

ETUDE DE L'EFFET D'UN STRESS OXYDATIF CAUSE PAR UN HERBICIDE SYSTEMIQUE COSSACK SUR LE BLE DUR (*Triticum durum* Desf.)

[STUDY OF THE EFFECT OF OXIDATIVE STRESS CAUSED BY A SYSTEMIC HERBICIDE COSSACK ON DURUM WHEAT (*Triticum durum* Desf.)]

Nabiha Belahcene¹, Wahiba Mouaissa¹, Noureddine Zenati², and Mohamed Réda Djebbar³

¹Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Souk Ahras, BP 1553, Algeria

²Laboratoire de toxicologie cellulaire, université Annaba, BP 12, Algeria

³Laboratoire de sécurité environnementale et alimentaire, université Annaba, BP 12, Algeria

Copyright © 2015 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The objective of this contribution is to study the effect of different concentrations of a systemic herbicide Cossack on some antioxidant activities among the durum wheat (*Triticum durum* Desf.).

The results indicate the existence of an oxidative stress generated by the herbicide on the varieties studied, proportional to the concentration used. Faces of the stress present, plants of wheat mobilize antioxidant systems different from one variety to another allowing you to determine the response and the degree of tolerance of each cultivar.

KEYWORDS: Cossack, Durum wheat, Oxidative Stress, Antioxidant Enzymes, Tolerance.

RESUME: L'objectif de cette contribution est d'étudier l'effet de différentes concentrations d'un herbicide systémique Cossack sur quelques activités antioxydantes chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.).

Les résultats obtenus révèlent l'existence d'un stress oxydatif généré par l'herbicide sur les variétés étudiées, proportionnel à la concentration utilisée. Face au stress présent, les plantules de blé mobilisent des systèmes antioxydant différents d'une variété à une autre permettant ainsi de déterminer la réponse et le degré de tolérance de chaque cultivar.

MOTS-CLEFS: Cossack, Blé dur, Stress oxydatif, Enzymes Antioxydants, Tolérance.

1 INTRODUCTION

L'usage des herbicides ne cesse de se multiplier dans de nombreux domaines et en grandes quantités, cependant, la plus part de ces herbicides sont hautement toxiques et difficilement biodégradables et peuvent entraîner une surproduction des ROS générateurs du stress oxydatif dans différents compartiments tissulaires [1].

Les molécules récemment synthétisée sont causé des effets sur les plantes, capables de modifier leur métabolisme et sa morphologie, ce qui influe sur leur croissance et leur production.

Pour se protéger, les cellules ont plusieurs façons d'atténuer les effets du toxicité des ROS et par conséquent le stress oxydatif et pour contrer à ces dernières, un système de défense antioxydant très efficace composée de deux constituants non enzymatiques et enzymatiques, est présent dans toutes les cellules végétales.

L'élucidation des effets des herbicides sur les plantes implique la connaissance des mécanismes exacts de la substance de l'herbicide. Autrement dit, il est nécessaire de découvrir la voie ou les voies métaboliques affectées, ainsi que les systèmes enzymatiques qui sont inhibés ou stimulés dans la cellule végétale par un herbicide ou un autre.

La défense enzymatique est représentée par la catalase, la peroxydase, la superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxydase, la déhydroascorbate réductase, la glutathion réductase, la monodéhydroascorbate réductase, la glutathion S-transférase et par gaïacol peroxydase [2]. Le système non enzymatique inclus, les caroténoïdes, la glutathion, le tocophérol, les flavonoïdes etc. [3].

C'est donc, dans ce contexte que nous avons mené notre étude, qui consiste à déterminer l'influence de l'herbicide systémique Cossack[®] OD introduit récemment en Algérie et utilisé à grande échelle pour le contrôle des adventices des cultures céréalières, sur l'activité du glutathion, de la catalase, de l'ascorbate peroxydase, du gaïacol peroxydase et de glutathion S-transférase sur le blé dur (*Triticum durum* Desf) mis à la germination en présence de concentrations croissantes de l'herbicide.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 CONDUITE DE L'ESSAI

La présente étude a portée sur trois variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf) : Sersou, Carioca et Wercenis, l'essai a été réalisé dans des pots contenant un mélange de terreau et de sable dont les proportions respectives de 3/1.

Les graines ont été préalablement stérilisées à l'hypochlorite de sodium, le semis a été réalisé à raison de quinze graines par pot à une profondeur de 2 cm. En effet, toutes les conditions de culture sont contrôlées : la luminosité (14 heures de jour / 10 heures de nuit), la température (24 °C le jour / 18 °C la nuit). La nutrition minérale est assurée par une solution nutritive de Hoagland et le traitement par l'herbicide Cossack a été réalisés par pulvérisation au stade 3 feuilles. Quatre concentrations ont été préparées, déterminées dans un essai préliminaire à partir de la dose au champ (1 l / ha) plus un témoin non traité (0, 0,4, 1,6, 2,4, et 3,2 ml/pot), le dispositif expérimental est un bloc complètement randomisé.

L'herbicide utilisé Cossack[®] OD, est composé de deux matières actives (Mésosulfuron, l'Iodosulfuron-méthyle sodium) et un phytoprotecteur. C'est un herbicide sélectif, bien toléré par les blés traités grâce à l'adjonction du safener se caractérisant par une adhésion optimale, une résistance au lessivage et un potentiel de pénétration renforcé grâce sa nouvelle formulation OD (huile dispersible).

2.2 PARAMÈTRES ANALYSÉS

La méthode adoptée afin d'obtenir l'extrait enzymatique des racines de blé traité avec Cossack pour doser le glutathion est celle de [4]. L'absorbance est mesurée spectrophotométriquement à 412 nm et la concentration de glutathion (GSH) est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 13,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Afin d'obtenir l'extrait enzymatique des feuilles de blé traité avec Cossack suivant la méthode de [5], l'extrait sera utilisé pour la mesure de l'activité de la catalase, de l'ascorbate peroxydase et du gaïacol peroxydase.

L'activité de la catalase (CAT) est mesurée par la diminution de la densité optique à 240 nm ($\epsilon = 39400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due à la consommation de H_2O_2 suivant la méthode [6], la décroissance de l'absorbance est enregistré pendant 3 min, 3ml du volume réactionnel contient 100 μl extrait enzymatique, 50 μl H_2O_2 à 0,3 %, 2850 μl Tampon Phosphate (50mM, pH=7,2).

Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate peroxydase (APX) est réalisé suivant le protocole adopté par [7]. Le volume réactionnel est formé de 3 ml contient 2850 μl Tampon Phosphate NaK-ascorbate, 100 μl d'extrait enzymatique et 50 μl de H_2O_2 à 3%. La réaction est suivie par la variation de l'absorbance à 290 nm suite à l'ajout d'eau oxygénée pendant 1 min. L'activité de l'enzyme est calculée selon le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 2800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, exprimée en nmol/min/mg de protéine.

L'activité du gaïacol peroxydase (GPX) est déterminée selon la méthode de [8], cette activité est mesurée par l'augmentation de l'absorbance à 470 nm due à la polymérisation du gaïacol en tétra gaïacol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le volume réactionnel contient 2850 μl tampon Phosphate- Gaïacol, 50 μl H_2O_2 à 0,03% et 100 μl extrait enzymatique. Le coefficient d'extinction linéique molaire utilisé est de $2470 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, l'activité GPX est exprimée en nmol/min/mg de protéine.

Le dosage de l'activité Glutathion S-Transférase (GST) est réalisé selon la méthode de [9], la variation de la densité optique due à l'apparition du mélange CDNB/GSH est mesurée toutes les 15 secondes pendant 1 minute à 340 nm.

3 RESULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 rend la dynamique de l'activité glutathion dans les plantules traitées avec les quatre doses croissantes de Cossack. L'activité GSH augmente au fur et à mesure que la dose herbicide augmente chez le cultivar Sersou avec 3fois la teneur de témoin notée à la dose maximale, cette augmentation est très hautement significative pour toutes les doses par rapport au témoin.

L'analyse de la variance à deux critères de classification, montre que les teneurs en GSH diffèrent significativement d'une variété à une autre et semblent être plus faibles chez la variété Carioca qui, affiche en présence des mêmes quatre concentrations de Cossack une diminution de 65 % de la teneur en GSH à la deuxième dose par rapport au témoin. Cette diminution se situe entre 40 % pour la deuxième dose d'herbicide et 75 % pour la dose maximale chez la variété Wercenis par rapport au témoin non traité (figure 1).

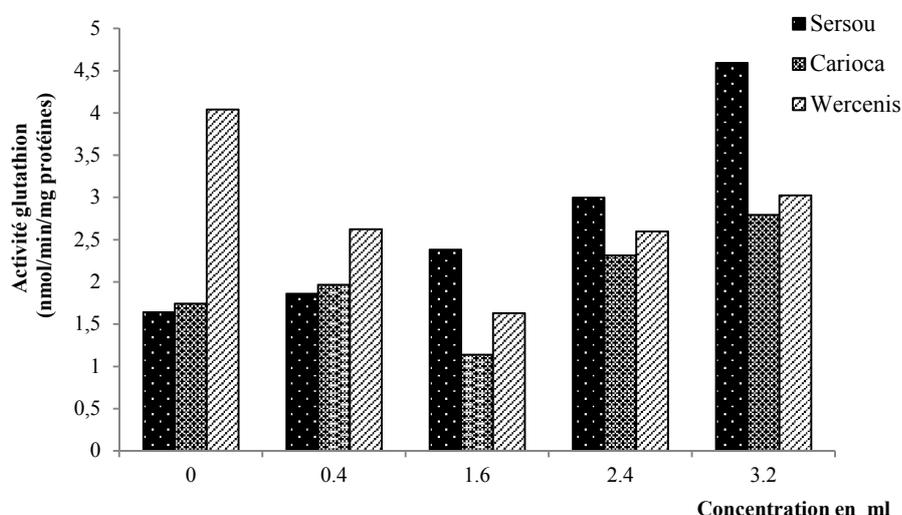


Figure 1. Effet de différentes concentrations de l'herbicide Cossack sur l'activité du glutathion des plantules de blé chez les trois variétés étudiées (T=0ml, D₁=0,4ml, D₂=1,6ml, D₃=2,4 ml et D₄=3,2 ml. Les valeurs moyennes ont été déterminées sur trois mesures individuelles.

Les éléments du système antioxydant est particulièrement la catalase, sont connus par leur implication contre le stress oxydatif [10]. Le dosage de la catalase, affiche globalement une variation variétale de son activité.

La figure 2 présente la dynamique de l'activité catalase dans les feuilles traitées avec des concentrations différentes de l'herbicide. Après le traitement des plantules de blé avec Cossack, l'activité de la catalase diminue chez Sersou sous l'effet des trois dernières doses à l'exception de la dose 0,4ml, de 27 % noté chez la dose maximale par rapport à l'activité de l'enzyme dans les plantules du lot témoin.

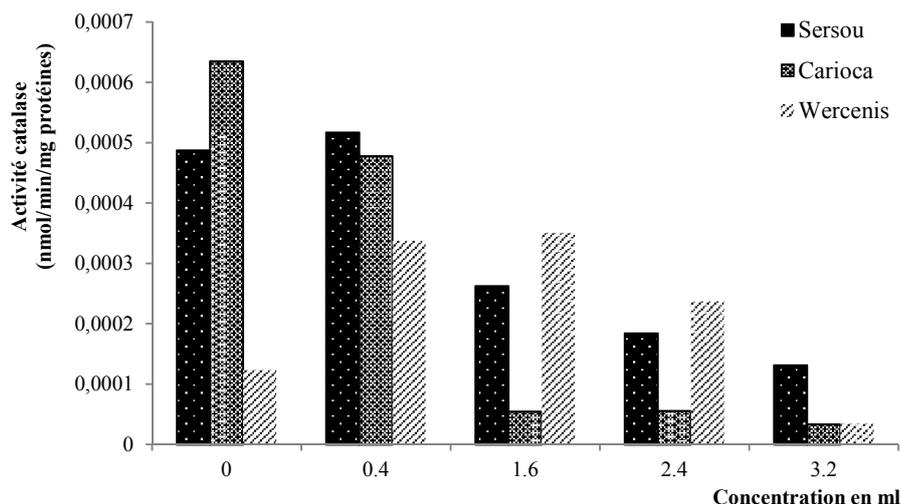


Figure 2. Effet de différentes concentrations de l'herbicide Cossack sur l'activité catalase des plantules de blé chez les trois variétés étudiées ($T=0\text{ml}$, $D_1=0,4\text{ml}$, $D_2=1,6\text{ml}$, $D_3=2,4\text{ml}$ et $D_4=3,2\text{ml}$). Les valeurs moyennes ont été déterminées sur trois mesures individuelles.

L'effet inhibiteur de l'herbicide sur la catalase chez la variété Carioca augmente avec l'accroissement de sa concentration chez les quatre doses testées et l'activité de l'enzyme diminue progressivement jusqu'à 5,2 % à la dose maximale en comparaison avec le niveau du témoin. La répression de la catalase chez Wercenis par cette dose de Cossack se maintient la même que Carioca quoique l'activité de la catalase aux autres doses augmente d'environ 3fois, notée à la deuxième dose comparativement à la valeur de l'enzyme décelée chez le témoin. Cela s'expliquerait par une atteinte métabolique de la cellule à fortes concentrations la rendant incapable de synthétiser certaines enzymes à l'image de la catalase [11].

La diminution de la catalase à la quatrième dose peut être due à une altération des voies de synthèse de cette enzyme à la suite d'une cytotoxicité de la substance phytosanitaire. Les données présentées ci-dessus mènent à la conclusion que la catalase est plus sensible à l'action de Cossack, ce qui a conduit à l'installation d'un trouble causé par le stress oxydatif provoqué par l'herbicide [12].

Cette agression oxydative est associée à l'augmentation de la concentration des espèces réactives d'oxygène, comme le radical superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle [13] et il est possible que la compartimentation de la catalase dans les peroxysomes ait limité le rôle que joue l'enzyme pour restreindre la production de peroxyde d'hydrogène dans les plantes soumises au stress oxydant.

L'ascorbate peroxydase (APX) est considérée comme étant l'enzyme la plus importante pour extraire le peroxyde d'hydrogène dans le cytosol et le chloroplaste des cellules végétales. L'activité de l'APX permet de mesurer la capacité de l'enzyme à oxyder l'acide ascorbique en présence de peroxyde d'hydrogène. Des nouvelles réponses variétales différentielles sont apparues pour l'ascorbate peroxydase e sous l'effet des différentes doses chez les trois cultivars étudiés.

L'activation de L'APX déterminée par les différentes concentrations de Cossack est plus importante chez Sersou avec un minimum de 0.0016 nmol/min/mg à la dose à 0.4 ml et un maximum de 0.0045 nmol/min/mg à 2.4ml par rapport aux témoins (figure 3). Chez Carioca, mis à part la première dose où la teneur en APX dépasse celle de témoin (0.0029 nmol/min/mg), l'activité de cette enzyme diminue tandis que la concentration de l'herbicide s'accroît sous l'effet des autres concentrations (figure 3).

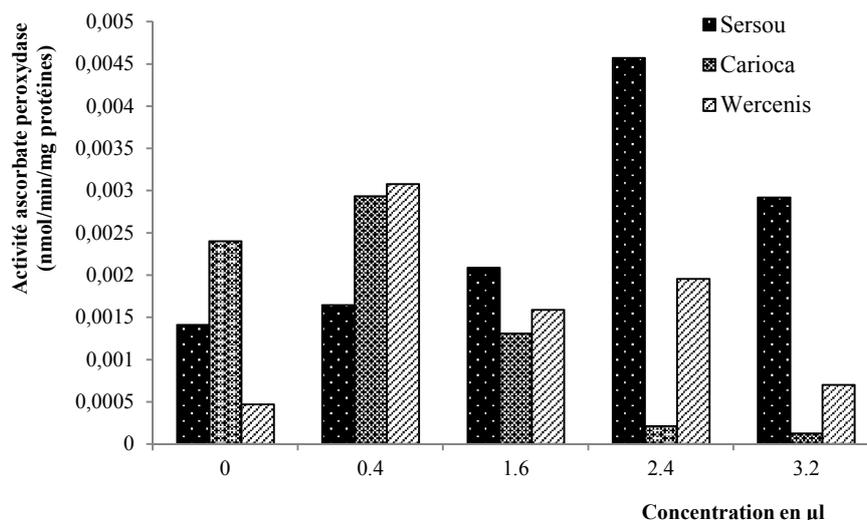


Figure 3. Effet de différentes concentrations de l'herbicide Cossack sur l'activité ascorbate peroxydase des plantules de blé chez les trois variétés étudiées (T=0ml, D₁=0,4ml, D₂=1,6ml, D₃=2,4 ml et D₄=3,2 ml. Les valeurs moyennes ont été déterminées sur trois mesures individuelles.

L'herbicide stimule l'activité de cette enzyme chez Wercenis, qui devient maximale et approximativement 6fois de sa valeur trouvée dans les plantules du témoin sous l'effet de la première dose. [16], soulèvent que l'induction des enzymes antioxydantes à l'image de l'APX lors du phénomène de stress pourrait dans certaines circonstances être conditionnée par un manque de la synthèse de la catalase, cela pourrait être imputé au fait que les catalases sont principalement localisées au niveau du peroxysome alors que l'APX se trouvent dans au moins quatre autres organites cellulaires.

L'activité de l'APX dans les plantules de Sersou soumises à un stress oxydant a été sensiblement plus forte que dans celles de témoin tandis qu'elle est restée inchangée ou a été réduite dans les plantules de Carioca (Figure 3). Pour ce qui est des différences entre les cultivars, l'activité de l'APX a été plus importante dans Sersou et Wercenis, ce qui donne à penser que ces variétés détoxifient mieux que Carioca le peroxyde d'hydrogène.

Dans le cas du gaïacol peroxydase, on remarque une situation inverse à celle signalée dans le cas de la dynamique de l'enzyme catalase, car pour les mêmes concentrations, l'activité augmente au fur et à mesure que la dose augmente et cette augmentation vient corroborer notre hypothèse d'une atteinte oxydatif provoquée par les deux matières actives de Cossack sur les trois variétés (figure 4).

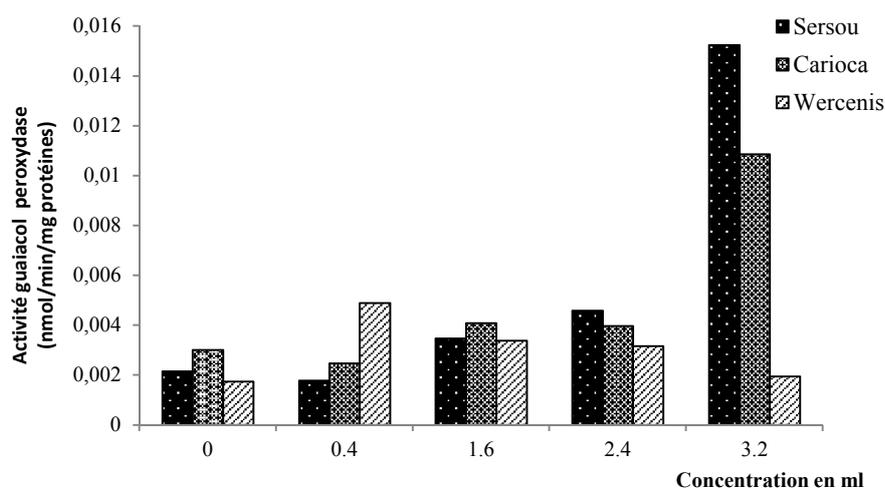


Figure 4. Effet des différentes concentrations de l'herbicide Cossack sur l'activité gaïacol peroxydase des plantules de blé chez les trois variétés étudiées (T=0ml, D₁=0,4ml, D₂=1,6ml, D₃=2,4 ml et D₄=3,2 ml. Les valeurs moyennes ont été déterminées sur trois mesures individuelles.

Chez Sersou, la plus grande activité de la catalase a été clairement mise en rapport avec la plus faible teneur en gaïacol peroxydase. L'activité du gaïacol peroxydase dans les plantules de blé traitées avec des concentrations différentes de Cossack augmente en même temps que la concentration de l'herbicide augmente chez les génotypes étudiés à l'exception sous la deuxième dose ou elle devient inférieure à celle de témoin chez Sersou et Carioca et sous la dose maximale chez Wercenis.

L'effet activateur exercé par Cossack sur cette enzyme est plus marqué après avoir traité Sersou et Carioca par une dose maximale de l'herbicide avec respectivement 7 fois et 5 fois par rapport aux témoins non traités. Il s'accroît sous l'effet de la faible dose (0,4ml) chez Wercenis avec approximativement 3 fois par rapport au témoin.

La mesure de l'activité gaïacol peroxydase, indique une stimulation de cette enzyme chez les trois variétés en fonction de la dose sauf pour Carioca, où elle devient de plus en plus faible surtout sous la dose maximale. Une diminution de l'activité GPX provoque une augmentation de la concentration de H_2O_2 jusqu'au niveau de toxicité, causant un stress oxydatif chez les végétaux [17].

L'herbicide a augmenté la concentration du gaïacol peroxydase dans les cellules foliaires des plantules de blé et une augmentation de sa concentration indique que l'induction du stress oxydant a réussi. Le fait que les doses de GPX soient plus fortes dans Sersou et Carioca que dans Ouarsenis montre également que cette dernière variété est plus tolérante aux lésions oxydantes.

L'activité de la GST mesurée dans les plantules de Sersou et Carioca a été sensiblement plus forte que dans celles de Wercenis (Figure 5). Bien que le degré d'activation de la GST soit plus élevé dans les plantules de Sersou et Carioca traitées avec de Cossack à 1,6 ml il n'a pas sensiblement varié avec ce traitement chez Wercenis. Sous traitement avec les quatre doses testées de l'herbicide, l'activité GST continue à diminuer chez Wercenis, le degré d'inhibition étant important en comparaison avec le témoin, l'activité décroît rapidement à la deuxième et à la quatrième concentration où les teneurs de l'enzyme sont relativement proches.

Les teneurs élevées de glutathion-S-transférase sont d'autant plus importantes chez la variété Carioca et par rapport au témoin sous l'effet de la dose 1,6ml, faibles chez la variété Ouarsenis. Chez Carioca, cette activité est significativement plus élevée par rapport au témoin à la deuxième dose (3 fois de celle de témoin). A la troisième concentration de Cossack, l'activité diminue brusquement jusqu'à 25 % par rapport à la teneur maximale affichée (figure 5).

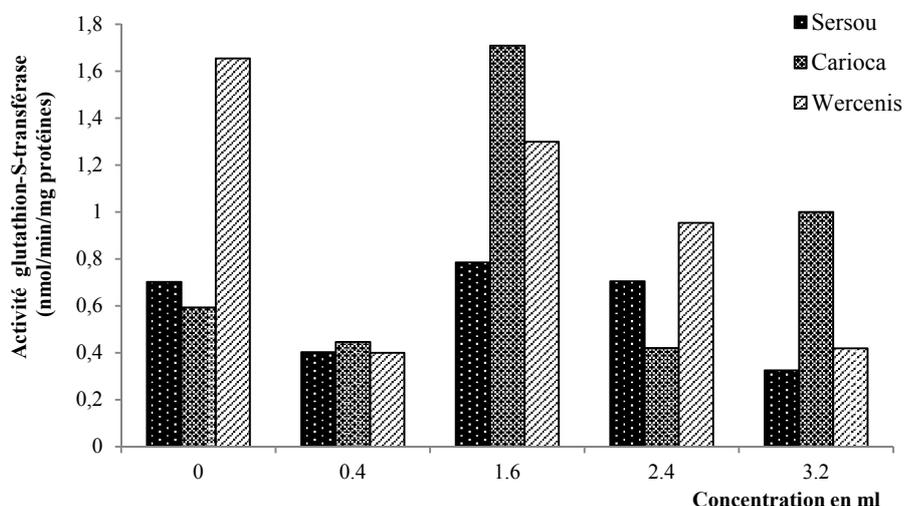


Figure 5. Effet des différentes concentrations de l'herbicide Cossack sur l'activité glutathion-S-transférase des plantules de blé chez les trois variétés étudiées (T=0ml, D₁=0,4ml, D₂=1,6ml, D₃=2,4 ml et D₄=3,2 ml. Les valeurs moyennes ont été déterminées sur trois mesures individuelles.

Sous traitement par l'herbicide Cossack, des réponses différentes ont été déterminées chez les trois variétés étudiées pour les variables antioxydantes analysées. La réponse de la cellule végétale au stress oxydant est modulée en fonction de la concentration en ROS, une forte dose de ROS induit la mort cellulaire, une faible dose permet la mise en place d'enzymes antioxydantes et l'arrêt du cycle cellulaire [18]. Sous l'effet du stress oxydant, la réponse de Sersou est plutôt basée sur le

glutathion et les enzymes ascorbate peroxydase et gaïacol peroxydase, ce qui permis de la considérer comme moyennement tolérante au xénobiotique retrouvé dans le milieu de semis de la céréale.

4 CONCLUSION

Cette étude comparative qui avait pour but de mettre en évidence l'influence du stress oxydatif causé par un herbicide systémique Cossack sur quelques activités antioxydantes de trois variétés de blé dur (Sersou, Carioca et Wercenis) soumise à cinq traitements, a montré que la réponse à ce xénobiotique diffère d'une variété à l'autre et dépend de la dose herbicide appliquée.

Elle nous a permis d'aboutir un ensemble de résultats qui, met en exergue l'action cytotique de différentes concentrations herbicide sur le blé. Les altérations causées par les deux matières actives sulfurées, se sont présentées sous forme de perturbations affectant le métabolisme biochimique des génotypes étudiés.

Une variabilité génotypique très importante a été notée, issue de la réponse de chaque variété vis-à-vis du stress présent dont, Carioca qui tolère le stress oxydatif causé par l'herbicide par une intense activité de glutathion et de gaïacol peroxydase en, minimisant celle de l'ascorbate peroxydase et de catalase qui sont les plus faibles.

La réponse de Sersou dans les conditions de l'essai, est essentiellement basée sur le glutathion et les deux enzymes antioxydants : ascorbate peroxydase et gaïacol peroxydase, donnants ainsi une tolérance moyenne à cette variété en présence du Cossack. Wercenis présente des valeurs élevées pour les trois enzymes ascorbate peroxydase, gaïacol peroxydase et catalase, permettant ainsi de la considérer comme très sensible au xénobiotique présent.

REFERENCES

- [1] D.K. Rai and B. Sharma B, "Carbofuran-induced oxidative stress in mammalian brain" *Molecular Biotechnology*, 37: 66-71, 2007.
- [2] D. Durak, S. Kalender, F. Demir, Y. Kalender Y, "Mercury chloride induced oxidative stress and Distributed in Several Subcellular Compartments and Regulated during Biotic and Abiotic stress", *Pesticides Biochemistry and Physiology* 3: 473, 2010.
- [3] G. Noctor and C.H. Foyer, "Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control" *Plant Physiology and Plant Molecular Biol* 49:249-279, 1998.
- [4] G. Weckberker and G Cory, "Ribonucléotide reductase activity and growth of glutathione depleted mouse leukemia 1210 cells in vitro.", *Cancer letters*, vol 40: 257-264, 1988.
- [5] B. Loggini,, A. Scartazza, F. E. Brugnoli E, F. Navari-Izzo, "Antioxidative defense system, pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought", *Plant Physiology* 119:1091-1099, 1999.
- [6] N. Cakmak and W.J. Horst, "Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidases activities in root tips of soybean", *Physiology plant* 83: 463- 468, 1991.
- [7] Y. Nakano Y and K. Asada, 1981, "Hydrogen Peroxide is scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell and Physiology* 22(5): 867-880, 1981.
- [8] A. Hiner, J. Ruiz, J.N. Lopez, M.B. Arnao, E.I. Raven, F.G. Canovas, M. Acosta M, "Kinetic study of the inactivation of Ascorbate-peroxidase by hydrogen peroxide. *Biochemistry Journal* 348:321-328, 2002.
- [9] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, "Glutathione-S-transferase", *Journal of Biological Chemistry*, 249:7130-7139, 1974.
- [10] F. Khosravinejad, J. Heidari, T. Farboodnia, "Antioxidant responses of two barley varieties to saline stress. *Pakistan Journal of Biological* 11: 905-909, 2008.
- [11] M. Berova, Z. Zlatev and N. Steova, "Effects of Paclobutrazol on wheat seedlings under low temperature stress. *Bulgaria Journal. Plant Physiol* 28: 75-84, 2002.
- [12] P. Böger P and K. Wakabayashi, "Peroxidizing Herbicides. *Springer Verlag Berlin* 189, 1999.
- [13] R. Scalla, « *Les Herbicides : mode d'action et principes d'utilisation* », Paris, Ed. Institut national de la recherche agronomique, 1991.
- [14] D. Inze, M. Van Montagu, « Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6:153-158, 1995.
- [15] Y. Nakano and K. Asada, "Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination", *Plant and Cell Physiology* 21:1295-1307, 1980.
- [16] S. Shigeoka, T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, and K. Yoshimura, "Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes". *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1305-1319, 2002.
- [17] L. Sandalio, M, Dalurzo, H. Gómez, C.M. Romero-Puertas, M.C and Del Rio, "Pleiotropically affects agronomic performance in field-grown barley progeny", *Plant science* 160: 847-855, 2001.
- [18] E. Vranova, D. Inze. and F. Van Breusegem, "Signal transduction during oxidative stress", *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1227-1236, 2002.