

INFLUENCE D'UN CHOC OSMOTIQUE SUR LA COMPOSITION DES FEUILLES DE COTONNIER EN ACIDES AMINES LIBRES

PAWEŁ HANOWER et JANINA BRZOZOWSKA

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, Centre d'Adiopodoumé, Physiologie Végétale B.P. 20, Abidjan, Côte d'Ivoire

(Reçu 26 Novembre 1974)

Key Word Index—*Gossypium* sp.; Malvaceae; cotton; free amino acids; effect of osmotic stress.

Abstract—The effect of water stress on the free amino acids in cotton leaves has been investigated. The water deficit, obtained by lowering of osmotic potential through the use of polyethylene glycol (PEG-600) as the osmotic agent, induces an accumulation of free amino acids.

Significant modifications in the composition of this fraction are observed. The major differences from treated and untreated leaves are in the levels of γ -aminobutyric acid, asparagine, proline, and glutamic acid and its amide.

INTRODUCTION

Il est bien établi que la sécheresse entraîne des perturbations profondes au niveau du métabolisme azoté de la plante [1, 2]. Pour la plupart des végétaux étudiés on note, en cas d'un déficit hydrique, une protéolyse accrue [2-5], une inhibition de la protogénèse [6-10] et une accumulation des composés azotés solubles [2, 6, 11-13]. Toutefois, les modifications dans la composition de la fraction des acides aminés libres sous l'effet de la déshydratation varient d'une espèce à l'autre témoignant ainsi d'une diversité des réactions et des voies métaboliques différentes selon l'espèce considérée.

L'étude de ces modifications chez le cotonnier fait l'objet du présent travail. Il fait suite aux études récemment publiées sur l'influence d'un choc hydrique sur l'activité d'une hydrolase, la phosphatase acide [14], et sur les polyphénols des feuilles de cotonniers [15].

RESULTATS

La baisse du potentiel osmotique au niveau des racines provoque rapidement—en moins d'une

heure après l'application du PEG-600—le flétrissement des feuilles. Le phénomène débute par le sommet de la plante et gagne progressivement les étages inférieurs. Les feuilles s'enroulent et leur teinte verte vive au début du traitement devient terne, brunâtre.

Au moment de la récolte la teneur moyenne en H_2O des feuilles des plantes ayant subi le choc n'est que de 44,6% de la matière fraîche contre 74,3% pour les témoins. Cette déshydratation est accompagnée d'une diminution du taux des acides aminés protéiques dont la teneur globale chute de 1,37 mmol par gramme de la matière sèche foliaire dans les feuilles témoins à 0,85 mmol dans les feuilles des plantes traitées au PEG (soit une baisse de près de 40%) et d'une augmentation considérable de la fraction des acides aminés libres.

Comme le montre le tableau 1, la teneur globale en aminoacides libres a augmenté de 50%, sous l'effet du choc, dans les feuilles des étages inférieurs et s'est accrue par un facteur 2,5 dans les feuilles des étages supérieurs. Ces dernières sont visiblement plus affectées par le traitement que les feuilles plus âgées.

Tableau 1. Influence d'un choc osmotique sur les acides aminés libres et autres composés positifs à la ninhydrine des feuilles de cotonnier

Composés	$\mu\text{Mol par g de la matière sèche de tissu foliaire}$			
	Feuilles supérieures		Feuilles inférieures	
	Témoin	PEG	Témoin	PEG
Acide cystéique	1,06	0,51	0,99	0,59
Glutathion	0,25	0,76	0,67	1,19
Acide aspartique	2,03	0,77	1,78	1,11
Asparagine*	0,34	10,17	0,45	1,70
Threonine + Glutamine†	2,76	9,61	4,93	8,74
Sérine	1,80	2,13	1,52	1,70
Acide glutamique	4,63	1,18	4,70	0,96
Proline	trace	4,97	trace	2,82
X	trace	trace	trace	trace
Glycine	0,62	0,63	0,57	0,63
Alanine	7,16	7,74	7,06	7,43
Valine	trace	2,94	trace	1,24
Méthionine		trace		trace
Isoleucine	trace	1,72	trace	0,73
Leucine	trace	0,91	trace	0,59
Tyrosine	trace	0,37	trace	0,22
Phénylalanine	trace	0,71	trace	0,33
Ethanolamine	2,89	1,29	1,86	trace
Acide γ -aminobutyrique	2,15	16,02	3,66	15,02
Ornithine	0,75	1,03	0,92	1,01
Lysine	trace	0,49	trace	0,52
Tryptophane	trace	trace	trace	trace
Histidine	trace	0,27	trace	trace
Arginine	trace	trace	trace	trace
Total	26,44	64,22	29,11	46,53

* Éluée en même temps que Threonine et Glutamine et évaluée d'après le rapport (absorption à 570 nm)/(absorption à 440 nm).

† Somme Threonine + Glutamine calculée en glutamine.

Les traits les plus saillants du remaniement survenu au niveau des acides aminés particuliers est l'accumulation spectaculaire de l'acide γ -aminobutyrique qui devient le constituant dominant de la fraction aminoacide libre, l'apparition d'une quantité importante de proline, pratiquement absente dans les feuilles témoins, et l'augmentation sensible des amides, surtout de l'asparagine. Simultanément les acides glutamique et aspartique accusent une baisse. Les autres acides aminés sont relativement peu ou pas affectés.

Exprimés en % du pool aminoacide libre global, les quatre composés (asparagine, proline, acide γ -aminobutyrique et threonine + glutamine) qui s'accumulent sous l'effet du déficit hydrique représentent à eux seuls 64% de cette fraction dans les feuilles déshydratées contre 20% seulement dans les feuilles témoins. Par contre, la part des acides dicarboxyliques (acide glutamique et acide aspartique) est fortement diminée sous l'effet du choc — elle passe de 25 à 3%.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le rôle des amides en tant que substances de stockage de l'azote chez les végétaux est bien connu [23] et leur accumulation dans les conditions physiologiquement défavorables a été maintes fois établie [18, 2, 4, 6, 24-28]. Dans le cas de stress hydrique, l'hydrolyse protéique pourrait être responsable de la présence de grandes quantités d'asparagine et de glutamine libres; leur dégradation serait alors freinée, surtout en ce qui concerne l'asparagine [4]. Ceci n'exclut pas la possibilité de synthèse des amides par d'autres voies métaboliques et, en particulier, leur formation par amidation des acides dicarboxyliques, en fixant ainsi l'ammoniaque issue des désaminations des autres aminoacides libérés des protéines [2]. La baisse des acides glutamique et aspartique dans les feuilles déshydratées plaide en faveur d'une telle alternative.

L'apparition massive de l'acide γ -aminobutyrique (Tableau 1), acide aminé non protéique, peut

être expliquée par les transformations métaboliques des autres constituants du pool aminoacide libre. Il est communément admis, quoique non sans restrictions [29], que l'acide γ -aminobutyrique est formé dans les plantes par décarboxylation de l'acide glutamique [30, 31].

Chez le cotonnier, le choc hydrique exercerait donc, soit une action favorable sur cette décarboxylation, soit une action défavorable sur le métabolisme de l'acide γ -aminobutyrique lui-même en bloquant les réactions de transamination avec l'acide pyruvique [32, 33] ou l'acide α -céto glutarique [34], soit toutes les deux à la fois. La première alternative trouve un appui dans le fait qu'une accélération de la décarboxylation de l'acide glutamique marqué au ^{14}C a été constatée en présence de NaCl chez les jeunes plantes d'*Aster tripolium* L. [35]. On peut supposer qu'un choc osmotique, en altérant les structures protoplasmiques [14], affecte la compartimentation, existant dans les conditions normales, de la glutamate-décarboxylase et de son substrat [36]. Une étude sur la localisation de cet enzyme pourrait apporter la confirmation de cette hypothèse.

Quant à la réduction de la vitesse de transamination de l'acide γ -aminobutyrique avec le céto glutarate, elle peut être causée par une accumulation de semialdehyde succinique [32] résultant de l'insuffisance d'oxygène [37]. On sait en effet qu'un des traits proéminents de la déshydratation est la fermeture des stomates [13, 38, 39].

La déviation métabolique conduisant à l'accumulation d'une quantité inhabituelle de l'acide γ -aminobutyrique semble être caractéristique de certaines espèces. Un accroissement de ce composé sous l'effet de la sécheresse a été observé chez les jeunes plantules de *Citrus* [28], alors qu'aucune augmentation n'a été constatée chez Bermuda ass [6].

L'apparition d'une quantité importante de proline libre est un phénomène à caractère beaucoup plus général. Une telle accumulation est observée chez diverses espèces végétales soumises à des agressions de nature variée: choc hydrique [3, 6, 13, 28, 40, 41], salinité [35, 42], carences minérales [24], basses températures [43, 44] ou maladies [45]. On peut envisager différentes causes possibles de cette accumulation. Elle pourrait être une conséquence de la libération de la proline protéique [10] et aussi de l'inhibition de

l'incorporation de l'iminoacide dans les protéines, inhibition observée tant sous l'action d'un déficit hydrique [10] que dans les conditions de salinité [35, 42, 46, 47].

D'autre part, la proline pourrait provenir de l'acide glutamique [6, 35, 42] ou être synthétisée *de novo* à partir de CO₂ [6], processus favorisés par la sécheresse et la présence du NaCl dans le milieu. Sa métabolisation dans les conditions de stress serait ralentie [6, 10, 46, 47], entre autres son intégration dans le noyau tétrapyrrolique de la chlorophylle [48], l'appareil pigmentaire de la feuille étant affecté [14]. Barnett et Naylor [6] attribuent à la proline libre le rôle de composé de stockage du carbone et de l'azote durant le stress hydrique, alors que la synthèse d'amidon et des protéines est inhibée.

Enfin, d'une manière générale, le phénomène d'accumulation de certaines substances dans les feuilles peut provenir de leur migration à partir des autres organes, notamment les racines. En conclusion, les modifications constatées de la composition en acides aminés libres des feuilles de cotonnier sous l'effet du choc osmotique pourraient avoir des causes multiples. Des études faisant appel aux molécules marquées et aux recherches enzymatiques devraient être entreprises afin d'élucider les mécanismes biochimiques impliqués.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les cotonniers d'une variété très sensible à la sécheresse, HAR 444-2, issu de croisement entre *G. hirsutum*, *G. arboreum* et *G. raimondii* ont été cultivés en serre, en aquiculture, sur une solution nutritive de Hoagland modifiée [16] additionnée d'oligoéléments [17]. Au stade de fructification, après 4 mois environ de culture, un lot des plantes a été soumis au choc osmotique durant 24 hr par l'abaissement à -20 J par mol du potentiel osmotique de la solin de culture à l'aide du polyéthylène glycol PEG-600. L'autre lot a servi de témoin. Les feuilles des six étages supérieurs (à partir du sommet) et des étages inférieurs (feuilles restant à l'exclusion de celles du bas, les plus âgées) ont été prélevées et analysées séparément.

L'extraction et la chromatographie sur papier des acides aminés ont été effectuées suivant les techniques décrites antérieurement [18]. L'azote protéique a été dosé, sur le résidu insoluble à l'alcool, par la méthode de Nessler [19].

Les acides aminés libres ont été dosés à l'autoanalyseur Technicon à une seule colonne. L'élution a été effectuée à la temp. de la colonne de 60° au moyen d'un système composé de trois tampons à pH 2.785, 3.8 et 5.0 formant un gradient continu [20, 21]. Dans ces conditions les deux amides (asparagine et glutamine) ainsi que la thréonine sont élues en même temps et forment un seul pic. L'asparagine a pu être évaluée d'après le rapport absorption à 570 nm/absorption à 440 nm. La somme glutamine + thréonine a été calculée en glutamine.

Il a été, en effet, constaté à l'aide de la chromatographie sur papier que les feuilles de cotonnier ne contiennent que très peu de thréonine et que, sous l'action du stress, c'est la glutamine qui s'accroît. Les dosages des acides aminés protéiques ont été réalisés sur le résidu insoluble à l'alcool après hydrolyse acide de 24 hr en milieu CIH 6 N à 110° [22].

BIBLIOGRAPHIE

1. Petrie, A. H. K. et Wood, J. G. (1938) *Ann. Botany* **2**, 887.
2. Mothes, K. (1958) in: *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol. 3, p. 656, Réd Ruhland W.. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Götingen.
3. Kemble, A. R. et Macpherson, H. T. (1954) *Biochem. J.* **58**, 46.
4. Zholkevitch, V. N. et Koretskaya, T. F. (1959) *Fiziol. Rast.* **6**, 690.
5. Shah, C. B. et Loomis, R. S. (1965) *Physiol. Plantarum* **18**, 240.
6. Barnett, N. M. et Naylor, A. W. (1966) *Plant Physiol.* **41**, 1222.
7. Ben-Zioni, A., Itai, C. et Vaadia, Y. (1967) *Plant Physiol.* **42**, 361.
8. Nir, I., Poljakoff-Mayber, A. et Klein, S. (1970) *Israel J. Botany* **19**, 451.
9. Hsiao, T. O. (1970) *Plant Physiol.* **46**, 281.
10. Stewart, C. R. (1972) *Plant Physiol.* **51**, 508.
11. Roberts, E. A. H. et Wood, D. J. (1951) *Current Sci. (India)* **20**, 151.
12. Richards, L. A. et Wadleigh, C. H. (1952) in: *Agronomy Monographs* (Shaw, B. T., ed.) Vol. 2, p. 73.
13. Thompson, J. F., Stewart, C. R. et Morris, C. J. (1966) *Plant Physiol.* **41**, 1578.
14. Hanower, P. et Brzozowska, J. (1973) *Physiol. Vég.* **11**, 385.
15. Brzozowska, J., Hanower, P. et Tanguy, J. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2353.
16. Vieira da Silva J. B. (1970) *Thèse Doct. Etat Sci. Nat. Orsay*.
17. Hewitt J. (1952) *Sand and water culture methods used in study of plant nutrition*. p. 189. Ed. Comm. Agr. Bureau.
18. Hanower, P. (1967) *Thèse Doct. Etat Sci. Nat. Paris*.
19. Umbreit, W. W., Burris, R. H. et Stauffer, J. F. (1959) *Manometric Methods*, pp. 238 et 274. Ed. Burgess Publ.
20. *Technical manual, Amino Acid Analyser*, Technicon Instruments Corp., Ardsley, New York.
21. Piez, K. A. et Morris, L. (1960) *Anal. Biochem.* **1**, 187.
22. Welcher, F. J. (1963) *Standard Methods of Chemical Analyses*, 6ème éd. Vol. 2A, p. 922. Ed. Van Nostrand. New York.
23. Steward, F. C. et Bidwell, R. G. S. (1962) in: *Amino Acid Pools*. p. 667 (Holden, J. T., ed.). Elsevier, Amsterdam.
24. Thompson, J. F., Morris, C. J. et Gering, R. K. (1960) *Qual. Plant. Mater. Vég.* **6**, 261.
25. Freiberg, S. R. et Steward, F. C. (1960) *Ann. Botany* **24**, 147.
26. Crane, F. A. et Steward, F. C. (1962) Cornell Univ. Exp. Sta. Mem. 379, 91.
27. Oaks, B. A. (1966) *Plant Physiol.* **41**, XII.
28. Chen, D., Kessler, B. et Monselise, S. P. (1966) *Plant Physiol.* **39**, 379.
29. Steward, F. C., Bidwell, R. G. et Yemm, E. W. (1956) *Nature* **178**, 734 et 789.
30. Schales, O., Mims, V. et Schales, S. S. (1946) *Arch. Biochem. Biophys.* **10**, 355.
31. Naylor, A. W. et Tolbert N. E. (1956) *Physiol. Plantarum* **9**, 220.
32. Dixon, R. O. D. et Fowden, L. (1961) *Ann. Botany* **25**, 514.
33. Streeter, J. G. et Thompson, J. F. (1972) *Plant Physiol.* **49**, 579.
34. Sanchez-Medina, F. et Mayor, F. (1970) *Rev. Españ. Fisiol.* **26**, 217.
35. Goas, M., Goas, G. et Larher, F. (1970) *C.R. Acad. Sci. Paris* **271**, 1763.
36. Lane, T. R. et Stiller, M. (1966) *Plant Physiol.* **41**, XII.
37. Jacoby, W. B. et Scott, E. M. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 937.
38. Iijin, W. S. (1957) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **8**, 257.
39. Vaadia, Y., Raney, F. C. et Hagan, R. M. (1961) *Ann. Rev. Plant Physiol.* **12**, 265.
40. Prusakova, L. D. (1960) *Fiziol. Rast.* **7**, 139.
41. Routley, D. G. (1966) *Crop Sci.* **6**, 358.
42. Larher, F., Goas, M. et Goas, G. (1970) *C.R. Acad. Sci. Paris* **271**, 1880.
43. Heber, U. (1958) *Planta* **52**, 431.
44. Saint-Quervel, A. M. (1958) *C.R. Acad. Sci. Paris* **247**, 1031.
45. Seitz, E. W. et Hochster, R. M. (1964) *Life Sci.* **3**, 1033.
46. Goas, M. (1971) *C.R. Acad. Sci. Paris* **272**, 414.
47. Larher, F. (1971) *C.R. Acad. Sci. Paris* **272**, 823.
48. Duranton, H. et Maille, M. (1962) *Ann. Physiol. Vég.* **4**, 271.