



MICROFICHE N°

07885

République Tunisienne

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE

CENTRE NATIONAL DE

DOCUMENTATION AGRICOLE

TUNIS

الجمهورية التونسية
وزارة الزراعة

المركز القومي
للتوثيق الفلاحي
تونس

F

1

Effet du NaCl sur l'utilisation des lipides et les activités enzymatiques glyoxysomales au cours de la germination de deux espèces de *Medicago*

DOUJA BEN MILED-DAQUD ET ABDELKADER CHERIF

Institut national de recherche scientifique et technique — École supérieure des industries alimentaires,
B. P. 95, 2050 Hammam-Lif, Tunisie

Reçu le 4 février 1991

BEN MILED-DAQUD, D., et CHERIF, A. 1992. Effet du NaCl sur l'utilisation des lipides et les activités enzymatiques glyoxysomales au cours de la germination de deux espèces de *Medicago*. Can. J. Bot. 70: 876-883.

L'effet de concentrations croissantes de NaCl sur la germination des graines a été suivi, en obscurité et à 20°C, pendant les 10 premiers jours du développement de deux espèces de *Medicago* (*M. orbicularis* et *M. sativa*). L'effet du NaCl sur l'utilisation des lipides de réserve et sur les activités des enzymes marqueurs des glyoxysomes dans les cotylédons a également été étudié. Les masses des lipides totaux, des acides gras totaux et des triacylglycérols diminuaient considérablement dans les cotylédons témoins avec la croissance des plantules. La disparition des lipides de réserve coïncidait avec l'apparition des activités enzymatiques glyoxysomales. L'effet du NaCl sur l'utilisation des réserves lipidiques et sur les activités enzymatiques glyoxysomales est comparé chez les deux espèces.

Mots clés : *Medicago*, germination, NaCl, lipides, enzymes glyoxysomales

BEN MILED-DAQUD, D., and CHERIF, A. 1992. Effect of NaCl on the utilization of lipids and the activities of glyoxysomal marker enzymes in cotyledons of two species of *Medicago*. Can. J. Bot. 70: 876-883.

The effect of increased NaCl concentrations on seed germination of two *Medicago* species (*M. orbicularis* and *M. sativa*) was studied during the first 10 days of development. The effect of NaCl on utilization of storage lipids and on glyoxysomal marker enzymes in cotyledons was also examined. Total lipids, total fatty acids, and triacylglycerols decreased significantly with seedling growth in control cotyledons. Storage lipids disappeared as glyoxysomal enzyme activity appeared. The effect of NaCl on utilization of storage lipids and on glyoxysomal enzyme activity is compared for the two species.

Key words: *Medicago*, germination, NaCl, lipids, glyoxysomal enzymes.

Introduction

L'utilisation des lipides de réserve au cours de la germination des graines oléagineuses a fait l'objet de nombreux travaux, dont ceux de Bradbur et Stumpf (1959), Becker et al. (1978), Miernyk et Trelease (1981), Kaur et Marfat (1983) et Co et Stumpf (1983). À la germination, les cellules des cotylédons présentent des corpuscules appelés glyoxysomes qui convertissent les lipides de réserve en glucides grâce aux enzymes de la β -oxydation dégradant les acides gras et aux enzymes du cycle glyoxylique transformant les restes d'acétyl-coenzyme A en acide succinique (Beavers et Breidenbach 1974). La catalase, la malate synthétase et l'isocitrate lyase sont les enzymes marqueurs des glyoxysomes (Tchang et al. 1980).

Il subsiste cependant des lacunes au niveau de nos connaissances quant à l'utilisation des lipides dans le cas des graines non oléagineuses. Étant donné, d'une part, l'importance des plantes fourragères et, d'autre part, la qualité des eaux d'irrigation (salées et non salées chargées en sel), en Tunisie, nous avons cru devoir étudier l'effet du NaCl sur la germination des graines de deux espèces de *Medicago* (*M. orbicularis* et *M. sativa*) qui présentent avec un comportement différent vis-à-vis de la salinité et les modifications induites au niveau des lipides et de certaines activités glyoxysomales liées au métabolisme des lipides. Il est à rappeler que la teneur en lipides de ces graines est de 3 à 7% du poids de la matière fraîche.

Matériel et méthodes

Les graines utilisées appartiennent à deux espèces annuelles, *Medicago sativa* Willd et *Medicago orbicularis* Bert, qui sont très répandues au nord de la Tunisie. Ces graines ont été lavées par la banque de graines de Tunisie et proviennent d'une même station de collecte.

Les graines, scarifiées manuellement, ont été mises à germer dans des boîtes de pétri, sur deux couches de papier filtre imbibé d'eau distillée additionnée ou non de NaCl à raison de 2, 4, 6 et 8 g/L, dans un incubateur à l'obscurité et à 20°C. Le jour 1 est le premier jour d'initiation des graines sèches.

Les plantules obtenues ont été sélectionnées pour avoir, à une même date choisie, une certaine uniformité de la taille des cotylédons et de la racine. Les longueurs moyennes de l'hypocotyle et de la racine ont permis la détermination des différents stades de développement des plantules. Pour chaque extraction analytique, 10 paires de cotylédons ont été utilisées. Chaque point des différents courbes représente le moyen de trois expériences indépendantes. Les intervalles de confiance ont été calculés en soul de probabilité de 0,05.

Extraction et analyse des lipides

Les lipides des cotylédons ont été extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Les différents catégories lipidiques ont été séparées par chromatographie sur couche mince de gel de silice (Mangold 1961, 1964). Les acides gras ont été analysés selon la méthode de Bligh et al. (1966) et analysés par chromatographie en phase gazeuse (Pawlak 1969).

Préparation de l'extraire cellulaire et mesure des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques ont été mesurées par l'homogénéisation brute des tissus cotylédonaux. Nous avons adopté à notre matériel végétal la technique de Kageura et al. (1972) modifiée par Tchang et al. (1980). Les cotylédons ont été lavés avec un homogénéisateur (ultra-Turrax) dans 5 mL de milieu contenant du succharose (200 mM), du KCl (10 mM), du MgCl₂ (1 mM), de l'EDTA (1 mM) en solution dans du tampon Tris-HCl (100 mM) à pH = 7,5. Du Tris-HCl (0,5%, 0,1 mL) a été ajouté au milieu de broyage et l'ensemble a été agité pendant 20 min avec interruption. À la concentration utilisée, le détergent permet la libération des enzymes des structures cellulaires sans diminuer leur activité dans l'extraire. Après centrifugation de l'homogénat à 20 000 × g pendant 30 min (centrifugeuse réfrigérée Sorvall RC-5B), le surnageant contenant les enzymes a été

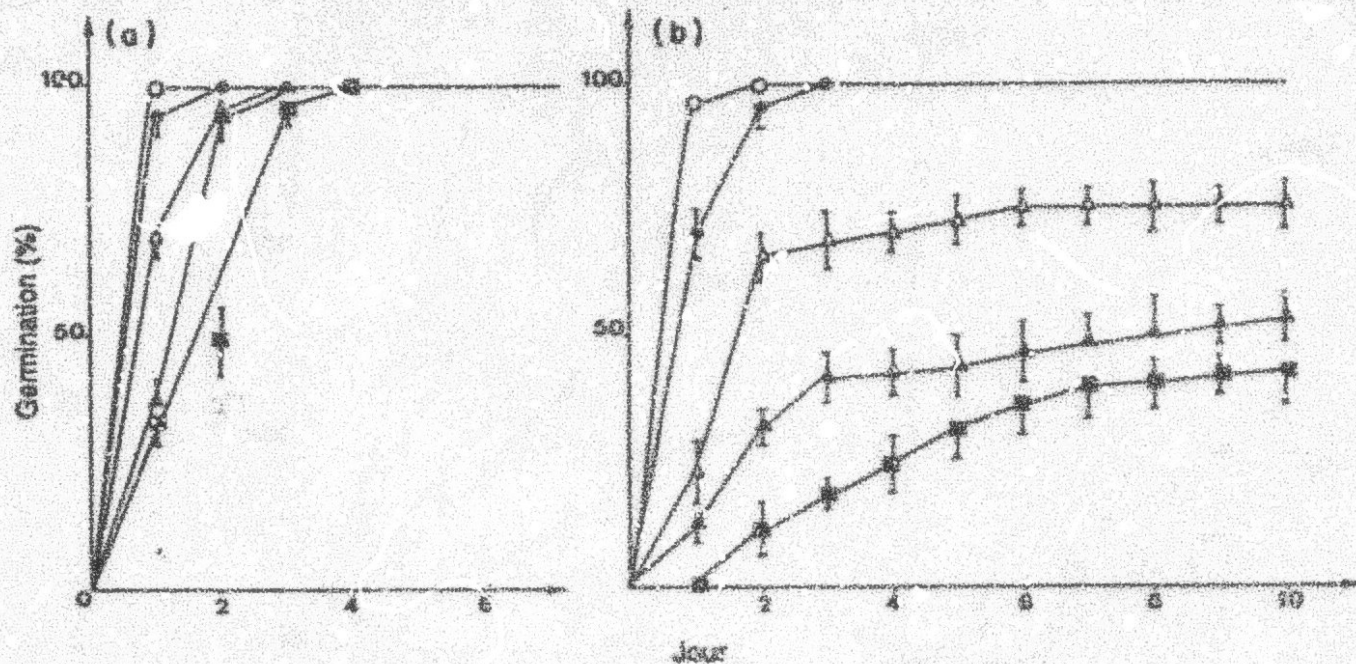


FIG. 1. Effet du NaCl sur la germination des graines du *M. aurea* (a) et de *M. orbicularis* (b). Les lignes verticales représentent les erreurs types obtenues sur trois répétitions avec 10 paires de cotylédons chacune. ○, 0 g/L; ●, 2 g/L; △, 4 g/L; ▲, 6 g/L; *, 8 g/L.

recupéré. Toutes les manipulations précédentes ont été effectuées à 4°C et le pH du milieu a été maintenu à 7,5.

Les activités enzymatiques ont été mesurées sur le surnageant par spectrophotométrie (spectrophotomètre Beckmann, modèle 35).

L'activité de la catalase (EC 1.11.1.6) a été mesurée selon la méthode de Lück (1965) où la vitesse de décomposition de l'eau oxygénée (H_2O_2) sous l'action de la catalase est liée à la diminution de la densité optique, à 240 nm, d'un milieu réactionnel contenant 0,24 ml. de H_2O_2 à 30% dans 50 ml. de tampon phosphate M/15 à pH 7.

La malate synthétase (EC 4.1.3.2), l'un des enzymes clé du cycle glyoxylique, catalyse la condensation de l'acétyl-coenzyme A avec le glyoxylate pour former le malate; son activité a été suivie par l'augmentation, à 412 nm, de la densité optique due à la formation de l'acide 2-nitro-dithiobenzolique à partir de la réaction du coenzyme A réduit libéré avec l'acide 5,5'-dithio-2-nitrobenzoylique (Cooper et Beavers 1969).

Quant à l'isocitrate lyase (EC 4.1.3.1), son activité est mesurée par l'augmentation, à 324 nm, de la densité optique due à la formation du complexe acide glyoxylique - phénylhydrazine à partir d'isocitrate et de phénylhydrazine (Cooper et Beavers 1969).

Résultats

Action du NaCl sur la germination et le développement des plantules de Medicago

Les graines des deux espèces de *Medicago* étudiées ont une germination rapide dans l'eau distillée, le taux de germination étant très voisin de 100% après 24 h d'imbibition (fig. 1). Lorsque nous ajoutons du NaCl dans le milieu, nous observons un ralentissement de la germination des graines du *M. orbicularis*: le taux de germination diminue considérablement à partir de 4 g/L où il est de 63% au 10^e jour d'imbibition, et à 8 g/L, il ne dépasse guère 50% (fig. 1b). Pour le *M. aurea*, le NaCl n'exerce qu'une action retardatrice, puisqu'au bout de 4 jours, on atteint 100% de germination même pour la dose extrême (fig. 1a).

Le développement des plantules, estimé par l'allongement moyen de la racine et de l'hypocotyle, semble être plus affecté par le NaCl. Pour le *M. aurea*, la diminution de l'allongement en présence de concentrations croissantes de

NaCl dans le milieu est progressive (fig. 2a); par contre, elle est brutale pour le *M. orbicularis* (fig. 2b). Au cours des premiers jours de croissance, nous observons une poussée très importante de la racine et de l'hypocotyle chez les plantules témoins, puis les longueurs moyennes se stabilisent au 6^e jour, pour le *M. aurea*, et au 8^e jour, pour le *M. orbicularis*. Ceci peut s'expliquer par le fait que les germinations ont été effectuées dans de l'eau distillée dépourvue d'éléments nutritifs.

Action du NaCl sur l'utilisation des réserves lipidiques dans les cotylédons du Medicago au cours de la germination

Les teneurs en acides gras totaux (AGT) des cotylédons des deux espèces ont été analysés aux différents stades de la croissance des plantules à l'obscurité. La figure 3 nous révèle une diminution progressive de la masse des AGT des cotylédons témoins, qui débute avec l'imbibition des graines. En effet, en 24 h, la masse initiale des AGT de la graine sèche passe de 8,1 à 4,8 mg, chez le *M. aurea*, et de 2,3 à 1,3 mg, chez le *M. orbicularis*, ce qui correspond à une perte d'environ 40%.

Ainsi nous pouvons distinguer deux phases: (i) Une première phase s'étale jusqu'au 5^e jour; l'utilisation des lipides de réserve y est très importante. À ce stade (5^e jour), les cotylédons du *M. aurea* ne contiennent que 2,1 mg d'AGT alors que ceux de *M. orbicularis* n'en contiennent que 0,4 mg, ce qui correspond à une dégradation de 75 à 80% des masses initiales. (ii) Une deuxième phase, du 5^e au 10^e jour de croissance, est caractérisée par une diminution moins accentuée. À la fin de cette phase, les cotylédons témoins ne contiennent plus que 0,6 et 0,2 mg, respectivement pour le *M. aurea* et le *M. orbicularis* ce qui ne représente plus que 7 à 9% des masses initiales des AGT des graines sèches.

Les courbes de dégradation des AGT des cotylédons du *M. aurea* traités au NaCl à raison de 2, 4, et 6 g/L sont comparables à celles du témoin. À 8 g/L, la dégradation des AGT est nettement ralentie jusqu'au 5^e jour puis elle s'accroît, et au 10^e jour, 64% des AGT de la graine sont utilisés par la plantule (fig. 3a).

Pour le *M. orbicularis*, on observe un ralentissement de la

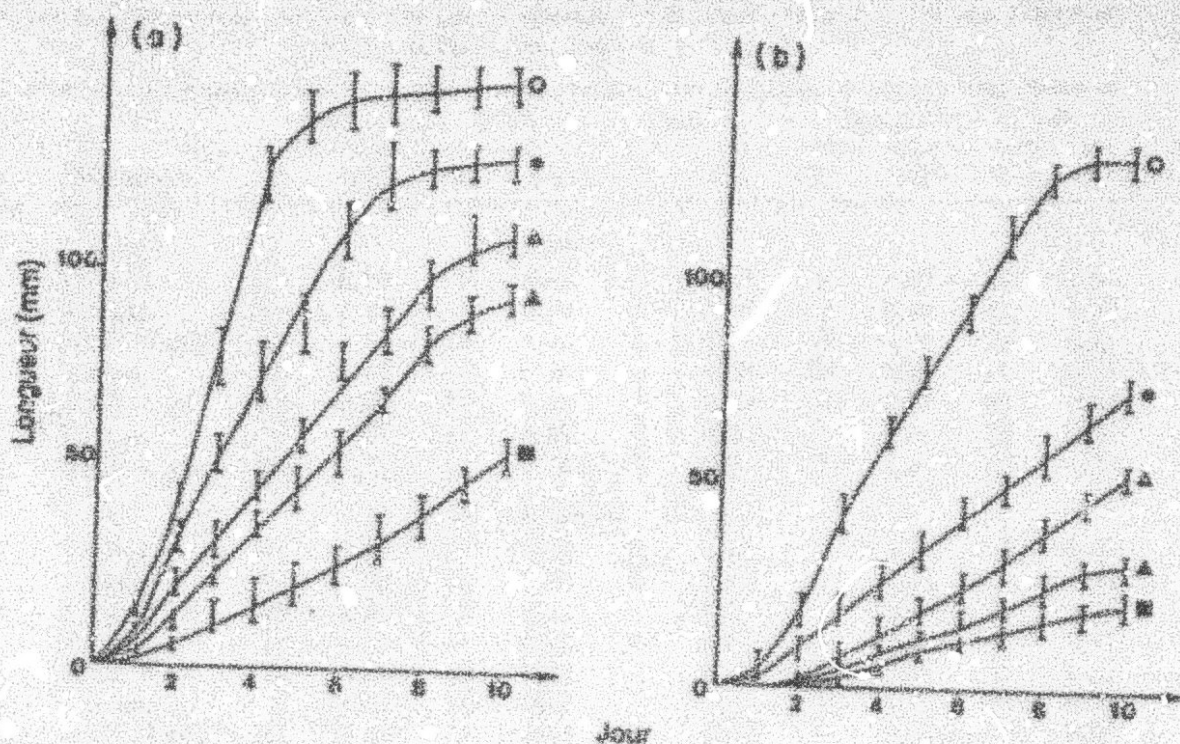


FIG. 2. Effet du NaCl sur l'allongement de l'ensemble racinaire-hypocotyle du *M. sativa* (a) et du *M. orbicularis* (b). Les lignes verticales représentent les erreurs types obtenues sur trois répétitions avec 3 paires de cotylédons chacune. Même légende qu'en figure 1.

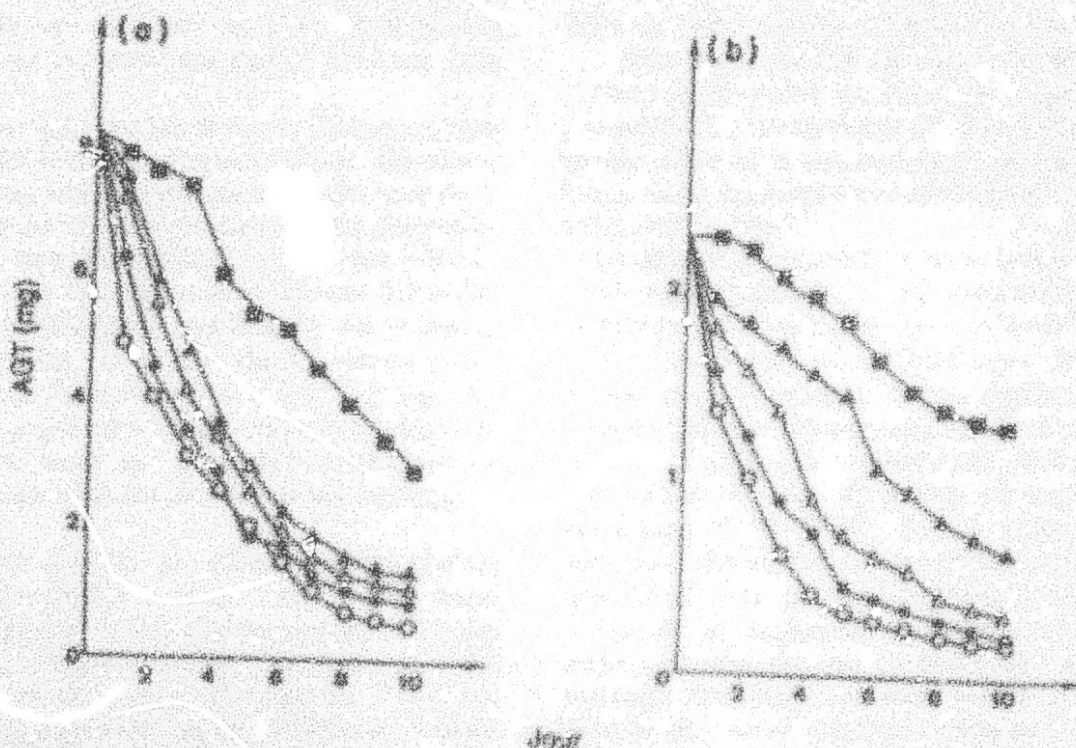


FIG. 3. Effet du NaCl sur les teneurs en sucres gras totaux des cotylédons du *M. sativa* (a) et de *M. orbicularis* (b) au cours de la croissance des plantules. Même légende qu'en figure 1.

dégradation des AGT des cotylédons dès les premières concentrations de NaCl utilisées. Ce phénomène est plus marqué à 6 g/L; en effet, au 5^e jour de la croissance des plantules, seulement 25% des AGT, soit 0,7 mg, sont dégradés alors que chez le témoin la proportion est de 50%. Par la suite, la dégradation s'accroît et, au 10^e jour, on ne trouve plus que 27% de la masse initiale des AGT de la graine sèche. À 2 g/L NaCl, les cotylédons de *M. orbicularis* n'ont dégradé, au 5^e jour, que 20% de la masse initiale des AGT de la graine, soit 0,5 mg, et moins de la moitié au 10^e jour (fig. 3b).

Pour suivre l'évolution des différentes catégories lipidiques,

nous avons retenu trois stades de développement, à savoir le stade 1 correspondant au 1^{er} jour de germination et les stades 2 et 3 correspondant respectivement aux 5^e et 10^e jours.

Les réserves lipidiques des graines de *Medicago* sont essentiellement formées par les triacylglycérols (TAG), lesquels représentent 80 à 85% des lipides totaux de la graine sèche. Cette catégorie est rapidement hydrolysée au cours de la germination et, au bout de 24 h, elle ne représente plus que 52 et 38% des lipides totaux des cotylédons du *M. orbicularis* et du *M. sativa*, respectivement (tableau 1). La masse des TAG dans les cotylédons diminue fortement dès le début de la per-

TABLEAU 1. Composition en lipides des cotylédons chez le *M. murex* et le *M. orbicularis* témoins et traités au NaCl, aux jours 0, 1, 5 et 10

Jour	Traitement	TAG		DAG		MAG		AGL		LP	
		%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg
<i>M. murex</i>											
0	Témoin	80	6,72	5	0,42	2	0,17	3	0,25	10	0,84
1	Témoin	58	2,82	7	0,34	4	0,20	9	0,44	22	1,07
1	NaCl, 8 g/L	62	4,95	5	0,40	2	0,16	3	0,24	28	2,23
5	Témoin	34	0,70	7	0,14	4	0,08	10	0,21	45	0,93
5	NaCl, 8 g/L	53	2,84	11	0,55	2	0,10	4	0,21	30	1,61
10	Témoin	9	0,05	11	0,07	3	0,02	7	0,04	70	0,41
10	NaCl, 8 g/L	38	1,13	12	0,36	1	0,06	7	0,21	41	1,22
<i>M. orbicularis</i>											
0	Témoin	83	1,74	5	0,11	2	0,04	2	0,04	8	0,17
1	Témoin	52	0,70	15	0,20	4	0,05	5	0,07	24	0,32
1	NaCl, 8 g/L	80	1,80	5	0,11	1	0,02	3	0,07	11	0,25
5	Témoin	27	0,11	11	0,04	4	0,02	12	0,03	46	0,18
5	NaCl, 8 g/L	70	1,26	6	0,11	2	0,04	5	0,09	17	0,31
10	Témoin	8	0,02	11	0,52	2	0,03	6	0,03	73	0,14
10	NaCl, 8 g/L	52	0,65	12	0,15	2	0,03	4	0,03	30	0,37

Nota : Les résultats sont exprimés en pourcentages et en milligrammes de lipides par 10 paires de cotylédons. TAG, triacylglycérols; DAG, diacylglycérols; MAG, monoacylglycérols; AGL, acides gras libres; LP, lipides poissés.

mination des graines témoins du *Medicago* pour atteindre, au 10^e jour, 8 à 9% de la masse totale des lipides présents dans les cotylédons.

Pour étudier l'effet du NaCl sur les diverses catégories lipidiques, nous avons choisi la concentration extrême. De même que les acides gras totaux des cotylédons, le NaCl retarde la dégradation des TAG au cours de la croissance des plantules. En effet, au bout du 1^{er} jour d'imbibition, 22,5% des TAG de la graine du *M. murex* sont hydrolysés et seulement 3,7% des TAG de la graine du *M. orbicularis*. Au 3^e jour, les quantités de TAG dégradées dans les cotylédons du *M. murex* et du *M. orbicularis* atteignent respectivement 2,8 et 1,3 mg. Au 10^e jour, les TAG des cotylédons du *M. murex* représentent 38% des lipides totaux alors que dans les cotylédons du *M. orbicularis*, cette proportion est plus importante et égale à 52% (tableau 1).

Les monoacylglycérols (MAG), les diacylglycérols (DAG) et les acides gras libres (AGL) sont des métabolites intermédiaires de la dégradation des TAG (Bewley et Black 1983); la proportion de chaque catégorie lipidique est faible dans les lipides des cotylédons du *Medicago*. Comme les TAG, ces catégories lipidiques sont dégradées au cours de la croissance des plantules puisque leurs masses respectives diminuent au cours de la germination (tableau 1).

Les lipides poissés (LP) sont faiblement représentés dans la graine sèche du *Medicago* (7 à 10% des lipides totaux). Au cours du développement dans le milieu témoin, d'importantes modifications affectent cette catégorie lipidique. Dès que les graines sont mises à germer, le pourcentage des LP augmente rapidement; il atteint 22% après 24 h d'imbibition. Ce taux continue d'augmenter et, au 10^e jour, il représente 70% des lipides étudiés (tableau 1). La masse des LP diminue au cours de la croissance mais cette diminution n'est pas aussi importante que celle des TAG. La synthèse des LP est affectée par 8 g/L de NaCl; en effet, après 10 jours de traitement, le taux des LP représente 41% des lipides totaux des cotylédons du *M. murex* et seulement 30% de ceux du *M. orbicularis*.

Effet du NaCl sur les activités enzymatiques dans les cotylédons du *Medicago* au cours du développement

Nous avons suivi, au cours de la germination, l'évolution des activités enzymatiques liées au métabolisme des lipides, à savoir celles de la catalase, la malate synthétase et l'isocitrate lyase, dans les cotylédons témoins et ceux traités à l'aide de solutions de NaCl.

La catalase est présente dans la graine sèche aussi bien chez le *M. murex* que chez le *M. orbicularis*; elle intervient dans la β -oxydation des acides gras. L'activité de cet enzyme augmente rapidement dès l'imbibition des graines témoins et atteint son maximum au 2^e jour de l'imbibition chez les deux espèces (fig. 4). Néanmoins, elle a une amplitude plus importante chez le *M. orbicularis* (1,95 μ mol de substrat transformé par minute et par 10 paires de cotylédons) que chez le *M. murex* (0,77 μ mol). Par la suite, l'activité catalasique diminue rapidement et, au 10^e jour, la catalase a déjà perdu près de 80% de son activité dans les cotylédons témoins.

Lorsqu'on augmente la concentration de NaCl dans le milieu, on observe une variation de l'activité catalasique très marquée dans les cotylédons du *M. orbicularis*. Par contre, chez le *M. murex*, ce e variation ne devient appréciable que pour la concentration extrême de NaCl utilisée, à part un léger décalage de l'activité maximale qui est atteinte au 3^e jour d'imbibition pour les traitements de 2, 4 et 6 g/L (fig. 4a). La diminution de l'activité, progressive par rapport à celle observée chez le témoin, est retardée pour 4 et 6 g/L; à 8 g/L de NaCl, l'activité maximale catalasique est atteinte le 3^e jour et reste pratiquement constante jusqu'au 7^e jour pour diminuer par la suite.

Pour le *M. orbicularis*, l'activité catalasique maximale affiche un décalage de 1 jour quand on passe d'un traitement à l'autre, en suivant les concentrations croissantes en NaCl du milieu. À 2 g/L, l'activité maximale a une valeur quasi égale à celle du témoin mais elle n'est effective qu'au 3^e jour. À 4 g/L, la valeur maximale est atteinte au 4^e jour et elle est nettement inférieure à celle du témoin. À 6 g/L, c'est au

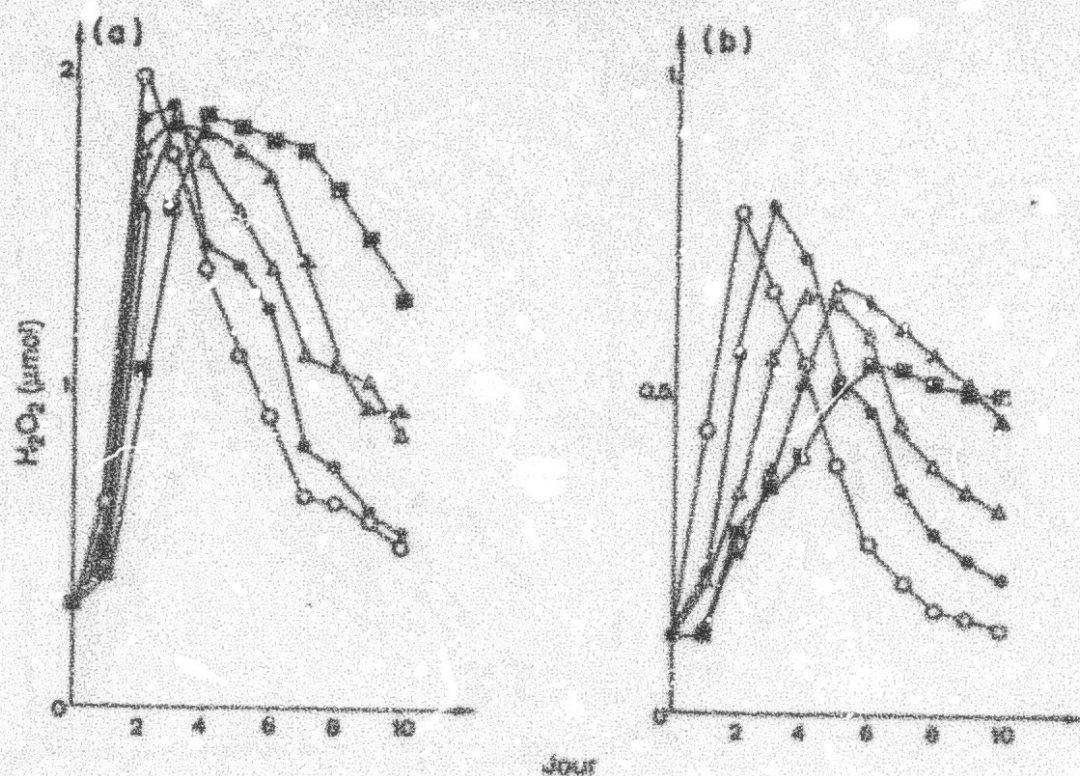


FIG. 4. Action du NaCl sur l'activité de la catalase dans les cotylédons du *M. murex* (a) et du *M. orbicularis* (b) au cours de la croissance des plantules. L'activité est exprimée en micromoles de H_2O_2 transférées par minute et par 10 paires de cotylédons (chaque point représente la moyenne de trois expériences indépendantes; par mesure de clarté, nous n'avons pas représenté les écarts à la moyenne). Même légende qu'en figure 1.

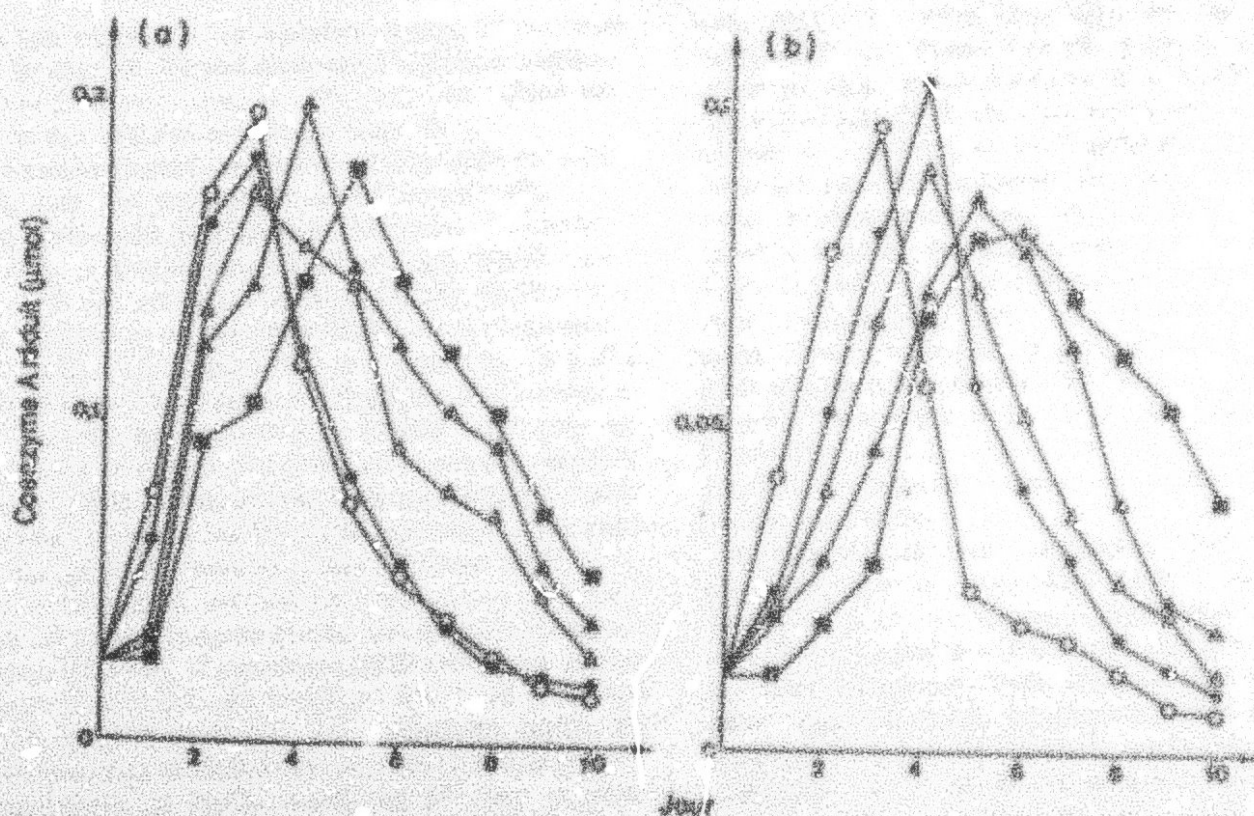


FIG. 5. Action du NaCl sur l'activité de la malate synthétase dans les cotylédons du *M. murex* (a) et du *M. orbicularis* (b) au cours de la croissance des plantules. L'activité est exprimée en micromoles de coenzyme A réduit formé par minute et par 10 paires de cotylédons. Même légende qu'en figure 1.

5^e jour qu'on observe le maximum de l'activité, puis celle-ci diminue jusqu'à ne représenter que 50% de l'activité maximale du témoin. Enfin, à 3 g/L, l'activité catalytique augmente progressivement jusqu'au 8^e jour et reste pratiquement constante jusqu'à la fin de l'expérience (fig. 3b).

En ce qui concerne la malate synthétase (MS), on observe une faible activité enzymatique dans la graine sèche du *M. orbicularis* (1,2 μmol de coenzyme A réduit par minute pour 10 paires de cotylédons) et du *M. murex* (2,5 μmol) par rapport à celle de la catalase. Dans les cotylédons témoins,

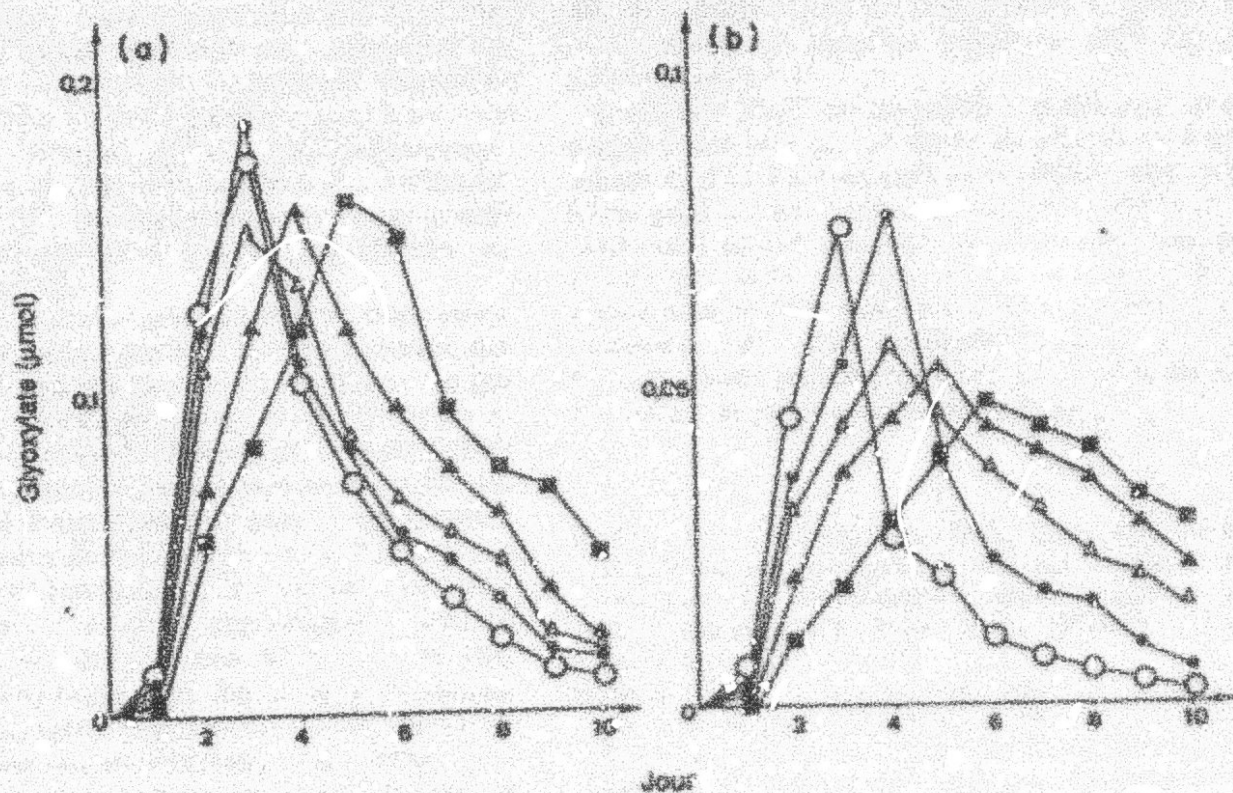


FIG. 6. Action du NaCl sur l'activité de l'isocitrate lyase dans les cotylédons du *M. murex* (a), et du *M. orbicularis* (b) au cours de la croissance des plantules. L'activité est exprimée en micromoles de glyoxylate formé par minute et par 10 paires de cotylédons. Même légende qu'en figure 1.

l'activité de la MS augmente très rapidement pour atteindre un maximum au 3^e jour de l'imbibition chez les deux espèces, puis elle décline pour atteindre, au 10^e jour, une valeur voisine de 10% de son activité maximale (fig. 5).

Le NaCl n'a pratiquement pas d'effet sur l'activité de la MS jusqu'à 4 g/L dans les cotylédons du *M. murex* (fig. 5a). Cependant, et pour cette dernière concentration, on observe un léger retard de la diminution de l'activité une fois le maximum atteint. À 6 g/L de NaCl, l'augmentation de l'activité enzymatique est légèrement retardée au début de la croissance : la valeur maximale n'est atteinte que le 4^e jour (fig. 5a). Ce retard est accentué par le traitement à 8 g/L de NaCl puisque l'expression de l'activité maximale se réalise le 5^e jour de l'imbibition. La diminution de l'activité est nettement retardée car, au 10^e jour, l'activité représente 27% de l'activité maximale. Par contre, la valeur de l'activité maximale reste pratiquement inchangée pour tous les traitements au NaCl.

En ce qui concerne le *M. orbicularis*, l'activité de la MS est modifiée pour toutes les concentrations utilisées comparativement au témoin. En effet, le maximum de l'activité est atteint le 4^e jour pour 2 et 4 g/L de NaCl, et les 5^e et 6^e jours, respectivement, pour 6 et 8 g/L. La diminution rapide de l'activité observée chez le témoin est nettement amoindrie chez les cotylédons traités au NaCl. Ainsi, au 10^e jour et pour 8 g/L de NaCl, l'activité représente environ 40% de l'activité maximale du témoin.

La graine sèche ne présente pas d'activité d'isocitrate lyase (ICL), ce qui laisse supposer que celle-ci est nouvellement synthétisée dans les cotylédons du *Medicago* en germination (fig. 6a). L'activité de l'ICL augmente rapidement dans les cotylédons témoins pour atteindre un maximum vers le 3^e jour (fig. 6), et ceci chez les deux espèces étudiées. Puis, elle chute brusquement jusqu'au 6^e jour. Par la suite, la diminution est progressive dans le cas des cotylédons témoins de *M. murex* (fig. 6a) alors que l'activité est pratiquement cons-

tante chez le *M. orbicularis* (fig. 6b). Au 10^e jour, l'activité enzymatique représente 3 et 6%, respectivement, de l'activité maximale dans les cotylédons du *M. orbicularis* et du *M. murex*.

L'activité de l'ICL dans les cotylédons du *M. murex* traités à l'aide de 2 et 4 g/L de NaCl présente pratiquement la même évolution que chez le témoin (fig. 6a). Toutefois, nous observons un décalage de l'activité maximale, laquelle se produit les 4^e et 5^e jours, respectivement, pour les traitements de 6 et 8 g/L de NaCl, la valeur maximale reste cependant sensiblement la même pour toutes les concentrations utilisées. Par la suite, l'activité diminue progressivement au cours du temps pour atteindre, au 10^e jour, une valeur pratiquement identique pour les traitements de 0 à 6 g/L de NaCl. La diminution de l'activité de l'ICL à 8 g/L est retardée, en effet au 10^e jour, l'activité représente environ une valeur double de celle des autres traitements.

L'effet du NaCl sur l'activité de l'ICL est nettement plus important dans les cotylédons du *M. orbicularis* que chez le *M. murex* puisqu'on assiste à un décalage du maximum d'activité dès la première concentration de NaCl utilisée (fig. 6b). La valeur maximale reste pratiquement inchangée à 2 g/L, mais à partir de 4 g/L, on observe, d'une part, une nette diminution de la valeur de l'activité maximale et, d'autre part, une diminution de l'activité progressive, différente de celle du témoin. Ainsi l'activité de l'ICL dans les cotylédons du *M. orbicularis* traités à 8 g/L de NaCl représente, au 10^e jour, environ 40% de l'activité maximale des cotylédons témoins.

Conclusion

La germination des graines du *M. orbicularis* et du *M. murex* n'est pas affectée par les doses de NaCl allant jusqu'à 2 g/L, concentration moyenne généralement observée dans les eaux tunisiennes d'irrigation. À partir de 4 g/L de NaCl, l'émergence de la radicule du *M. orbicularis* est re-

tardée, alors que le même phénomène est observé pour la dose extrême de 8 g/L chez le *M. murex*. Le retard serait dû principalement à un ralentissement de l'absorption d'eau par les graines occasionné par la diminution du potentiel osmotique externe (Bliss et al. 1986). Le NaCl provoque une diminution de la croissance des plantules estimée par l'allongement moyen de la radicule et de l'hypocotyle. Cette diminution est plus importante chez le *M. orbicularis*. Du point de vue germination et croissance, le *M. murex* semble plus résistant au NaCl que le *M. orbicularis*.

En ce qui concerne le métabolisme des lipides, nous avons constaté une utilisation importante des lipides de réserve qui commence dès l'imbibition des graines du *Medicago*, ce qui est en accord avec les travaux de Becker et al. (1978) sur le concombre ainsi qu'avec ceux de Miernyk et Trelease (1961) sur le coton. La dégradation intéresse surtout les TAG qui forment la majeure partie des lipides de réserve des graines. Les acides gras libérés lors de l'hydrolyse des TAG ne sont pas stockés mais rapidement métabolisés; il vont être soit transformés par l'intermédiaire du cycle glyoxylique en glucose nécessaire à la croissance des plantules (Cooper et Bevers 1969) sont réutilisés pour la synthèse des LP et, plus particulièrement, des phospholipides nécessaires à l'édification de nouvelles structures membranaires (Tchang et al. 1981). Cette catégorie moléculaire voit son taux passer de 8-10% dans la graine sèche à 70-73% dans les cotylédons au 10^e jour d'imbibition. Plusieurs travaux ont montré que les LP formés au cours de la germination des graines proviennent de la dégradation des TAG (Varti et Laidman 1976; Liorneau et al. 1984; Wilkinson et al. 1984).

Dans les cotylédons traités au NaCl, la dégradation des lipides de réserve, qui se produit normalement lors de la germination, comme nous l'avons déjà observé, se trouve retardée. En effet, au 10^e jour de l'imbibition, et à 8 g/L de NaCl, les TAG représentent 38% des lipides totaux des cotylédons du *M. murex* et 52% de ceux du *M. orbicularis*.

Quant aux LP, leurs proportions par rapport aux lipides totaux dans les cotylédons au 10^e jour passent de 70 et 73%, respectivement, chez le *M. murex* et le *M. orbicularis* témoins à 41 et 30% lorsqu'il y a traitement au NaCl à raison de 8 g/L, ce qui montre bien que la synthèse de cette catégorie lipidique est affectée par le NaCl. Ce résultat est en accord avec ceux signalés par Moore (1982) et Harzallah-Skhiri (1987) qui ont montré que la biosynthèse des phospholipides est affectée par le stress salin. Cependant, si on examine la masse des LP, on observe qu'elle est plus élevée dans les cotylédons traités que dans les cotylédons témoins; ceci pourrait résulter soit d'une accélération des dégradations de toutes les catégories lipidiques chez le témoin, soit d'une mauvaise utilisation des acides gras provenant de l'hydrolyse, lesquels continueraient à être utilisés dans la fabrication des LP, soit d'une réaction de la plantule au NaCl par synthèse de nouvelles membranes contribuant à une nouvelle compartimentation cellulaire.

L'hydrolyse des lipides de réserve est concomitante de l'augmentation des activités enzymatiques du cycle glyoxylique, à savoir celle de la MS et de l'ICL (Bevers 1975). Ces activités enzymatiques augmentent considérablement au cours du temps pour atteindre leur amplitude maximale le 3^e jour de l'imbibition des graines témoins, alors que l'activité maximale de la catalase (enzyme intermédiaire de la β -oxydation) est atteinte le 2^e jour. Ce décalage dans le temps de l'expression des différentes activités enzymatiques glyoxycoliques peut être interprété comme une biogénèse progressive des organites en

relation avec leur fonctionnement dans la cellule. Ces trois activités enzymatiques diminuent ensuite, ce qui serait dû à l'épuisement des réserves lipidiques dans les cotylédons (Davis et al. 1981).

L'effet du NaCl sur les activités enzymatiques étudiées se traduit d'une part par un retard de l'expression de l'activité maximale chez les deux espèces et, d'autre part, par une inhibition partielle des enzymes chez le *M. orbicularis*, puisque la valeur de l'activité maximale se trouve diminuée, par rapport à celle du témoin, de 30% pour la catalase, 40% pour l'isocitrate lyase et 20% pour la malate synthétase. Comme pour l'utilisation des réserves lipidiques et la germination, le *M. orbicularis* semble plus sensible à l'effet du NaCl que le *M. murex* du point de vue enzymatique.

- Becker, W. M., Leaver, C. J., Weir, E. M., et Krizman, H. 1976. Regulation and glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. I. Developmental changes in cotyledonary protein, RNA and enzyme activities during germination. *Plant Physiol.* (Bethesda), 62 : 547-549.
- Bevers, H. 1975. Organelles from castor bean seedlings, biochemical roles in gluconeogenesis and phospholipid synthesis. Dans *Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids*. Éditeurs : T. Galliard et R. J. Morcier. Academic Press, London, pp. 287-299.
- Bevers, H., et Breidenbach, R. W. 1974. Glyoxysomes. Dans *Methods in enzymology*. Vol. XXXI. Éditeurs : S. Fleischer et L. Packer. Academic Press, New York, London, pp. 563-571.
- Birchey, J. D., et Black, M. 1983. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. I. Development, germination and growth. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Bligh, E. G., et Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* 37 : 911-917.
- Bliss, R. D., Peto-Aloia, K. A., et Thomson, W. W. 1986. Osmotic sensitivity in relation to sensitivity in germination barley seeds. *Plant, Cell Environ.* 9 : 721-725.
- Bradbeer, C., et Szimpl, P. K. 1959. Fat metabolism in higher plants. XI. The conversion of lin into carbohydrate in peanut and sunflower seedlings. *J. Biol. Chem.* 234 : 498-501.
- Cooper, T. G., et Bevers, H. 1969. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.* 244 : 3507-3514.
- Davis, H. V., Gaba, V., Black, M., et Chapman, J. M. 1981. The control of food mobilization in seed of *Cucumis sativus* L. V. The effect of light on lipid degradation. *Planta (Berlin)*, 132 : 70-73.
- Harzallah-Skhiri, F. 1987. Recherches sur les modalités d'adaptation des plantes aux sols salés. Modifications biochimiques et ultra-structurales des chloroplastes de divers cultivars de *Lactuca* développés en milieu additionné de sel. Thèse de spécialité. Université Pierre et Marie Curie, Paris.
- Kagawa, T., McGregor, D., et Bevers, H. 1973. Development of enzymes in cotyledons of watermelon seedlings. *Plant Physiol.* (Bethesda), 51 : 66-71.
- Kosri, G., et Mazliak, P. 1983. Formation et mobilisation des réserves lipidiques des akènes de carthame (*Certhamus hectorius* L.) au cours du développement de la plante. *Rev. Fr. corps gras*, 30 : 293-297.
- Lack, H. 1965. Catalase. Dans *Methods in enzymatic analysis*. Bergmeyer Éditeurs - Academic Press, New York, London, pp. 886-888.
- Mangold, H. K. 1961. Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 38 : 707-727.
- Mangold, H. K. 1964. Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41 : 762-777.
- Mazliak, P. 1969. Le métabolisme des lipides chez les plantes supérieures. Masson, Paris.

relation avec leur fonctionnement dans la cellule. Ces trois activités enzymatiques diminuent ensuite, ce qui serait dû à l'épuisement des réserves lipidiques dans les cotylédons (Davis *et al.* 1981).

L'effet du NaCl sur les activités enzymatiques étudiées se traduit d'une part par un retard de l'expression de l'activité maximale chez les deux espèces et, d'autre part, par une inhibition partielle des enzymes chez le *M. orbicularis*, puisque la valeur de l'activité maximale se trouve diminuée, par rapport à celle du témoin, de 30% pour la catalase, 40% pour l'isocitrate lyase et 20% pour la malate synthétase. Comme pour l'utilisation des réserves lipidiques et la germination, le *M. orbicularis* semble plus sensible à l'effet du NaCl que le *M. murex* du point de vue enzymatique.

Becker, W. M., Leaver, C. J., Weir, E. M., et Reizman, H. 1978. Regulation and glyoxysomal enzymes during germination of cucumber. I. Developmental changes in cotyledonary protein, RNA and enzyme activities during germination. *Plant Physiol.* (Bethesda), 62 : 542-549.

Beevers, H. 1975. Organelles from castor bean seedlings, biochemical roles in gluconeogenesis and phospholipid synthesis. Dans *Recent advances in the chemistry and biochemistry of plant lipids*. Éditeurs : T. Gaillard et R. J. Morlier. Academic Press, London. pp. 287-299.

Beevers, H., et Breidenbach, R. W. 1974. Glyoxysomes. Dans *Methods in enzymology*. Vol. XXXI. Éditeurs : S. Fleischer et L. Parker. Academic Press, New York, London. pp. 565-571.

Bevilley, J. D., et Black, M. 1983. Physiology and biochemistry of seeds in relation to germination. Vol. I. Development, germination and growth. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Bligh, E. G., et Dyer, W. J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem.* 37 : 911-917.

Bliss, R. D., Platt-Aloia, K. A., et Thomson, W. W. 1986. Osmotic sensitivity in relation to sensitivity in germination barley seeds. *Plant, Cell Environ.* 9 : 721-725.

Bradber, C., et Stumpf, P. K. 1959. Fat metabolism in higher plants. XI. The conversion of fat into carbohydrate in peanut and sunflower seedlings. *J. Biol. Chem.* 234 : 498-501.

Cooper, T. G., et Beevers, H. 1969. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean. Enzyme constituents and catalytic capacity. *J. Biol. Chem.* 244 : 3507-3514.

Davies, H. V., Gaba, V., Black, M., et Chapman, J. M. 1981. The control of food mobilization in seed of *Cucumis sativus* L. V. The effect of light on lipid degradation. *Planta* (Berlin), 152 : 70-73.

Harzallah-Skhiri, F. 1982. Recherches sur les modalités d'adaptation des plantes aux sols salés. Modifications biochimiques et ultra-structurales des chloroplastes de divers cultivars de *Luzerne* développés en milieu additionné de sel. Thèse de spécialité. Université Pierre et Marie Curie, Paris.

Kagawa, T., McGregor, D., et Beevers, H. 1973. Development of enzymes in cotyledons of watermelon seedlings. *Plant Physiol.* (Bethesda), 51 : 66-71.

Keari, G., et Mazliak, P. 1983. Formation et mobilisation des réserves lipidiques des akènes de carthame (*Carthamus tinctorius* L.) au cours du développement de la plante. *Rev. Fr. corps gras*, 30 : 293-297.

Lück, H. 1965. Catalase. Dans *Methods in enzymatic analysis*. Bergmeyer Éditeurs - Academic Press, New York, London. pp. 886-888.

Mangold, H. K. 1961. Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 38 : 707-727.

Mangold, H. K. 1964. Thin layer chromatography of lipids. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 41 : 763-777.

Mazliak, P. 1969. Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures. Masson, Paris.

Metcalfe, L. D., Schmitz, A. A., et Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38 : 514-515.

Miernyk, J. A., et Trelease, R. N. 1981. Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. *Plant Physiol.* (Bethesda), 67 : 341-346.

Moore, T. S. 1982. Phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* (Bethesda), 33 : 235-259.

Moreaux, P., Juguetin, H., Lemaire, R., et Cassagne, C. 1984. *In vivo* incorporation of acetate into the acyl moieties of polar lipids from etiolated leek seedlings. *Phytochemistry* (Oxford), 23 : 67-71.

Oo, K. C., et Stumpf, P. K. 1983. Some enzymic activities in germinating oil palm (*Elaeis guineensis*) seedling. *Plant Physiol.* (Bethesda), 73 : 1028-1032.

Tchang, F., Robert, D., et Mazliak, P. 1980. Utilisation des réserves lipidiques et formation des glyoxysomes et d'étioplastes dans les cotylédons de Tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Physiol. Vég.* 18 : 117-130.

Tchang, F., Robert, D., et Mazliak, P. 1981. Utilisation des réserves lipidiques, formation des peroxyssomes et chloroplastes dans les cotylédons de semences de Tournesol germinant à la lumière. *Physiol. Vég.* 19 : 9-22.

Varti, K., et Laidman, D. L. 1976. The pattern and control of phospholipid metabolism in wheat aleurone tissue. *J. Exp. Bot.* 27 : 748-758.

Williamson, M. C., Laidman, D. L., et Gaillard, T. 1984. Two sites of phosphatidylcholine synthesis in wheat aleurone cell. *Plant Sci. Lett.* 35 : 195-199.

- Metcalf, L. D., Schmitz, A. A., et Pelka, J. R. 1966. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 38 : 514-515.
- Miernyk, J. A., et Trelease, R. N. 1981. Control of enzyme activities in cotton cotyledons during maturation and germination. *Plant Physiol. (Bethesda)*, 67 : 341-346.
- Moore, T. S. 1982. Phospholipid biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. (Bethesda)*, 33 : 235-259.
- Moreaux, P., Juguelin, H., Lessire, R., et Cassagne, C. 1984. *In vivo* incorporation of acetate into the acyl moieties of polar lipids from etiolated leek seedlings. *Phytochemistry (Oxford)*, 23 : 57-71.
- Oo, K. C., et Stumpf, P. K. 1983. Some enzymic activities in germinating oil palm (*Elaeis guineensis*) seedling. *Plant Physiol. (Bethesda)*, 73 : 1028-1032.
- Tchang, F., Robert, D., et Mazliak, P. 1980. Utilisation des réserves lipidiques et formation des glyoxysomes et d'étioplastes dans les cotylédons de Tournesol (*Helianthus annuus* L.). *Physiol. Vég.* 18 : 117-130.
- Tchang, F., Robert, D., et Mazliak, P. 1981. Utilisation des réserves lipidiques, formation des peroxysomes et chloroplastes dans les cotylédons de semences de Tournesol germeant à la lumière. *Physiol. Vég.* 19 : 9-22.
- Varti, K., et Laidman, D. L. 1976. The pattern and control of phospholipid metabolism in wheat aleurone tissue. *J. Exp. Bot.* 27 : 748-758.
- Wilkinson, M. C., Laidman, D. L., et Gaillard, T. 1984. Two sites of phosphatidylcholine synthesis in wheat aleurone cell. *Plant Sci. Lett.* 35 : 195-199.

FIN

8

VUES