercheurs dont Ben Abdellah et Ben Salem (1993). En comparant l'évolution de la quantité de sucres totaux chez les deux variétés, on note que cette

accumulation est plus nette au niveau des racines par rapport aux coléoptiles. Au niveau des racines, la variété Karim commence à accumuler les sucres totaux très tôt (dès le 3<sup>ème</sup> jour) par rapport à la variété Tomouh chez laquelle cette hausse ne devient remarquable qu'à partir du 7<sup>ème</sup> jour du stress. Au niveau des coléoptiles, même si l'accumulation reste faible pour les deux variétés étudiées mais elle dépasse la quantité de sucres totaux des témoins qui reste généralement très faible.

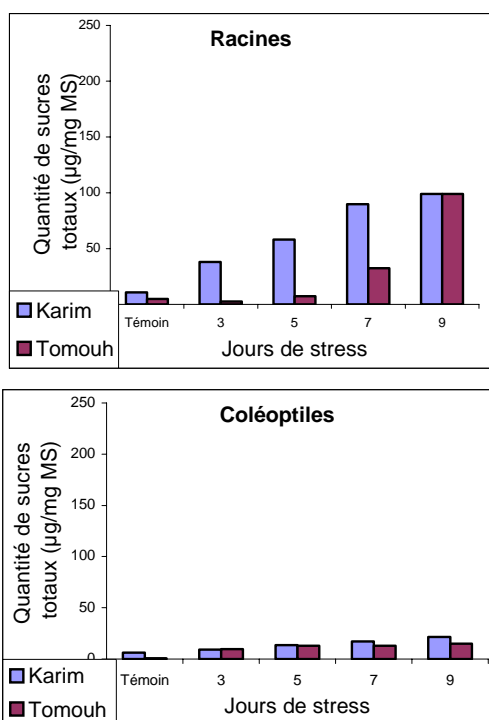


Figure 4. Evolution de la quantité de sucres totaux des racines et des coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress.

#### Dosage des sucres réducteurs

La comparaison entre l'évolution de la quantité de sucres réducteurs des deux variétés étudiées en fonction de la durée du déficit hydrique (Figure 5) a montré qu'il y a une hausse dans le niveau des sucres réducteurs au niveau des racines et des coléoptiles. Cette augmentation devient de plus en plus nette au fur et à mesure que l'intensité du stress s'accroît. Pour les deux variétés, le taux de sucres réducteurs racinaires dépasse celui des coléoptiles durant les neuf jours de stress. Au niveau des racines, comme dans le cas des sucres totaux, c'est la variété Karim qui accumule le plus de sucres réducteurs. Pour les coléoptiles la quantité de sucres réducteurs accumulée par la variété Karim ne dépasse celle de Tomouh qu'à partir du 5<sup>ème</sup> jour du stress. En absence de déficit hydrique, les quantités de sucres réducteurs des deux variétés restent faibles aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles.

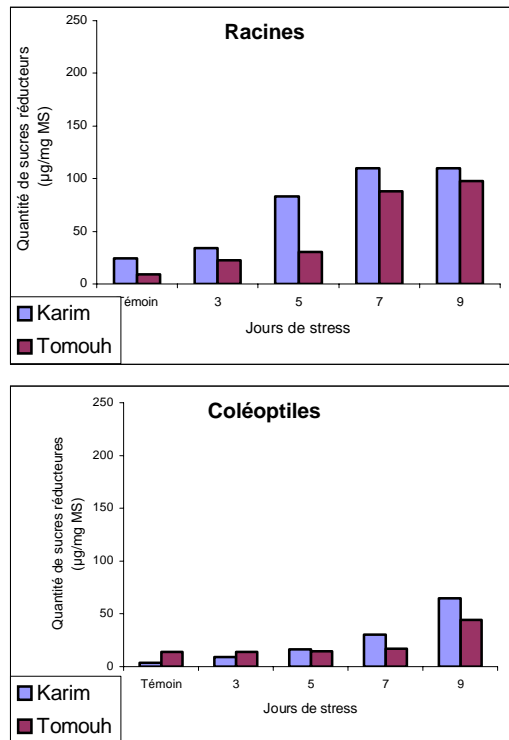


Figure 5. Evolution des sucres réducteurs des racines et des coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress.

### DISCUSSION

Les résultats obtenus, à partir de l'étude de certains marqueurs moléculaires de résistance au stress hydrique chez les deux variétés Karim et Tomouh soumises à des conditions de déficit hydrique, par arrêt d'arrosage, ont montré que la réponse à cet aléa dépend de deux facteurs : variété et durée du stress. Pour se conformer aux conditions de stress, les deux variétés ont édifié de nouveaux mécanismes d'adaptation et de nouvelles compositions cellulaires. Ainsi, pour garder le potentiel de turgescence aussi élevé que possible, après la chute très remarquable de la teneur en eau surtout au niveau des racines, les deux variétés ont accumulé certains osmotocums à l'intérieur de leurs cellules dont la proline et les sucres. Le dosage de la proline libre a montré que le stress hydrique a entraîné l'accumulation de cette molécule chez les deux variétés. Cette augmentation de la concentration, qui était très nette au niveau des racines par rapport aux coléoptiles, peut être due aussi bien à l'inhibition de l'oxydation des protéines qu'à la dégradation des protéines en leurs précurseurs (Barnetts & Naylor, 1966 ; Morris *et al.*, 1969). L'explication de l'accumulation de la proline est confuse; certains auteurs dont Hanson *et al.* (1977), affirment que c'est une conséquence pathologique, d'autres comme Stewart & Lee (1974) suggèrent que la proline à de fortes concentrations agisse comme soluté pour l'ajustement osmotique, et



sert aussi de réservoir de composés azotés et de carbone pour une utilisation ultérieure dans la croissance. Les sucres solubles totaux ont aussi connu une augmentation de la concentration en réponse au déficit hydrique pour les deux variétés. En effet les sucres, même s'ils représentent des osmotocums beaucoup moins puissants, participent également au maintien de la balance de la force osmotique pour garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevés que possible (Bouzoubaa *et al.*, 2001). Ils permettent également une préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines (Darbyshire, 1974). Cette augmentation de la concentration des sucres solubles totaux, qui était très remarquable au niveau des racines que des coléoptiles, a été accompagnée par une dégradation de certains disaccharides d'où l'accumulation des sucres réducteurs qui ont montré, eux également, une augmentation de la concentration durant la période de stress pour les deux variétés de blé dur. En plus du phénomène d'osmorégulation, les deux variétés de blé dur Karim et Tomouh ont répondu aux conditions de stress hydrique par une hausse dans le niveau de protéines totales aussi bien au niveau des racines qu'au niveau des coléoptiles. Cette augmentation est due à une activation d'un ensemble de gènes permettant la synthèse des protéines spécifiques associées aux stress telles que les protéines «LEA» qui assurent une protection de l'ensemble vital des protéines cellulaires (David & Grongnet, 2001), et les protéines de choc thermique qui permettent un maintien des structures protéiques et membranaires de la cellule végétale (Baker *et al.*, 1988).

En conclusion, l'étude a montré que les deux variétés étudiées ont utilisé les mêmes stratégies de tolérance vis à vis du stress hydrique mais la seule différence qui existe c'est au niveau des taux de synthèse des marqueurs moléculaires étudiés.

#### REFERENCES

- Baker, J., Steel, C.H. and Dure, I.L. 1988. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.*, 11: 277-291.
- Barnetts, N.M. and Naylor, A.W.. 1966. Amino acids and protein metabolism in bermuda during water stress. *Plant Physiol.*, 41: 1222-1230.
- Ben Abdallah, N. et Ben Salem, M. 1993. Paramètres morphophysologiques de sélection pour la résistance à la sécheresse des céréales. In : Monneveux, P. et Ben Salem, M. (Eds). *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Montpellier (France), 15-17 décembre 1992, INRA, Les Colloques, pp : 173-190.
- Berlinger, Y., Bensaoud, A. and Larher, F. 1991. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. In: Acevedo, E., Conesa, A.P., Monneveux, P. and Srivastava, J.P. (Eds). *Physiology-Breeding of winter cereals for stressed Mediterranean environments*. Montpellier, France, July 3-6 1989, (55) : 449-458.
- Boutfirass, M., Karrou, M. et El Mourid, M. 1994. Irrigation supplémentaire et variétés de blé dans les zones semi-arides du Maroc. In : El Gharous M., Karrou M. et El Mourid M. (Eds) ; *Aquis et perspectives de la recherche agronomique dans les zones arides et semi-arides du Maroc*. INRA-MIAC Eds. Actes de conférence, Rabat 24-27 Mai 1994, Maroc, pp : 176-179.
- Bouzoubaa, Z., El Mourid, M., Karrou, M. et El Gharous, M. 2001. *Manuel d'analyse chimique et biochimique des plantes*. Eds INRA Maroc.

- Casals, M.L. 1996. *Introduction des mécanismes de résistance à la sécheresse dans un modèle dynamique de croissance et de développement du blé dur*. Thèse de Doctorat de l'INRA Paris Grignon, 93p.
- Darbyshire, B. 1974. The function of the carbohydrate units of tree fungal enzymes in their resistance to dehydration. *Plant Physiol.*, 54: 717-721.
- David, J.C. et Grongnet, J.F. 2001. Les protéines de stress. *INRA Prod. Anim.*, 14(1): 29-40.
- El Mourid, M. 1988. *Performance of wheat and barley cultivars under different soil moisture regimes in semi arid region*. Ph.D. dissertation, Iowa State University Ames USA, 229p.
- El Mourid, M., Karrou, M. et El Gharous, M. 1996. La recherche en aridoculture respectueuse de l'environnement. *Al Awamia*. 92 : 69-81.
- Gorham, J. 1993. Stress tolerance and mechanisms behind tolerance in barley. In: *Agronomical and physiological characterization of different barley genotypes to salt stress*. Settat 1993, meeting.
- Hanson, A.D., Nelson, C.E. and Everson, E.H. 1977. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop. Sci.*, 17: 720-726.
- Kumar, P.K. and Singh, R.A. 1991. Germination and metabolism in susceptible and tolerant mung bean genotypes under moisture stress. *Indian J. Plant Physiol.*, 34: 267.
- Lowry, O.H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1952. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Monneveux, P. et Nemmar, M. 1986. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie*, 6 : 583-590.
- Morris, C.J., Thompson, J.F. and Jonson, C.M. 1969. Metabolism of glutamic and N-acetylglutamic acid in leaf discs and cell free extracts of higher plants. *Plant Physiol.*, 44: 1023-1026.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method of determination. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380.
- Rai, V.K., Singh, G., Thakur, P.S. and Banyal, S. 1983. Protein and amino-acid relationship during water stress in relation to drought resistance. *Plant Physiol. Biochem.*, (Suppl.), 10: 161.
- Samir, K. 1993. *Réponses agrophysiologiques de trois variétés de blé dur au stress hydrique en zones semi-arides marocaines*. Thèse de troisième cycle de la faculté des sciences de Meknes, 185p.
- Samogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195: 19-23.
- Sarda, X., Vansuyt, G., Tusch, D., Casse-Delbart, F. et Lamaze, T. 1993. Les signaux racinaires de la régulation stomatique. In : Monneveux, P. et Ben Salem, M. (Eds). *Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale*. Montpellier (France), 15-17 décembre 1992, INRA, Les Colloques, pp. 75-79.
- Stewart, G.R. and Lee, J. 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta.*, 12: 279-289.
- Wang, W.X., Brak, T., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. 2003. Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilising protein from *Populus*. In: Vasil IK (ed), *Plant biotechnology 2000 and beyond*. Kluwer, Dordrecht, pp. 439-443.