

Réponse du maïs (*Zea mays* var. LG 60) au stress salin : étude de la synthèse de quelques composés biochimiques

*Alexis Nicaise LEPENGUE¹, Isaac MOUARAGADJA¹, Brahma IBRAHIM¹, Séverin AKE², Bertrand M'BATCHI¹

¹Laboratoire de phytopathologie, Unité de recherche Agrobiologie, Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM) ; BP 067 Franceville, Gabon

Tel/Fax : (00241) 67 77 36 / 07684362 / 06764738

²Laboratoire de Physiologie végétale, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan ; 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire

*Correspondant : Email: lepengue_nicaise@yahoo.fr

Mots clés. NaCl, Maïs, prétraitement, feuilles, métabolisme, perturbation

Keys Words: NaCl, maize, pretreatment, leaves, metabolism, perturbation.

1 RESUME :

Le chlorure de sodium (NaCl) provoque des perturbations de la croissance et du développement du maïs au Gabon. Pour comprendre les mécanismes qui sous-tendent ces événements, la teneur de 4 paramètres biochimiques, à savoir, les sucres réducteurs, les protéines, chlorophylles et les phénols a été dosée. Les graines de maïs ont pour cela été prétraitées pendant 24 h dans 4 solutions salines de concentrations respectives 0 g/l, 2 g/l, 4 g/l et 6 g/l, et cultivées sous serre. Les analyses biochimiques ont été réalisées par spectrophotométrie sur des organes foliaires âgés de 21 jours. Les résultats obtenus ont révélé que le NaCl augmentait les concentrations des composés glucidiques, protéiques et phénoliques. Pour la chlorophylle en revanche, une augmentation de teneurs a été notée à 2g/l de NaCl, suivie d'une baisse de valeur aux salinités plus élevées. Les réductions de croissance et de développement des maïs observées en plein champ sont donc précédées (ou accompagnées) de perturbations de nombreux mécanismes du métabolisme primaire et secondaire.

ABSTRACT

Sodium chloride (NaCl) disturbs maize growth and development in Gabon. The present study deals with the evolution of this phenomenon. Four (4) maize biochemical parameters are measured: carbohydrates, proteins, chlorophyll, and phenolic compounds. Hence, maize seeds are pretreated by immersion in 4 NaCl concentrations, 0 g/l, 2 g/l, 4 g/l and 6 g/l, and cultivated in greenhouse conditions for a 21-day period. The results showed that NaCl solutions increase carbohydrates, proteins, and phenolic compound's parameters levels. However, it increase and decrease chlorophyllian rate at low and high NaCl respective concentrations. So, maize growth diminution noticed in natural conditions is caused by several primary and secondary metabolism disturbances.

2 INTRODUCTION

Le maïs (*Zea mays* L.) est une plante annuelle de la famille des Poaceae (Girardin, 1999). Il est principalement cultivé pour ses graines riches en amidon, et pour ses longues tiges et feuilles à usage fourragère. Les styles des inflorescences femelles de cette plante sont également utilisés en pharmacopée pour leurs propriétés cholagogues, diurétiques et antilithiasiques. Sa grande richesse en vitamines K lui confère par ailleurs des vertus antihémorragiques (Perrot et René, 1974). Le maïs est aussi exploité en industrie pour la production d'huiles alimentaire ou cosmétique, et en brasserie, pour la fabrication d'alcools et de semoules (Harlan, 1987). Les principaux producteurs de cette plante sont les Etats-Unis (307.4 millions de tonnes/an), la Chine (166.00 millions de tonnes/an) et le Brésil (59 millions de tonnes/an) (FAO, 2009). Au Gabon, même si les productions annuelles restent relativement faibles (26800 tonnes en 2002), le maïs constitue l'une des principales cultures céréalières du pays (Feumetio, 2002). Sa culture se déroule pratiquement sur toute l'année, en raison de l'avantage géographique équatoriale

du pays. Sur les zones côtières du Gabon., le maïs est victime d'une sévère pathologie, caractérisée par des anomalies de germination, de croissance et de développement des organes. Les travaux de Lépengué et al. (2010) ont révélé que cette affection était d'origine abiotique, causée par la toxicité saline des eaux du front de mer. Ce qui explique sa limitation aux zones côtières. Ces travaux ont par ailleurs montré que le NaCl induisait aussi bien les baisses que les améliorations des rendements du maïs, subséquentement aux concentrations appliquées (Lépengué et al., 2010). De telles actions proviennent vraisemblablement des perturbations de mécanismes physiologiques dont la nature et les ampleurs nécessitent d'être connues. C'est dans cette optique que la présente étude a été réalisée. Elle a visé à déterminer l'impact de différentes concentrations de NaCl sur quelques fonctions physiologiques des feuilles de maïs. Les paramètres biochimiques mesurés sont : les synthèses de sucres réducteurs, de protéines, de chlorophylle et de polyphénols.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Matériel : Le matériel végétal utilisé était le maïs blanc (*Zea mays* L. var. LG 60, Poaceae). Il a été choisi pour sa facilité culturale et sa forte valeur marchande au Gabon (Makita Ngadi et M'batchi, 1989).

3.2 Méthodes

3.2.1 Mise en place de l'essai : Trente-deux (32) graines de maïs issus des greniers du Laboratoire de Physiologie végétale de l'Université de Sciences et Technique de Masuku (USTM), ont été stérilisées par trempage pendant 5 min. dans 1 dm³ d'une solution d'hypochlorite de sodium 1 % (Lépengué, 2008). Elles ont ensuite séquentiellement été rincées dans 10 dm³ d'eau distillée stérile, séchées entre deux épaisseurs de papier buvard, et prétraitées par trempage dans 1 dm³ de 4 solutions salines de concentrations respectives 0 g/l (Témoin), 2 g/l (T2%), 4 g/l (T4%) et 6 g/l (T6%). Après 24 h d'incubation, les graines y ont été retirées, desséchées comme

précédemment, et ensemencées dans des pots de culture de forme cylindrique (15 cm de diamètre et 20 cm de profondeur) contenant 1 kg d'une terre de texture argilo limoneuse préalablement stérilisée par autoclave pendant 30 min. à 120 °C. Pour chaque traitement, 2 pots de 4 graines ont été constitués ; ce qui correspond à 8 unités pour les 4 traitements réalisés. Les préparations ont ensuite été transférées dans une serre métallique de dimensions 10 x 5 x 2 m³, recouverte d'un film plastique en polyéthylène d'épaisseur 180 µm, et journalièrement arrosées par 0, 5 dm³ des solutions correspondantes. L'expérience a été arrêtée au 21^e jour. Les feuilles âgées de 2 semaines ont été récoltées et soumises à différentes analyses biochimiques. Tous les dosages colorimétriques ont été réalisés au spectrophotomètre (Unico Spectrophotometer Mod.1100 ; UK), et les données exprimées en mg/g de matière fraîche.

3.2.2 Extraction et dosage des sucres réducteurs :

L'extraction des sucres réducteurs a été réalisée suivant les techniques décrites par Lépengué et al. (2010). Un (1) g de tissu foliaire a été broyé dans 5 ml d'éthanol 80° et centrifugé pendant 15 min. à 15000 rpm. Le culot a été repris dans 5 ml d'éthanol 40° et centrifugé à nouveau, pour libérer les sucres pariétaux. Les 2 surnageants ont été mélangés dans un bécher et purifiés avec 2 ml d'acétate de plomb 10 %. L'extrait glucidique a ensuite été évaporé et complété à 5 ml avec de l'eau distillée. Les sucres réducteurs ont été dosés au spectrophotomètre, par les méthodes colorimétriques utilisant l'acide dinitrosalicylique de sodium (DNS) à la longueur d'onde de 540 nm (Lépengué, 2008).

3.2.3 Dosage des composés protéiques : Les composés protéiques ont été extraits à partir de 1 g de feuilles de maïs, préalablement rincées avec 5 L d'eau distillée. L'échantillon a ensuite été broyé dans 10 ml de tampon phosphate 0,1M, pH 6,5 en présence de 0,5 g de PVP, et centrifugé pendant 15 min. à 15 000 rpm. Le surnageant a été récupéré dans un bécher, précipité avec 5 ml de sulfate d'ammonium 80%, et à nouveau centrifugé comme précédemment. Le culot protéique obtenu a été repris dans 5 ml de tampon d'extraction, homogénéisé et dosé au spectrophotomètre par

réaction au bleu de Coomassie, à la longueur d'onde de 595 nm (Bradford, 1976).

3.3 Extraction et dosage des pigments chlorophylliens :

Pour chaque traitement, 1 g de tissu foliaire a été prélevé sur des feuilles (préalablement rincées dans 5 L d'eau distillée), broyé dans 15 ml d'acétone 80% glacée et filtré sur Büchner selon la méthode de Savouré (1980). Le contenu du filtrat en chlorophylle a ensuite été déterminé au spectrophotomètre (Spectronic Milton-Roy) par la méthode de Mac Kinney (Savouré, 1980), aux longueurs d'onde de 645 nm et 663 nm.

3.4 Extraction et dosage des composés phénoliques :

Pour extraire les composés phénoliques des feuilles de maïs, 1 g de tissu végétal a été prélevé par traitement. Le matériel végétal a ensuite été broyé au mortier, incubé durant 24 h à 4 °C et centrifugé pendant 15 min. à 15 000 rpm. Les extraits phénoliques ont été dosés au spectrophotomètre selon les techniques de Folin et Ciocalteu (1927), à la longueur d'onde de 725 nm.

3.5 Répétitions et analyse statistique :

Toutes les expériences ont été répétées 3 fois et soumises à une analyse de variance (ANOVA) au logiciel Statistica 6.0. En cas de différences significatives, les tests de comparaisons multiples de Newman-Keuls ont été utilisés au seuil de 5%.

4 RESULTATS

4.1 Effet de la salinité sur la synthèse des sucres réducteurs : L'étude des sucres réducteurs des feuilles de maïs, dont les graines ont

préalablement été traitées au NaCl, a donné les résultats présentés à la figure 1.

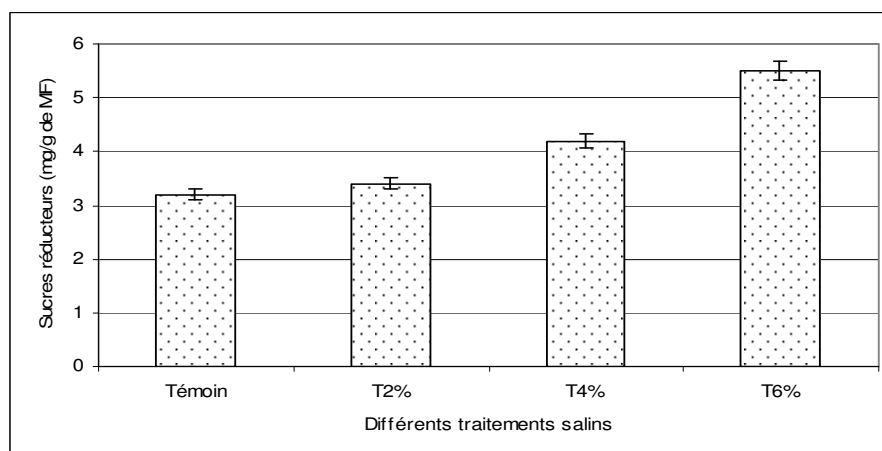


Figure 1 : Effet de différentes concentrations de NaCl sur la synthèse de sucres réducteurs des plantes du maïs, après 21 jours de culture en serre.

Leur analyse a révélé que les différents traitements salins induisaient des augmentations des teneurs de sucres réducteurs dans les feuilles de maïs. Ces hausses ont toutes été statistiquement significatives et proportionnelles aux concentrations salines appliquées. Les plus fortes teneurs (5,5 mg de sucres réducteurs/g de MF), correspondant à une hausse de 31,5% ont été obtenues avec les

traitements salins T6%, et les plus petites élévations (3,4 mg de sucres réducteurs/g de MF, soit une hausse de 2,5%), produites par les traitements T2%.

4.2 Effet de la salinité sur la synthèse des composés protéiques : Les résultats de l'influence de la salinité sur la formation des composés protéiques des feuilles de maïs ont été présentés à la figure 2.

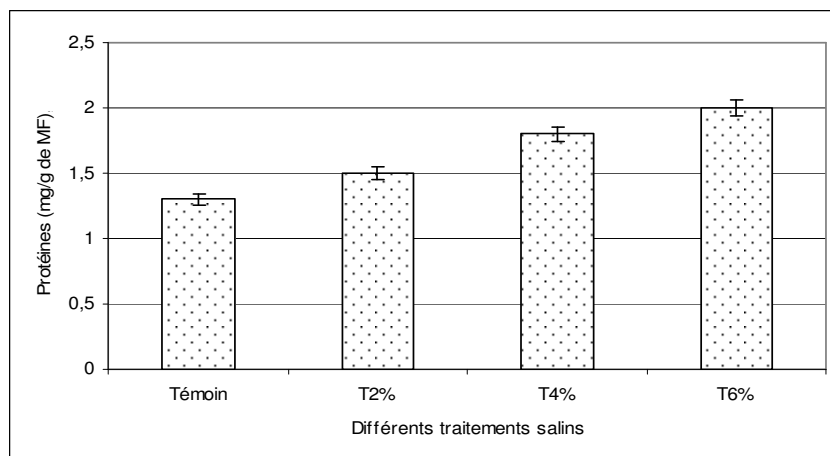


Figure 2 : Effet de différentes concentrations de NaCl sur la synthèse de protéines des plantes de maïs, après 21 jours de culture en serre.

Leur examen a dévoilé que les différents traitements salins augmentaient les concentrations protéiques foliaires du maïs. Comme dans le cas des sucres réducteurs, ces élévations ont non seulement toutes été statistiquement significatives, mais également proportionnelles aux doses de salinité employées. Les plus fortes hausses (54%, correspondant à la teneur de 2,0 mg de protéines/g de MF) ont alors

été obtenues avec le traitement T2%, et les plus faibles élévations (15%, pour 1,5 mg de protéines/g de MF) avec les traitements T2%.

4.3 Effet de la salinité sur la synthèse des pigments chlorophylliens : Le dosage des pigments chlorophylliens des feuilles de maïs préalablement traité au chlorure de sodium (NaCl) a donné les résultats présentés à la figure 3.

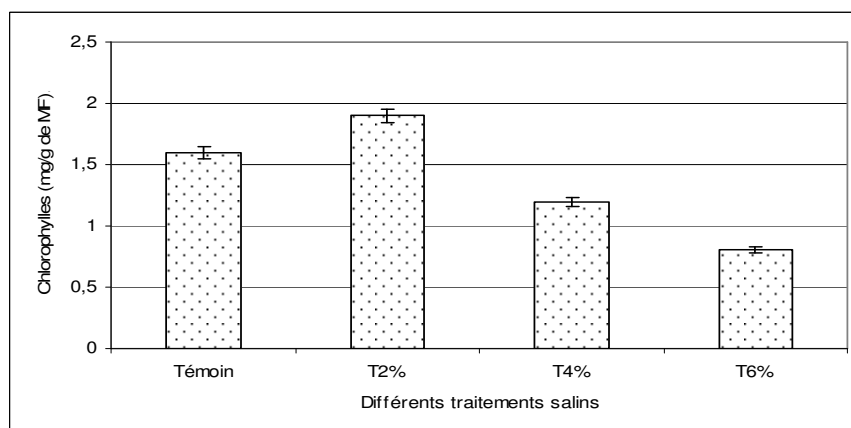


Figure 3 : Effet de différentes concentrations de NaCl sur la synthèse de pigments chlorophylliens des plantes de maïs, après 21 jours de culture en serre.

Leur examen a clairement ressorti que le traitement T2% augmentait significativement la teneur chlorophyllienne des feuilles de maïs. Cette hausse correspondait à une élévation de 23% des taux chlorophylliens des plantes témoins. Les traitements T4% et T6%, employant de fortes concentrations de NaCl ont, en revanche, réduit les teneurs chlorophylliennes des feuilles de maïs. Les baisses obtenues (1,2 mg de chlorophylles/g de MF et 0,8 mg de chlorophylles/g de MF) ont correspondu à des réductions significatives respectives de 31% et 61%.

4.4 Effet de la salinité sur la synthèse des composés phénoliques : La figure 4 résume les

réactions de synthèse de composés polyphénoliques des feuilles de maïs soumises à divers traitements salins. L'analyse de ces résultats a montré que les différents traitements utilisés provoquaient des élévations des teneurs de composés phénoliques des plantes étudiées. Toutes les augmentations se sont révélées significatives au seuil de 5%, et proportionnelles aux doses de salinité administrées. Les plus fortes hausses ont alors été obtenues avec les traitements T6% (74%, correspondant à une teneur de 1,2 mg de polyphénols/g de MF) et les plus faibles élévations avec le traitement T2% (14,3%, équivalant à 0,8 mg de polyphénols/g de MF).

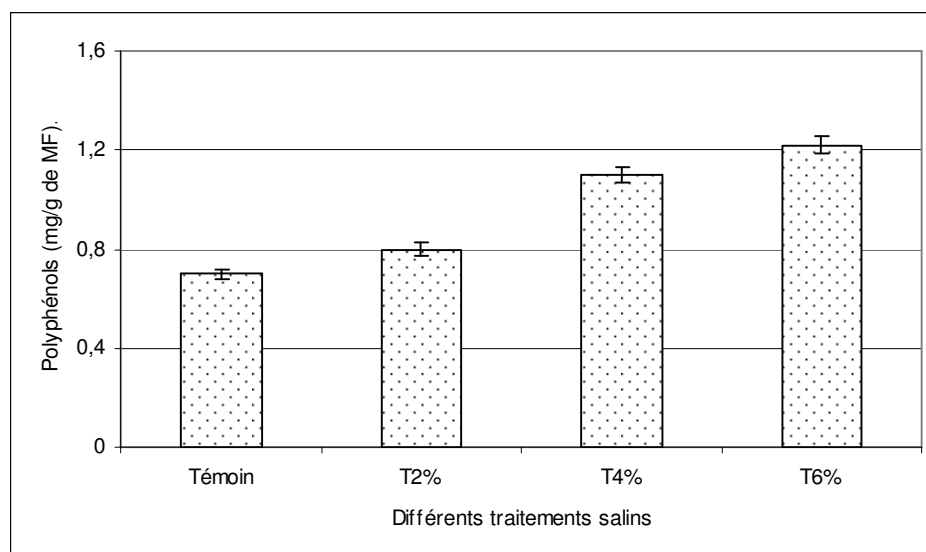


Figure 4 : Effet de différentes concentrations de NaCl sur la synthèse de composés phénoliques des plantes de maïs, après 21 jours de culture en serre.

5 DISCUSSION

Les résultats de ce travail ont montré que les traitements salins provoquaient des augmentations des teneurs de composés glucidiques protéiques et phénoliques, proportionnellement aux doses de sel appliquées. Au niveau de la chlorophylle, ces traitements ont successivement provoqué une augmentation (aux doses de NaCl faibles), puis une baisse (aux doses plus élevées) des teneurs. Les augmentations des sucres réducteurs, de composés protéiques et phénoliques sont en accord avec les résultats de Soltani (1988) et de El Jaafari (1993). Elles proviennent vraisemblablement de deux phénomènes biologiques indépendants, à savoir : l'accélération de la croissance végétale (Heller et al.,

1994 ; Lépengué et al., 2010), et l'impact de stress engendré par la toxicité saline (Denden et al., 2005). Dans le premier cas, l'augmentation des teneurs des composés biochimiques serait liée à l'accélération des phénomènes de morphogenèse, comme l'ont suggéré Lépengué et al. (2010) sur la même plante. En effet, à de faibles concentrations, inférieures à 2 g/l, le NaCl agirait comme un fertilisant, favorisant la nutrition minérale des plantes. Les ions Na^+ et Cl^- agiraient comme des électrolytes accompagnateurs favorisant le passage des cations (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) et des anions (NO_3^{2-}) du sol vers les plantes. Cette action accélérerait la croissance et le développement des plantes, par impulsion de nombreux événements physiologiques précurseurs. Des tels

phénomènes ont déjà été rapportés chez la betterave, l'atriplex et le cotonnier (Heller et al., 1994).

A des concentrations égales ou supérieures à 2 g/l, le NaCl provoque des phénomènes de stress se traduisant par la réduction des paramètres morphométriques des plantes étudiées (Nabors 1980 ; Roudani 1996). L'élévation des teneurs des composés glucidiques, protéiques et phénoliques aux traitements de 2% à 6 %, pourrait donc provenir des réactions de défense des plantes vis-à-vis de ce stress abiotique. Des exemples de hausses de teneurs des composés biochimiques en réponse à des agressions chimiques salines sont assez bien connus en biologie. C'est le cas du blé (Roudani, 1996), de la patate douce (Symartis et al., 1992) ou de *Tagetes patula* (Denden et al., 2005).

Selon divers auteurs, le stress salin résulte de la perturbation des fonctions de nutrition hydrique, minérale et carbonée des plantes (Levitt, 1980 ; Levigneron et al., 1995). Dans le sol, le NaCl agirait par cimentation de différentes particules constitutives élémentaires, réduisant ainsi les taux d'absorption hydrique. La perturbation de la nutrition minérale proviendrait quant à elle de la compétition des ions Na^+ et Cl^- avec les ions

nutritifs telluriques (Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} ...) (Nabors, 1980). Au niveau de la nutrition carbonée, l'action du NaCl résulterait de l'accumulation de ce composé dans les organes foliaires empêchant ainsi le déroulement normal des processus photosynthétiques (Roudani, 1996).

Dans tous les cas, quel que soit le mode de perturbation mis en jeu, toutes ces actions sont perçues comme étant des stress au niveau de la physiologie de la plante (Heller et al., 1994). Elles suscitent des réactions de défense, se traduisant par l'augmentation de nombreux composés de défense tels que les sucres réducteurs, les protéines et les polyphénols (Semal et al., 1993).

Les variations des teneurs chlorophylliennes nous paraissent parfaitement en accord avec cette hypothèse. Les augmentations des teneurs aux traitements T2% seraient dans ce cas liées à l'accélération de la croissance, elle-même déterminée par les faibles concentrations de NaCl. La baisse de ces valeurs à T4% et T6%, correspondrait à la dégradation des pigments chlorophylliens en réponse à la toxicité saline. Des résultats similaires ont déjà été rapportés par Piri (1980) chez le blé, Nabors (1980) chez le tabac, et Soltani (1988) chez l'orge.

6 CONCLUSION

Le NaCl induit des augmentations des teneurs des composés glucidiques, protéiques et phénoliques, proportionnellement aux doses chimiques appliquées. Chez les pigments chlorophylliens, il provoque des baisses de teneur à de faibles doses (2g/l), et des hausses du même paramètre aux doses

plus élevées. La réduction des paramètres morphométriques du maïs, observée en serre ou au champ sur le littoral gabonais, paraît découler de la perturbation de nombreux mécanismes physiologiques de croissance.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Bradford MM: 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Denden M, Bettaieb T, Salhi A, Mathlouthi M: 2005. Effect of Chloride Sodium on Chlorophyll Fluorescence, Plant Proline Content and flowers production of three ornamental species. *Tropicultura* **23** (4) : 220-225.
- El Jaafari S. 1993. Contribution à l'étude des mécanismes biophysiques et biochimiques de résistance à la sécheresse chez le blé. Doctorat, Fac. Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, 214 p.
- FAO. 2009. Agriculture et Environnement: Les défis du 21ème siècle. 21^e Session, Rome (Italie) du 22 au 25 Avril, 2009.
- Feumetio B. 2002. Les marchés émergents d'Afrique. Editions Marchés émergents, Paris, 106 p.
- Folin O. and Ciocalteu V: 1927. On tyrosine and tryptophan determination in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73 : 627-650.
- Girardin P : 1999. Écophysiologie du maïs. Edition Association générale des producteurs de maïs, Montaron, AGPM, Paris France, pp 19-37.



- Harlan JR : 1987. Les plantes cultivées et l'homme (traduction de J. Béliard et B. Fraleigh), éd. ACCT/CILF/PUF, pp 46-76.
- Heller R, Esnault R. and Lance C: 1994. Physiologie végétale. Nutrition. 5^e édition de l'abrégé, Editions Masson, Paris, 294 p.
- Lépengué AN : 2008. Contribution à la protection de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*), contre la pourriture engendrée par *Phoma sabdariffae* Sacc. et *Trichosphaeria* sp., au Gabon: Etude des mécanismes d'action fongiques phytotoxiques. Doctorat d'Université, UFR Biosciences, Univ. Cocody-Abidjan, 294 p.
- Lépengué AN, Mouaragadja I, M'batchi B. and Aké S: 2010. Effet du chlorure de sodium (NaCl) sur la germination et la croissance du maïs (*Zea mays* L., Poaceae) au Gabon. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 4(5): 1602-1609
- Levigneron A, Lopez F, Vansuyt G, Berthomieu P, Fourcroy P. and Casse DF: 1995. Les plantes face au stress salin. *Cahier Agriculture*, 4 : 263-273.
- Levitt J : 1980. Salt and ion stress. In Levitt J. (eds). Response of plant to environmental stresses; Vol. II, water radiation salt and others stresses. New York Academic Press, 365-406.
- Makita Ngadi, J. and M'batchi, B: 1989. Etude de la fertilité de 2 substrats organiques utilisés 266 comme amendement sur une culture de maïs (*Zea mays*, var LG 60). Réseau Africain du 267 Compost : Procédions de la 1^{ère} conférence. Dakar, le 12 Septembre 1989
- Meyo Bibang F : 2003. Le Gabon, le monde (nouvelle édition). Collection Hatier, Paris 80 p.
- Nabors MW, Gibbs SE, Bernstein CS. and Neis ME: 1980. NaCl-tolerant tobacco plant from cultured cells. *Z.P.F. Lanzen Physiol.*, 97: 13-17.
- Perrot E. and René M: 1974. Les plantes médicinales. Editions Presses Universitaires de France, PUF, Paris, France 139 p.
- Piri K : 1991. Contribution à la sélection *in vitro* des plantes androgéniques de blé pour leur tolérance à NaCl. Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique, 168 p.
- Roudani M : 1996. Physiologie comparée de deux espèces de blé en relation avec les conditions de nutrition. Métabolisme racinaire en milieu salé. Thèse d'Univ. Sci. Biol. Univ. Tunis II, 180 p.
- Savouré JC : 1980. Manipulations pratiques en physiologie végétale. Masson, Paris, 1980.
- Lepoivre P. and Semal J : 1993. Les relations hôte-parasite. Traité de pathologie végétale. Les presses agronomiques de Gembloux, Belgique 620 p.
- Soltani A : 1988. Analyse des effets de NaCl et de la source d'azote sur la nutrition minérale de l'orge. Thèse de Doctorat d'Etat, Faculté de Sciences de Tunis, 322 p.
- Symaraytis S, Neigrotiu I, Jacobs M: 1992. Salt and water resistant mutant isolated from potato plants of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). Med. Fac. Landouw Univ. Gent 57/4a, 1507-1516.