

Compte rendu des travaux pratiques :

*Étude de la réponse et de l'adaptation du maïs à un stress abiotique:
le stress au froid*



I-Résumé

Comme toutes les plantes, le maïs (*Zea Mays*) est un organisme sessile, lors de sa culture, celui-ci doit faire face à de nombreux stress biotique ou abiotique. Parmi ces stress, il y a notamment le stress au froid. Nous avons vu que ce stress impact négativement la croissance et le développement de jeunes plants de maïs via le ralentissement de l'activité enzymatique et du métabolisme énergétique global de la plante. Cette baisse d'activité à un impact sur le transport de l'eau dans la plante et provoque un déficit hydrique dans les feuilles, ce qui provoque une nécrose sur les bords de celles-ci. Ces nécroses peuvent être également causées par le stress oxydatif (la production de ROS) qui dégrade/attaque les membranes lipidiques, l'ADN, oxydent les protéines et donc provoque la mort des cellules. Afin de limiter les effets néfastes de cette production de ROS et les dégâts que ceux-ci peuvent entraîner, la plante va augmenter sa production d'antioxydants et enzymes antioxydantes globale tel que la catalase pour réguler à la baisse le niveau intracellulaire de peroxyde d'hydrogène. Ainsi, le maïs met en place un ensemble de mécanismes adaptatifs morphologiques et métaboliques pour faire face à un stress au froid.

II-Introduction

Les plantes sont des organismes immobiles. Ces dernières doivent par conséquent faire face à de nombreux types de stress. Pour cela, elles ont su mettre en place au cours de l'évolution un ensemble d'adaptations à la fois morphologiques et métaboliques. Par ailleurs, ces stress peuvent aussi bien avoir une origine biotique qu'abiotique. Les grandes cultures agricoles n'échappent pas à ces conditions environnementales stressantes. Ainsi, il est essentiel de comprendre les mécanismes adaptatifs mis en place par ces plantes pour y faire face. Ici, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux adaptations mises en place par le maïs pour lutter contre un stress d'origine abiotique qui est le stress au froid.

Pour nos expérimentations, nous avons donc utilisé le maïs (*Zea Mays*). Cette Angiosperme monocotylédone de type C4 est l'une des plus cultivées dans le monde pour l'alimentation humaine et animale. Sa forte utilisation dans ces domaines en fait un excellent modèle d'étude pour espérer y voir découler des applications concrètes.

Ainsi, nous avons cherché à comprendre les effets et mécanismes adaptatifs morphologiques et métaboliques mises en place par le maïs pour faire face à un stress au froid.

III-Matériels et méthodes

1°) Matériel végétal:

Pour les différentes expérimentations, le modèle qui a été utilisé est le maïs (*Zea mays*). Celui-ci était un écotype connu comme ayant une faible résistance aux basses températures. Tout d'abord, quatre graines ont été mises à germer dans des pots contenant de la vermiculite. Ensuite, les plants ont été mis à pousser en serre pendant 5 semaines dans les conditions suivantes:

- Température: de 22°C le jour et de 18°C la nuit
- Luminosité: lumière naturelle avec lampe HPS 16h par jour
- Humidité relative: 80%
- Arrosage: tous les 3 jours avec solution nutritive

2°) Exposition des plantes au stress:

Après ces 5 semaines de culture, les plantes ont été séparées en 2 lots. Le premier lot a continué d'être exposé aux mêmes conditions de culture que précédemment. Celui-ci sert de lot contrôle. Le second lot a subi un stress au froid, en étant placé à 4°C pendant 3 jours à l'obscurité.

3°) Protocole de mesure des adaptations morphologiques et anatomiques durant un stress:

Nous avons mesuré la croissance et le développement chez les plants contrôle ainsi que ceux en conditions de stress au froid. Ainsi, nous avons d'abord compté le nombre de feuilles pour chaque plants. Nous avons également pesé la matière fraîche (MF) totale des feuilles et de la tige ainsi que la matière sèche (MS).

4°) Protocole de mesure du stress oxydatif:

Pour mesurer le stress oxydatif des différentes plantes soumises ou non au stress au froid, nous nous sommes intéressés à l'H₂O₂ et l'O₂⁻. Ainsi, nous avons prélevé à l'aide d'un emporte pièce, 6 disques foliaire sur la troisième feuille de chacune des plantes restante ayant subi le stress au froid et celle n'ayant pas subi de stress. Puis, les disques foliaires ont été infiltrés avec des solutions de 1 mg/mL DAB ou 0,2% NBT en appliquant le protocole expérimental décrit dans la publication de (Kumar *et al*, 2013) [3]. Le DAB est une molécule qui, au contact de l'H₂O₂, forme un précipité brunâtre qui permet de localiser et quantifier l'H₂O₂ produit dans les tissus alors que le NBT forme un précipité bleu au contact de l'O₂⁻. Par la suite, nous avons récupéré les disques foliaires afin de les observer au microscope et à la loupe binoculaire pour pouvoir comparer les changements morphologiques chez la plante témoin et la plante stressée. Ensuite, les mesures semi-quantitatives d'H₂O₂ et O₂⁻ ont été effectuées sur le broyat des disques foliaires infiltrés selon la méthode décrite dans la publication de (Ramel *et al*, 2009) [4].

5°) Protocole de mesure de peroxydation des lipides:

Pour pouvoir effectuer la mesure de la peroxydation des lipides, nous nous sommes intéressés à doser le MDA via une technique de spectrophotométrie. Pour cette mesure le protocole adapté de (Debona *et al*, 2012) [2].

6°) Protocole de mesure des antioxydants:

Pour la mesure des antioxydants nous nous sommes focalisés sur la mesure de l'activité totale antioxydante (DPPH) et la mesure de la catalase (CAT) La mesure de la DPPH a été adaptée du protocole mise en place par (Csepregi *et al*, 2016) [1]. La mesure de la catalase a quant à elle été adaptée à partir du protocole de (Ramel *et al*, 2009) [4].

IV-Résultats

1°) observations macroscopiques et adaptations morphologiques et anatomiques durant un stress



Figure 1a: Plant contrôle.

Figure 1b: plant stressé au froid

Figure 1: Aspect général d'un plant témoin et d'un plant stressé au froid

Nous avons constaté que les plantes contrôles possèdent une taille plus importante que celles exposées à un stress au froid. Les plantes contrôles possédaient en moyenne 5 feuilles tandis que les plantes soumises à un stress au froid en possédaient 4. Par ailleurs, les plantes soumises à un stress au froid possédaient des feuilles beaucoup plus flétries et sombres que les plantes contrôles.

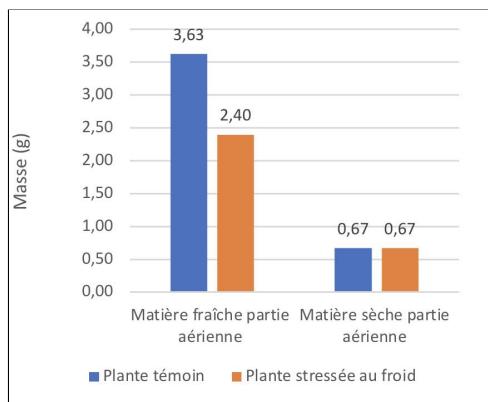


Figure 2: Masse de matière fraîche moyenne et de matière sèche moyenne dans la partie aérienne des 2 lots de plantes exposées ou non à un stress au froid

Nous pouvons observer que la plante témoin non stressée possède une masse fraîche moyenne de sa partie aérienne (tige+feuilles) plus importante que celle de la plante stressée au froid. En effet, la partie aérienne chez la plante témoin était de 3,63 g contre seulement 2,40 g chez la plante soumise au froid. Chez le maïs une exposition au stress au froid entraîne donc une diminution de 34% de la masse fraîche.

Après séchage, la masse devient égale chez la plante stressée et chez la plante témoin puisque nous observons une masse sèche de 0,67 g pour les 2 plantes. Le stress au froid n'induit donc pas une réduction de la matière sèche de la partie aérienne.

Si nous nous intéressons maintenant au pourcentage en eau des 2 lots de maïs, nous constatons que le lot témoin possède en moyenne 81,53% contre seulement 71,94%, soit une diminution de presque 10% d'eau après exposition à un stress au froid.

2°) mesure du stress oxydatif

A- mesure de l'H202

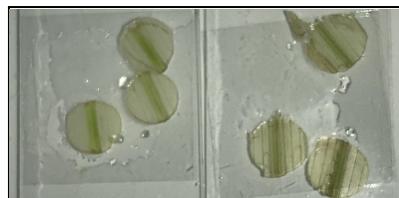


Figure 3: Observation macroscopique des disques foliaires traités au DAB pour les plantes témoins (à gauche) et les plantes stressés (à droite)

Après le traitement au DAB, nous observons une couleur marron révélant la présence d'H2O2 au niveau des contours des disques foliaires et au niveau des nervures aussi bien chez le lot stressé que chez le lot témoin. Toutefois, nous observons une couleur marron révélant une concentration en H2O2 au niveau des nervures plus marquées chez la plante stressée que chez la plante témoin.

Ensuite, grâce à la spectrométrie nous avons déterminé la concentration en H2O2. A partir de la courbe étalon (donnée non présentée) nous avons obtenu la formule suivante donnant la relation entre la densité optique observé et la concentration en H2O2 (en $\mu\text{mol/L}$) de cet échantillon analysé : Concentration en H2O2 = (DO - 0,0418) / 0,00111. Nous avons donc pu déterminer la concentration en H2O2 (en $\mu\text{mol/L}$) de nos 2 échantillons analysés. Nous avons observé une concentration de 352,43 $\mu\text{mol/L}$ de H2O2 pour le lot témoin et de 332,61 $\mu\text{mol/L}$ de H2O2, soit des concentrations en H2O2 très proches et élevées pour les 2 lots.

B- Mesure de O2-

Nous voulions également observer et doser l'O2-, or nous n'avons pas observé de coloration bleue du NBT chez les plantes soumises ou non à un stress. (résultats non présentés). Or nous aurions dû au moins constater la présence de coloration bleu chez le lot stressé au froid. Par conséquent, les résultats du dosage de l'O2- non par pu être exploitable (résultats non présentés).

3°) mesure de peroxydation des lipides



Figure 4: Concentration de MDA (en $\mu\text{mol/g}$ de MF) chez la plante témoin et la plante stressé

Nous avons déterminé une concentration en MDA de 2,29 $\mu\text{mol/g}$ de MF chez la plante témoin et de 3,37 $\mu\text{mol/g}$ de MF chez le lot stressé. Les 2 lots possèdent une concentration en MDA élevée mais celle-ci est 1,47 plus élevée chez la plante stressée au froid que chez la plante témoin.

4°) mesure des antioxydants

A- Mesure de l'activité de la Catalase :

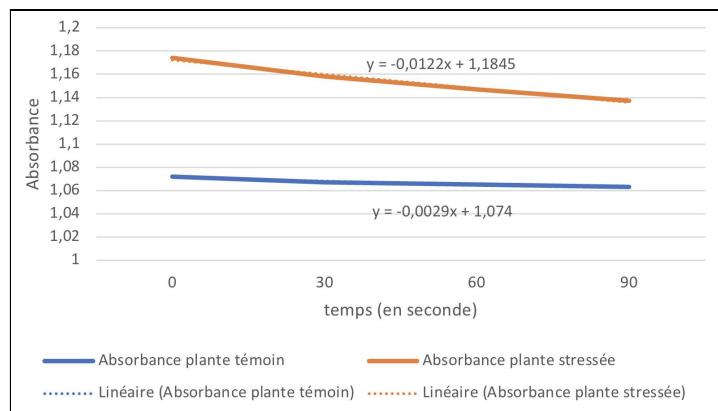


Figure 5: Absorbance (à 240 nm) en fonction du temps chez les plantes témoins et les plantes stressés révélant l'activité de la Catalase

Nous observons que la valeur d'absorbance diminue en fonction temps chez les 2 lots. En traçant les courbes de tendances, nous avons pu déterminer l'équation de droite de l'évolution de l'absorbance en fonction du temps chez les 2 lots. La pente de cette droite nous révèle l'activité de la catalase. Ainsi, nous observons une pente de -0,0122 chez la plante ayant subi le stress au froid et de -0,0029 chez la plante témoin. Ainsi, la plante stressée possède une activité de la catalase 4,2 fois plus élevée que la plante témoin.

B-Mesure de l'activité de la DPPH :

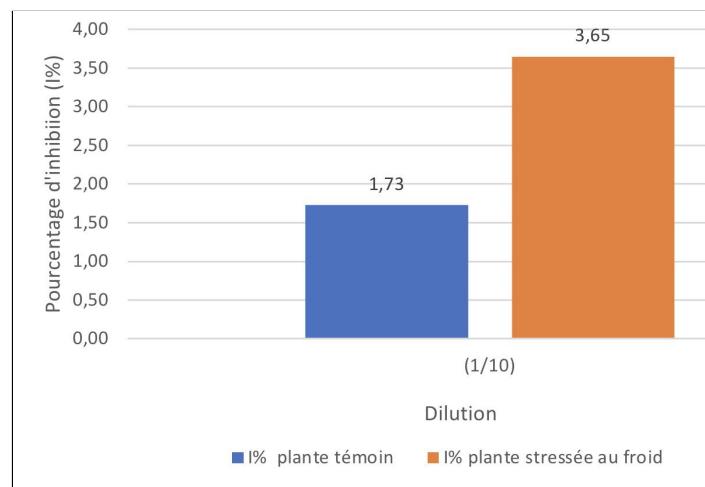


Figure 6: Pourcentage d'inhibition induites par la DDPH chez les plantes stressées ou non au froid

Nous pouvons constater un pourcentage d'inhibition plus élevé chez la plante stressée au froid (3.65%) que chez la plante témoin (1.73%). Ceci nous indique que l'activité antioxydante totale de la plante stressée est deux fois plus grande que celle de la plante témoin.

V-Discussion

Tout d'abord, nous avons constaté que le stress au froid induit des modifications et adaptations morphologiques chez le maïs, en effet nous avons constaté que ce stress entraînait une réduction de la croissance des plants puisque ceux-ci possédaient un nombre de feuilles et une taille globale des parties aériennes plus faible que le témoin. (voir figure 1).

Pour comprendre ce qui a pu entraîner ces observations macroscopiques, il faut notamment s'intéresser aux modifications physiologiques que ce stress au froid peut entraîner. Effectivement, l'exposition au froid provoque notamment un ralentissement des activités enzymatiques et de la fluidité membranaire des cellules. Ceci a pour conséquence de réduire considérablement le métabolisme global de la plante et par conséquent la croissance et développement de la plante.

Cette réduction de croissance peut d'autant plus s'expliquer par le fait que ces plantes ont été placé à l'obscurité durant la période de froid de 3 jours, empêchant par la même occasion le fonctionnement de la photosynthèse et donc de la synthèse de sucres nécessaire pour la formation de nouvelles structures et qui peuvent également être dégradées via notamment la glycolyse et le cycle de krebs pour synthétiser/fabriquer de l'énergie sous forme d'ATP ou de NAD(P)H.

Il est également fort probable que cette diminution de l'énergie produite causée par l'exposition au froid (et l'obscurité), soit responsable de la baisse de la concentration d'eau dans les parties aériennes de la plante stressée (voir figure 2) et du flétrissement de ses feuilles (voir figure 1). En effet, l'absorption et le transport de l'eau par la plante se fait à la fois par un mécanisme passif mais également via un mécanisme actif via les aquaporines, ces dernières ont besoin d'énergie sous forme d'ATP pour fonctionner, et transporter l'eau vers les parties aériennes de la plante. Ce manque d'énergie sous forme d'ATP entraîne donc une diminution de ce type de transport, et provoque un déficit hydrique dans les parties aériennes, qui s'observent via le flétrissement des feuilles (voir figure 2).

Ensuite, nous avons constaté d'autres modifications morphologiques et physiologiques. Nous avons notamment constaté que les plantes exposées au froid avaient des feuilles plus sombres au niveau des bordures, qui semblaient être un début de nécrose (voir figure 1). Cette nécrose pourrait d'une part s'expliquer par le déficit hydrique induisant une mort des cellules les plus éloignées des faisceaux conducteurs.

D'autre part, le stress au froid pourrait provoquer ces nécroses en faisant intervenir d'autres types de mécanismes tels que l'augmentation du stress oxydatif. En effet, nous avons constaté une présence élevée de Formes Actives de l'Oxygène (FAO ou ROS) notamment de l'H₂O₂ chez les feuilles des plantes exposés au froid (voir figure 3). Par ailleurs, nous aurions dû retrouver une concentration en H₂O₂ plus élevée chez la plante exposée au froid que chez la plante témoin. Or nous avons retrouvé une concentration anormalement élevée en H₂O₂ chez la plante témoin, il est fort probable que les conditions de cultures aient été mal contrôlées chez ce lot et que ces plantes aient été exposées à un stress quelconque expliquant la mise en place de mécanisme semblable au lot stressé dont la libération importante en H₂O₂. De plus, même si la coloration avec le NBT n'a pas fonctionné, il est fort probable que nous aurions dû observer une augmentation de l'O₂⁻ chez la plante stressée. Nous savons que les ROS peuvent être impliqués dans des voies de signalisations mais qu'ils peuvent également entraîner (du fait de leur forte réactivité) un certain nombre de dégâts au niveau cellulaire tels que des mutations de l'ADN, oxydation des protéines ou bien des altérations au niveau des membranes, avec la peroxydation des lipides. Nous avons justement observé une présence plus importante de malondialdéhyde (MDA) chez les plantes stressées par rapport aux plantes témoins (voir figure 4). Or le MDA est un résidu qui est produit après la réaction entre des ROS et des lipides, ainsi cela témoigne de l'altération des lipides membranaires causés par le stress oxydatif provoqué lui-même par le stress au froid. Cette altération membranaire pourrait notamment expliquer le début de nécrose observé (voir figure 1).

Les plantes peuvent mettre en place un ensemble de mécanismes pour limiter le stress oxydatif et ses effets néfastes, il y a notamment l'intervention de différentes molécules antioxydantes et enzymes tel que la catalase qui est une enzyme que l'on retrouve exclusivement dans les peroxysomes et les glyoxysomes. Son activité permet notamment de transformer deux molécules de peroxyde d'hydrogène en dioxygène et deux molécules d'eau. Or nous avons observé que son activité était plus élevée chez les plantes stressées au froid que chez les plantes témoins (voir figure 5). Nous avons fait les mêmes observations pour l'activité antioxydante globale (voir figure 6), ceci confirme donc la mise en place de mécanismes adaptatifs pour lutter contre les conditions oxydantes causées par le stress au froid.

VI-Conclusion

Pour rappel, nous avions cherché à comprendre les effets et mécanismes adaptatifs morphologiques et métaboliques mis en place par le maïs pour faire face à un stress abiotique qui est le stress au froid. Ainsi, nous avons vu que ce stress induit des changements sur la croissance et le développement de la plante via le ralentissement de l'activité enzymatique et du métabolisme énergétique global de plante. Cette baisse d'activité a un impact sur le transport de l'eau dans la plante et provoque un déficit hydrique dans les feuilles, ce qui provoque une nécrose sur les bords de celles-ci. Cependant, cette nécrose peut être également causée par le stress oxydatif (la production de ROS) qui dégrade/attaque les membranes lipidiques, l'ADN, oxydent les protéines et donc provoque la mort des cellules. Afin de limiter les effets néfastes de cette production de ROS et les dégâts que ceux-ci peuvent entraîner, la plante va augmenter sa production d'antioxydants et enzymes antioxydantes globale tel que la catalase pour réguler à la baisse le niveau intracellulaire de peroxyde d'hydrogène.

Ici, nous avons étudié les mécanismes adaptatifs morphologiques et métaboliques mis en place par le maïs lors d'un stress au froid dans des conditions d'obscurité. Mais en réalité, hormis durant la nuit, les plantes se retrouvent rarement dans ces conditions. Il aurait donc été intéressant d'effectuer de nouvelles expérimentations puis de comparer les niveaux de stress, et les mécanismes d'adaptations, lors d'un stress au froid pendant des conditions d'ensoleillement normales ou très élevées. Comme cela peut parfois être le cas dans le nord de l'Europe, au début du printemps, où les matinées sont fraîches par temps très ensoleillé.

VII-Références

- [1]: Kristóf Csepregi, Susanne Neugart, Monika Schreiner and Éva Hideg (2016) Comparative Evaluation of Total Antioxidant Capacities of Plant Polyphenols. *Molecules* 21 (208) 1-17.
- [2]: Daniel Debona, Fabrício Ávila Rodrigues, Jonas Alberto Rios, and Kelly Juliane Telles Nascimento (2012) Biochemical Changes in the Leaves of Wheat Plants Infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 102 : 1121-1129.
- [3]: Deepak Kumar, Mohd Aslam Yusuf, Preeti Singh, Meryam Sardar et Neera Bhalla Sari (2013) Modulation of antioxidant machinery in α - tocopherol-enriched transgenic *Brassica juncea* plants tolerant to abiotic stress conditions. *Protoplasma* 250 : 1079–1089.
- [4]: Fanny Ramel, Cécile Sulmon, Matthieu Bogard, Ivan Couée and Gwenola Gouesbet (2009) Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology* : 9-28.