

**THE EFFECT OF HYDRIC STRESS UPON THE  
SYNTHESIS OF FOUR ISOENZYMES OF TWO  
VARIETIES OF DURUM WHEAT**

**EFFET DU STRESS HYDRIQUE SUR LA SYNTHÈSE  
DE QUATRE ISOENZYMES DE DEUX VARIÉTÉS  
DE BLE DUR**

**W. Zerrad<sup>1</sup>, B.S. Maataoui<sup>2</sup>, S. Hilali<sup>2</sup>, S. El Antri<sup>1</sup>,  
S. Lazar<sup>1\*</sup>, A. Hmyene<sup>1</sup>**

*<sup>1</sup>Laboratoire de Biochimie, Environnement & Agroalimentaire,  
FST, Université Hassan II Mohammedia-Casablanca,  
BP 146, 20800 Mohammedia, Maroc.*

*<sup>2</sup>Laboratoire des Sciences de l'Environnement et du Développement,  
FST, Université Hassan 1er, BP 577, 26000 Settlat, Maroc.*

\*Corresponding author: [lazar\\_said@yahoo.fr](mailto:lazar_said@yahoo.fr) Fax: +212 5 23 31 53 53

Received: 24/03/2009

Accepted after revision: 11/06/2009

**Abstract:** The effect of water stress on 4 enzymatic systems: peroxidases, malate dehydrogenases, esterases and phosphatases of coleoptiles and roots of two varieties of durum wheat *Karim* and *Tomouh* was evaluated by electrophoretic analysis.

Water conditions have stimulated the synthesis of peroxidases in the coleoptiles and malate dehydrogenases in the roots of both varieties studied. Drought has also induced the synthesis of peroxidases, esterases and phosphatases at the roots of variety *Karim*.

**Keywords:** *durum wheat, water stress, tolerance, peroxidases, malate dehydrogenases, esterases and phosphatases.*

**Résumé :** L'effet du stress hydrique sur quatre systèmes enzymatiques : les peroxydases, les malates déshydrogénases, les estérases et les phosphatases des coléoptiles et racines de deux variétés de blé dur Karim et Tomouh a été évalué par analyse électrophorétique.

Les conditions de contrainte hydrique ont stimulé la synthèse des peroxydases, au niveau des coléoptiles et des malates déshydrogénases au niveau des racines des deux variétés étudiées. Le stress a également induit la synthèse des peroxydases, des estérases et des phosphatases au niveau des racines de la variété Karim.

**Mots clés :** *blé dur, stress hydrique, tolérance, peroxydases, malates déshydrogénases, estérases phosphatases.*

## INTRODUCTION

Les céréales qui appartiennent à la famille des graminées, jouent un rôle nutritionnel, social et économique indéniable. Au Maroc, les céréales représentent les plus importantes cultures, elles occupent une superficie totale d'environ 70% de la superficie agricole utile [1]. Environ 60% de la superficie réservée aux céréales est située en zones arides et semi arides [2] qui se caractérisent par une faiblesse et une forte irrégularité des précipitations et de fortes températures sur une grande partie de l'année [3].

Le déficit hydrique constitue donc un important facteur limitant pour la croissance des plantes ainsi que la productivité végétale [4].

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 [5].

En effet, pour maintenir la balance de la force osmotique, après la chute du potentiel hydrique causée par le stress hydrique [6, 7], les plantes accumulent un certain nombre d'osmomolites tel que la proline, les carbohydrates et la betaine [4] 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 [1] permettent de garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevé que possible [4, 8, 9].

Cette chute du potentiel hydrique stimule non seulement le phénomène d'osmorégulation mais également l'inhibition [10] ou la synthèse de nouvelles protéines [11] ce qui assure une protection de l'ensemble vitale de la cellule végétale [12].

La présente étude a pour objectif d'évaluer, par analyse électrophorétique, l'effet du stress hydrique sur quatre systèmes enzymatiques, les peroxydases, les malates déshydrogénases, les estérases et les phosphatases des coléoptiles et racines de deux variétés de blé dur *Karim* et *Tomouh*.

## PARTIE EXPERIMENTALE

### Matériel végétal

Le matériel végétal est formé de deux variétés de blé dur *Karim* et *Tomouh* fournies 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 tout en les arrosant 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 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 obtenues, ont été séparées des racines.

### Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales, à partir des coléoptiles et des racines, a été faite par broyage, au mortier, d'un poids bien déterminé de chaque échantillon avec 2,5 mL du tampon Tris-HCl 0,1 M (*pH* 7,2), contenant du 2-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 congelés à -20 °C jusqu'à utilisation.

### Séparation des protéines par électrophorèse

Les protéines, contenues dans les extraits protéiques, sont séparées sur gel de polyacrylamide à 10% [13].

La migration s'effectue dans un tampon Tris-HCl à 10 mM, glycine à 76 mM *pH* 8,3. La durée de migration est de 4 heures avec courant constant de 30 mA.

### Révélation des isoenzymes

**Les peroxydases :** Les peroxydases sont révélées en incubant le gel dans un tampon acétate 0,1 M à *pH* 5,0 contenant du Guaïcol à 120 mM. Après 5 min, une solution de révélateur est ajoutée. Il s'agit de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 1% (v/v).

**Malates déhydrogénases :** La révélation des malates déhydrogénases est réalisée dans un tampon Tris-HCl 0,5 M à *pH* 7,2 contenant du NaCl 1 M, du MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, du NAD 10 mM, du NBT 10 mM, du PMS 10 mM et de l'acide malique 21 mM. Le gel est maintenu à l'obscurité jusqu'à apparition des bandes.

**Les estérases :** Les estérases sont révélées par incubation dans du tampon Tris-HCl 0,05 M à *pH* 7,2 contenant de l' $\alpha$ -naphtylacétate 0,5 mM. Après 15 min, le gel est ensuite

rincé puis incubé dans une solution du Fast Blue BB à 1,5% (p/v) jusqu'à apparition des bandes.

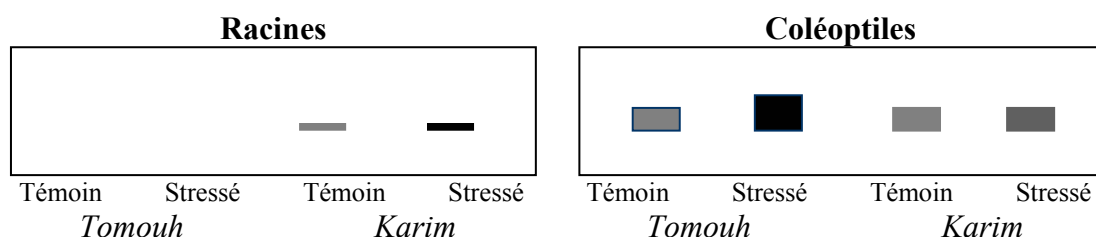
**Les phosphatases :** Les phosphatases sont révélées dans un premier temps dans un tampon acétate 0,05 M *pH* 5,0 contenant du  $MgCl_2$  0,01 M. Après 15 min, le gel est rincé puis repris dans le même tampon contenant du  $\alpha$ -naphtylphosphate 0,5 mM et du Fast Garnet à 0,5% (p/v) jusqu'à apparition des bandes.

## RESULTATS

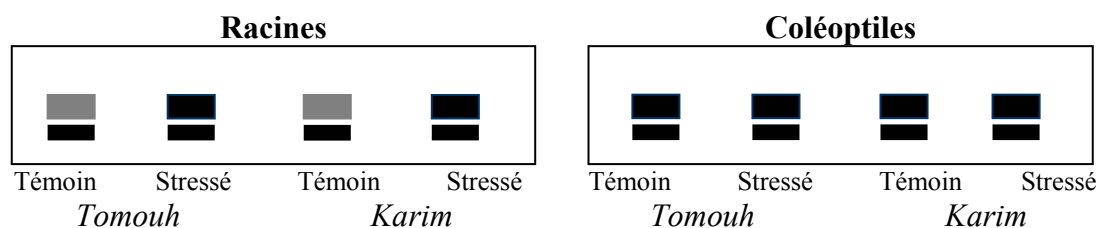
### Les peroxydases

D'après la Figure 1, qui représente le profil électrophorétique des peroxydases des racines et des coléoptiles des deux variétés, on note une absence de cette isoenzyme dans les racines de la variété *Tomouh* aussi bien pour le témoin que pour le stressé. Pour la variété *Karim* l'activité enzymatique des peroxydases est beaucoup plus nette au niveau du stressé par rapport au témoin.

Au niveau des coléoptiles, l'activité enzymatique s'accroît avec le déficit hydrique pour les deux variétés étudiées.



**Figure 1.** Profil électrophorétique des peroxydases des racines et des coléoptiles des deux variétés



**Figure 2.** Profil électrophorétique des malates déshydrogénases des racines et des coléoptiles des deux variétés

### Malates déshydrogénases

Le profil électrophorétique des malates déshydrogénases des deux variétés (Figure 2), montre qu'il y a uniquement une seule zone d'activité enzymatique représentée par deux bandes à intensité différente. Au niveau des racines, la différence entre les témoins et les stressés est nette surtout pour la bande à migration lente.

Au niveau des coléoptiles, le profil électrophorétique ne montre pas de différence entre les témoins et les stressés pour les deux variétés étudiées.

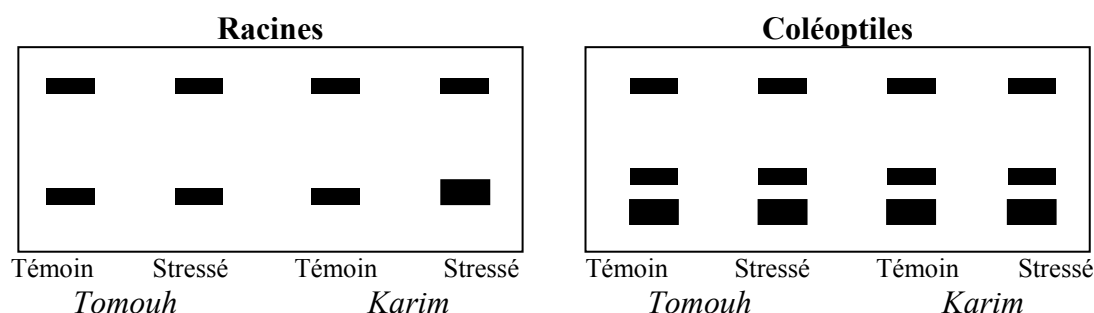
### Les estérases

Le profil électrophorétique des estérases des deux variétés (Figure 3) montre l'existence de deux zones de migration représentées par une ou deux bandes chacune.

Au niveau des racines de la variété *Tomouh*, le stress n'a pas d'effet sur la synthèse des estérases. En effet le même profil apparaît aussi bien pour le témoin que pour le stressé.

Pour la variété *Karim*, le déficit hydrique a un effet sur la synthèse de cette isoenzyme mais uniquement au niveau de la zone à migration rapide.

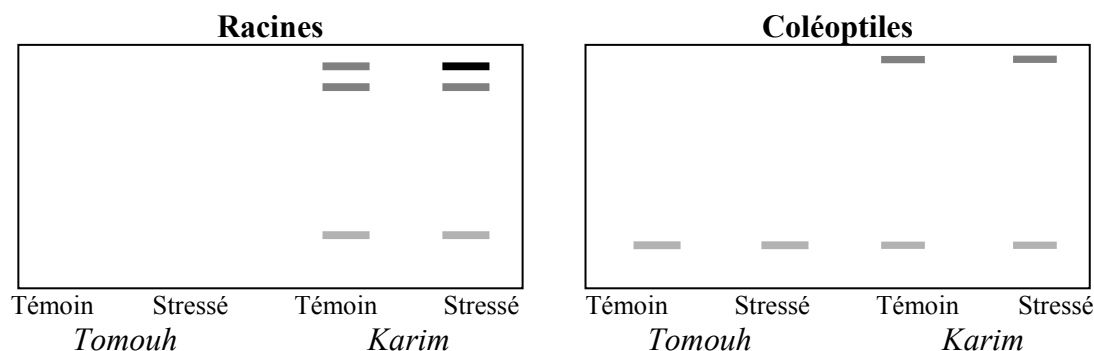
Au niveau des coléoptiles, les deux variétés ne subissent aucun changement sous l'effet du stress hydrique.



**Figure 3.** Profil électrophorétique des estérases des racines et des coléoptiles des deux variétés

### Les phosphatases

La Figure 4, qui représente le profil électrophorétique des phosphatases montre qu'au niveau des racines de la variété *Tomouh*, on note l'absence de la synthèse de cette isoenzyme aussi bien pour le témoin que pour le stressé. Au niveau de la variété *Karim*, deux zones de migration apparaissent, une à migration lente représentée par deux bandes et une à migration rapide représentée par une seule bande uniquement au niveau des racines stressées.



**Figure 4.** Profil électrophorétique des phosphatases des racines et des coléoptiles des deux variétés

Pour les coléoptiles de la variété *Karim*, il y'a également deux zones de migration. Dans la zone à migration lente, une seule bande apparaît dans les conditions normales. Une autre bande s'ajoute sous l'effet du stress. Dans la zone à migration rapide, aucune différence n'est remarquable ; on note l'existence de la même bande aussi bien pour le témoin que pour le stressé. Cette bande se retrouve également chez la variété *Tomouh* en absence et en présence du stress hydrique.

## **DISCUSSION**

Cette étude comparative qui avait pour but de mettre en évidence l'influence du stress hydrique sur le métabolisme de quatre systèmes enzymatiques des racines et coléoptiles de deux variétés de blé dur, *Karim* et *Tomouh*, soumises à des conditions de déficit hydrique, par arrêt d'arrosage, a montré que la réponse à cet aléa diffère d'une variété à une autre.

En effet, une homogénéité des profils des peroxydases des coléoptiles et des malates déhydrogénases des racines a été détectée entre les deux variétés étudiées. Par ailleurs, des différences très marquées dans les profils des peroxydases, des estérases et des phosphatases des racines ont été décelées. Les résultats obtenus sont en conformité avec d'autres études qui ont confirmé que le déficit hydrique induit fortement la synthèse des peroxydases [14]. En effet, ces études ont montré que le stress hydrique conduit à un stress oxydatif par production des espèces oxygénées réactives particulièrement le radical superoxyde et le peroxyde d'hydrogène [15].

Cette production incontrôlée cause des dommages à l'ADN et l'ARN, la peroxydation des lipides membranaire ainsi que l'oxydation des protéines [16]. Pour contrôler le niveau intra-cellulaire des espèces oxygénées réactives, les plantes utilisent un système enzymatique comprenant la superoxyde dismutase (SOD) qui transforme le radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, et la catalase (CAT) et les peroxydases qui transforment le peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène [14].

D'autres études ont montré que le stress hydrique a un effet remarquable sur la synthèse des phosphatases [17].

Cette synthèse qui est due au fait que les phosphatases occupent une position centrale dans la voie de signalisation de l'acide abscissique (ABA), cette phytohormone impliquée dans le contrôle de nombreux processus physiologiques, comme la fermeture stomatique, lors d'un stress hydrique [17].

## **CONCLUSION**

En conclusion, l'étude a montré que lors de la restriction de l'alimentation en eau, le comportement des plantes se manifeste différemment d'une variété à une autre.

Pour les deux variétés étudiées, Les résultats obtenus permettent de conclure que la variété *Karim* était plus sensible au stress hydrique que la variété *Tomouh* au niveau de laquelle le déficit hydrique n'a pas eu d'effet très remarquable. Cette étude a également montré que les coléoptiles étaient beaucoup plus tolérants au stress que les racines surtout au niveau de la variété *Karim*.

## REFERENCES

1. Karrou, M., El Mourid, M., Boulal, H., Boutfirass, M., El Gharous, M.: *Écophysiologie des céréales en zones semi-arides*, Eds INRA Maroc, **2001**.
2. El Mourid, M., Karrou, M., El Gharous, M.: *Al Awamia*, **1996**, 92, 69.
3. Boutfirass, M., Karrou, M., El Mourid, M., Irrigation supplémentaire et variétés de blé dans les zones semi-arides du Maroc. In: *Acquis et perspectives de la recherche agronomique dans les zones arides et semi-arides du Maroc* (El Gharous, M. Karrou, M., El Mourid, M. – eds.), Eds. INRA-MIAC, **1994**, 176.
4. Wang, W.X., Brak, T., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A.: Abiotic resistance and chaprones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilising protein from *Populus*. In: *Plant biotechnology 2000 and beyond* (Vasil, I.K. – ed.), **2003**, 439-443.
5. Monneveux, P., Belhassen, E.: *Plant Grow Regul.*, **1996**, 20, 85-92.
6. El Mourid, M.: *PhD Dissertation*, Iowa State University, Ames USA, **1988**.
7. Casals, M.L.: *Thèse de Doctorat de l'INRA*, Paris Grignon, **1996**.
8. Monneveux, P., Nemmar, M. : *Agronomie*, **1986**, 6, 583.
9. Bouzoubaa, Z., El Mourid, M., Karrou, M., El Garous, M.: *Manuel d'analyse chimique et biochimique des plantes*, Eds. INRA Maroc, **2001**.
10. Bewley, J.D., Larsen, K.M.: *J. Exp. Bot.*, **1980**, 31, 1245.
11. Kermode, A.R., Bewley, J.D.: *Plant Physiol.*, **1989**, 90, 702.
12. Baker, J., Steel, C.H., Dure, I.L.: *Plant Mol. Biol.*, **1988**, 11, 277
13. Laemmelli, U.K.: *Nature*, **1970**, 227, 680.
14. Inze, D., van Montagu, M.: *Curr. Opin. Biotechnology*, **1995**, 6, 153.
15. Selote, D.S., Bharti, S., Khanna-Chopra, R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, 314, 724.
16. Cipak, A., Hasslacher, M., Tehlivets, O., Collinson, E.J., Zivkovic, M., Matijevic, T., Wonisch, W., Waeg, G., Dawes, I.W., Zarkovic, N., Kohlwein, S.D.: *Free Radical. Biol. Med.*, **2005**, 40, 897.
17. Saez, A., Robert, N., Maktabi, M.H., Schroeder, J.I., Serrano, R., Rodriguez, P.L.: *Plant Physiol.*, **2006**, 141, 1389.