

CHAPITRE XIX

VARIATIONS SOUS CONTRAINTE HYDRIQUE DE LA TENEUR EN ACIDES AMINÉS LIBRES FOLIAIRES DU MIL

C. MOULINEAU

DPVE, Centre d'Études de Cadarache
13108 Saint Paul Lez Durance, Cedex

L'analyse des acides aminés libres foliaires a permis d'établir une relation entre la résistance à la contrainte hydrique et les modifications du métabolisme azoté chez deux populations de mil (HKP et IC 30). L'acide aminé majoritaire dans les plantes témoins est l'alanine. La contrainte hydrique s'accompagne d'une diminution de la teneur en alanine et d'une augmentation de la teneur en proline. Ces phénomènes sont exacerbés dans le cas de plantes cultivées en conditions contrôlées par rapport aux plantes cultivées sur le terrain. Les deux populations possèdent des réponses à la contrainte hydrique assez semblables. La compensation entre l'accumulation et la disparition d'acides aminés en relation avec la diminution du contenu relatif en eau des plantes explique, en partie, le faible ajustement osmotique observé chez le mil.

I - INTRODUCTION

Lors d'une contrainte hydrique, des modifications de la morphologie, de la physiologie et du métabolisme d'une plante sont observées. Les phénomènes réactionnels (Chevone *et al.*, 1990 ; Chapin, 1991) apparaissent suivant un ordre chronologique précis (Hsiao, 1973). Ils ont été classés (Turner, 1986) dans trois grands groupes : (i) évitement de la sécheresse, (ii) évitement ou retardement de la déshydratation et (iii) tolérance à la déshydratation.

Lorsque le potentiel hydrique d'une plante diminue, l'accumulation de solutés provoque la baisse du potentiel osmotique et permet le maintien de la pression de turgescence des cellules. Cette accumulation rend compte de modifications importantes du métabolisme. Les solutés accumulés sont de natures diverses : des ions (potassium), des sucres solubles (saccharose, glucose, fructose), des acides organiques (malate, pyruvate), des polyols (sorbitol, glycérol) et des composés du métabolisme azoté (amines, acides aminés libres). Leur contribution à l'osmolarité cellulaire dépend de leur nature et du taxon étudié (Morgan, 1992 ; Premachandra et Joly, 1992).

L'étude du métabolisme azoté d'une plante soumise à une contrainte hydrique montre une accumulation globale d'acides aminés, mais la teneur de chaque acide aminé pris séparément n'augmente pas systématiquement. Leur variation (accumulation de proline, glutamine, asparagine et glycine-bétaïne souvent décrite) dépend de la nature du stress appliqué et du taxon étudié (Jones *et al.*, 1980 ; Belanger *et al.*, 1990 ; Ranieri *et al.*, 1989). La proline est considérée comme un indicateur métabolique de contrainte. Il est non spécifique (contrainte hydrique ou thermique, salinité du sol). Lors d'une contrainte

hydrique, la proline interviendrait comme régulateur osmotique et permettrait la protection des structures membranaires contre la déshydratation. Elle constitue aussi un moyen de stockage de carbone réduit et d'azote pendant le stress (Stewart *et al.*, 1965)

Sur le terrain, les prélèvements sont réalisés dans des conditions comparables, 63, 70 et 75 jours après émergence. Le matériel végétal est alors fixé dans l'azote liquide. Cependant, lors du premier prélèvement (63 jours après émergence) les morceaux de feuille n'ont pas été fixés dans l'azote liquide. Les échantillons ont été lyophilisés avant expédition. Chacun d'entre eux correspond à la moyenne de 8 brins épiés.

Dans les deux cas, le contenu relatif en eau, noté RWC (Relative Water Content), est systématiquement déterminé lors d'un prélèvement.

• Au laboratoire, chaque échantillon (frais ou lyophilisé) est broyé en présence d'azote liquide, de 2,5 ml d'eau additionnée d'acide chlorhydrique (pH 3,4), puis de 2,5 ml de chloroforme. Le broyat, conservé à 4°C pendant 18 heures, est centrifugé à 4000 tours/min pendant 9 minutes. Le surnageant est filtré et congelé à -18°C.

La teneur de chaque acide aminé est déterminée après dérivation, par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). La dérivation des acides aminés par l'accrochage du groupe phénylisocarbamyl permet leur détection lors de l'analyse en lumière UV à 254 nm. Cette dérivation est effectuée sur 20 et 40 µl de filtrat après ajout d'une quantité connue de norleucine (étalon interne, acide aminé naturellement absent dans les plantes) et après séchage, en milieu basique. Les échantillons dérivés sont lyophilisés et conservés à sec, à -18°C, jusqu'à leur analyse.

La séparation et l'analyse des phénylthiocarbamyl (pct) amino-acides nécessite un équipement d'HPLC (PHILIPS) qui comprend : un passeur d'échantillons réfrigéré à 4°C, une boucle d'injection (20 µl), un injecteur automatique, deux pompes à haute pression, une précolonne (MERCK : référence 50962.0001) et une colonne de 12,5 cm de type C18 phase inverse (MERCK : référence 16855.0001) placées dans un four à 38°C, et un détecteur UV-visible. L'intégration de la surface des pics est réalisée par un programme informatique sur un micro-ordinateur compatible.

III - RESULTATS

A - Etude des plantes cultivées en conditions contrôlées

1) Comparaison pour HKP et IC 30 des teneurs en acides aminés des plantes témoins

La composition en acides aminés libres foliaires de plantes témoins, cultivées en conditions contrôlées, est comparée pour les populations HKP et IC 30 (figure 1). Chaque valeur correspond à la moyenne des mesures réalisées sur trois plantes. Pour chaque acide aminé, les teneurs mesurées pour la population IC 30 sont légèrement supérieures (acide glutamique en particulier). Les résultats montrent que l'alanine est l'acide aminé majoritaire (teneur supérieure à 20 µmol/g MS). La teneur en acide glutamique est voisine de 15 µmol/g MS et celle de l'acide aspartique proche de 10 µmol/g MS. Les autres acides aminés sont plus faiblement représentés (teneur égale ou inférieure à 5 µmol/g MS).

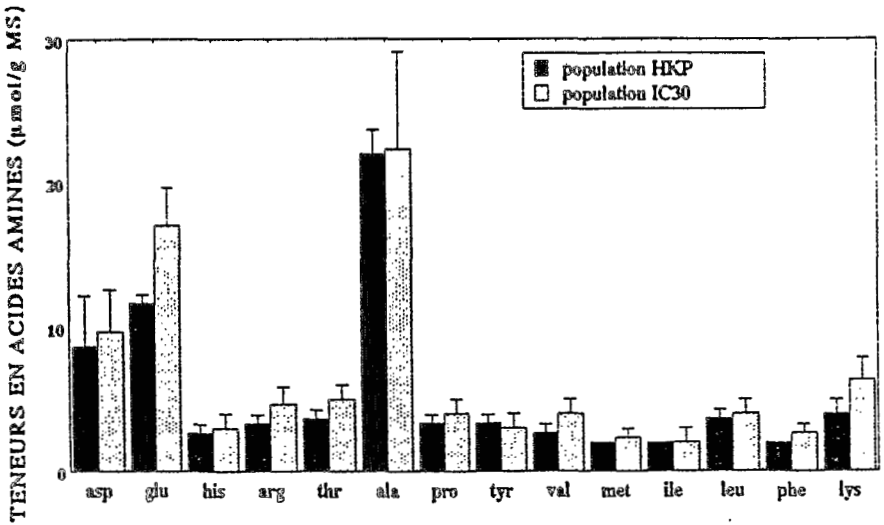


Figure 1

Comparaison des teneurs en acides aminés pour les plantes témoins des populations *HKP* et *IC 30*. Les plantes sont cultivées en conditions contrôlées. Chaque barre de l'histogramme correspond à la moyenne des valeurs obtenues après l'analyse de trois plantes. Les prélèvements ont été réalisés 70 jours après semis.

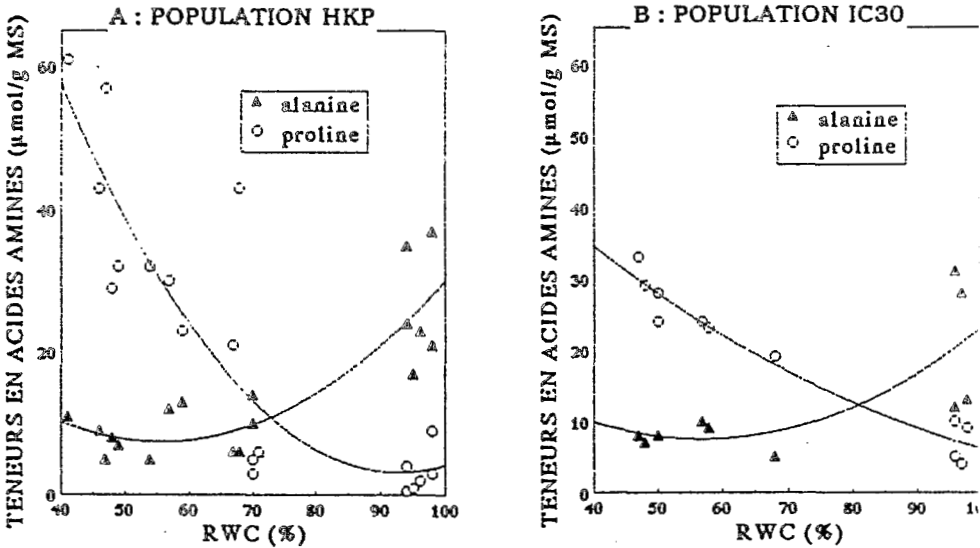


Figure 2

Comparaison de l'évolution des teneurs en proline et en alanine en fonction du contenu relatif en eau. Figure 2A : Population *HKP*. Figure 2B : population *IC 30*. Chaque point correspond à la mesure de la teneur en alanine ou en proline d'une plante. Les prélèvements ont été réalisés 70 jours après semis.

2) Evolution des teneurs en alanine et en proline en fonction du contenu relatif en eau

L'alanine et la proline sont étudiées préférentiellement, en raison de leur évolution significative lors d'un stress, par rapport aux variations des teneurs des autres acides

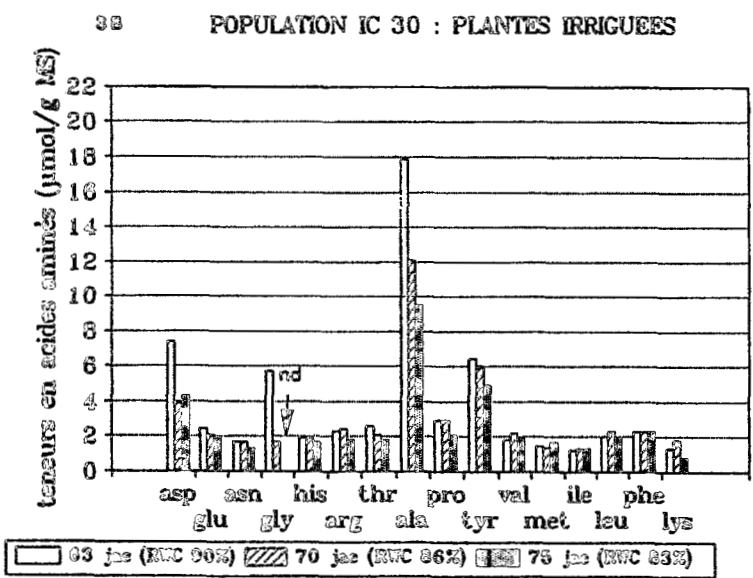
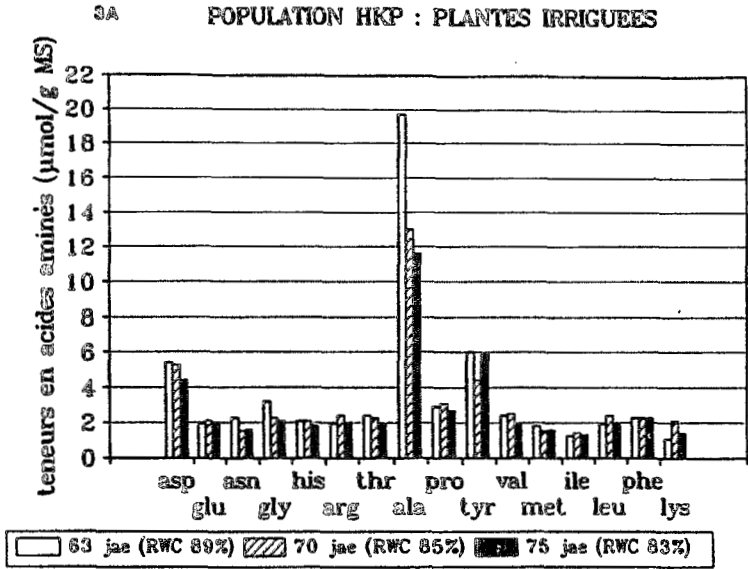
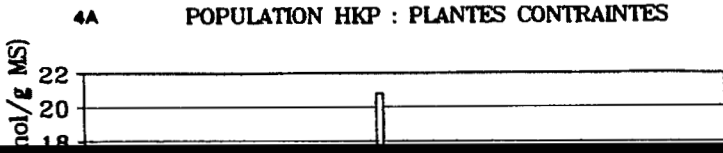


Figure 3

Comparaison des teneurs en acides aminés pour les plantes témoins cultivées aux 63 jae



IV - DISCUSSION

La composition en acides aminés est similaire pour les plantes témoins des deux populations, HKP et IC 30, cultivées en chambre de culture. L'analyse des teneurs en

L'analyse des échantillons de Niamey montre que la réponse à la contrainte hydrique des deux populations (HKP et IC 30) est peu importante et analogue. Les effets de la contrainte hydrique (augmentation de la teneur en proline et diminution de la teneur en alanine) sont parallèles à ceux observés dans le cas de plantes cultivées en chambre de culture, mais la réponse est plus faible. La faible différence des teneurs en alanine et en proline, entre les plantes témoins et contraintes, peut être expliquée par le fait que la valeur minimale de RWC atteinte sur le terrain est de 62 %, alors qu'en chambre de culture, elle est proche de 40 %. La contrainte obtenue sur le terrain est toutefois importante pour le mil, car elle engendre une perte de production de 50 %. Les très faibles évolutions des teneurs en alanine et en proline décrites sur le terrain pour les contenus relatifs en eau les plus faibles, ne sont pas contradictoires avec les réponses des plantes du laboratoire. Pour le niveau minimal de RWC, 62 %, les variations observées sur les plantes cultivées en conditions contrôlées ne sont pas maximales (figure 2).

L'évolution des teneurs en acides aminés au cours d'un stress est rapidement mise en évidence au laboratoire après seulement deux jours de contrainte hydrique. Le modèle de culture et le mode de contrainte appliqués ne sont pas le reflet du stress que peut subir une plante sur le terrain. L'amplification des phénomènes réactionnels obtenue par une contrainte plus prononcée (vitesse et amplitude), facilite leur mise en évidence. De plus, ce modèle permet de neutraliser les autres contraintes qui peuvent intervenir sur le terrain

comme le chaleur ou une mauvaise nutrition minérale (en particulier la nutrition

Les variations principales de teneurs en acides aminés chez le mil, provoquées par une contrainte hydrique, concernent la proline et l'alanine. Elles sont liées aux propriétés chimiques des acides aminés et aux modifications de leurs voies métaboliques de synthèse et de dégradation.

L'alanine est un des acides aminés les plus simples parmi les acides aminés aliphatiques à chaîne carbonée. L'un de ses précurseurs, dans les voies métaboliques de synthèse *de novo* est l'acide aspartique. L'alanine est l'un des produits de la photosynthèse qui incorpore le plus rapidement de carbone marqué (Kennedy et Laetsch, 1973). Elle constitue une molécule "navette" des cellules périvasculaires vers celles du mésophylle, pour deux classes de plantes en C_4 ; cependant, le mil fait partie de la troisième classe, NADP-enzyme malique dépendante, où le pyruvate est la molécule intermédiaire (Lavergne *et al.*, 1985). Cet acide aminé moins étudié pourrait être aussi considéré comme un révélateur métabolique de l'état hydrique d'une plante. L'explication de la disparition de l'alanine devra alors être entreprise.

En conclusion, une accumulation de proline et une disparition d'alanine sont observables lorsque le mil est soumis à une contrainte hydrique quand il est cultivé en chambre de culture. Ces deux phénomènes sont liés à des valeurs de contenu relatif en eau correspondant à des contraintes sévères, obtenues essentiellement en conditions contrôlées. La proline et l'alanine peuvent être considérées comme marqueurs de stress chez le mil. En vue de la sélection de cultivars résistants à la contrainte hydrique, une autre perspective est d'augmenter les connaissances sur le contrôle des modifications du métabolisme azoté en choisissant des cultivars possédant des réponses suffisamment éloignées vis à vis de la contrainte hydrique.

Remerciements

Je voudrais remercier Monsieur J.F. Bois pour l'appui scientifique et les conseils qu'il a pu me donner lors de la réalisation de ce travail, mais aussi Monsieur J. Chanut, Madame S. Doulbeau, Monsieur B. Marin, et Mademoiselle M.C. Thibaud pour leurs aides techniques dans les expérimentations en chromatographie liquide à haute performance. Mes remerciements vont aussi à F. Do et T. Winkel qui ont réalisé les prélèvements sur le terrain.

BIBLIOGRAPHIE

- BELANGER (R.R.), MANION (P.D.) and GRIFFIN (D.H.), 1990. Amino acid content of water-stressed plantlets of *Populus tremuloides* clones in relation to clonal susceptibility to *Hypoxyton mammatum* *in vitro*. Can. J. Bot. 68 : 26-29.
- CHAPIN (F.) S., 1991. Integrated responses of plants to stress. Biosciences 41 : 29-36.
- CHEVONE (B.D.), SEILER (J.R.), MELKONIAN (J.), and AMUNDSON (R.G.), 1990. Ozone-water stress interactions. In Stress responses in plants : adaptation and acclimatation mechanisms. WILEY-LISS, Inc., publication, ALSCHER R.G. and CUMMING J.R. Editors. Plant Biology 12 : pp. 395.

FERRARIS (R.), 1973. Pearl millet (*Pennisetum typhoides*). Commonwealth Agricultural Bureau of pastures and field crops, reviews series 1/73.

HANSON (A.D.), NELSON (C.E.), PEDERSON (A.R.) and EVERSON (E.H.), 1977. Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. *Crop Science* 17 : 489-493

HSIAO (T.C.), 1973. Plant responses to water stress. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24 : 519-570

HUBAC (C.) et VIERA DA SILVA (J.), 1980. Indicateurs métaboliques de contrainte mésologiques. *Physiol. Vég.* 18 : 45-53.

JAGER (H.J.) et MEYER (H.R.), 1977. Effect of water stress on growth and proline metabolism of *Phaseolus vulgaris*. *Oecologia* 30 ; 81-96.

JONES (P.M.), COMOND (C.D.) et TURNER (I.G.) 1980. Accumulation of

- SIBAND (P.), 1981. Croissance, nutrition et production du mil (*Pennisetum typhoides* Hubbard et Stapf) essai d'analyse du fonctionnement du mil en zone sahélienne. Thèse de doctorat de 3ème cycle à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- STEWART (C.S.), MORRIS (C.J.), and THOMPSON (J.F.), 1966. Changes in amino acid content of excised leaves during incubation ; II. Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. *Plant Physiol.* 41 : 1585-1590.
- STEWART (C.R.), BOGESS (S.F.), ASPINALL (D.) et PALEG (L.G.), 1977. Inhibition of proline oxidation by water stress. *Plant Physiol.* 59 : 930-932.
- TURNER (N.C.), 1986. Crop water deficits : a decade of progress. *Adv. Agron.* 39 : 1-51.