Etude comparée de la tolérance au sel de différents mils : croissance, activités phosphoenolpyruvate carboxylase et enzyme malique à NADP

Saliou BOURAÏMA, Danièle LAVERGNE & Marie-Louise CHAMPIGNY

Université Paris-Sud, Photosynthèse et Métabolisme, Bâtiment 430, F 91405 Orsay Cedex

RÉSUMÉ

L'évaluation de la tolérance à NaCl a porté sur la production de matière fraîche, la teneur en protéines solubles, les activités phosphoenolpyruvate carboxylase et enzyme malique à NADP des organes aériens de *Pennisetum typhoides* L. cv. « Droû Zarzis », originaire de zones tunisiennes à terrains riches en sel, et pour comparaison, de *P. americanum* (L.) Leeke cv 23 DB, *P. violaceum* (L.) Rich. et *P. mollissimum* Hochst, originaires de zones tropicales semi-arides. Les traitements consistent en l'addition de NaCl 25 mM ou 75 mM au milieu de culture des plantes de 8 j. Les analyses portent sur les plantes de 26 j. La croissance exprimée par la production de matière fraîche permet de classer les 4 mils selon leur tolérance dégressive à NaCl : *P. typhoides* qui montre une tendance marquée à l'halophilie, puis *P. mollissimum*, *P. americanum* 23 DB et enfin *P. violaceum*. Une classification intégrant l'ensemble des résultats a été tentée. Elle précise le caractère très tolérant de *P. typhoides* et très sensible de *P. violaceum*. Les relations entre les capacités enzymatiques étudiées et le choc salin se traduisent par un effet positif sur la capacité phosphoenolpyruvate carboxylase des 4 mils mais de plus grande ampleur chez *P. typhoides* le plus tolérant, un effet positif sur la capacité enzyme malique à NADP de *P. typhoides*, mais négatif sur la capacité enzyme malique à NADP de *P. violaceum*, mil le moins tolérant. En 1^{re} approximation, sur le plan de l'assimilation de CO₂, la tolérance à NaCl observée chez *P. typhoides* correspond donc à une stimulation de la capacité de fixation de CO₂, associée à une production activée de CO₂ à partir du malate dans les chloroplastes de cellules de gaine. La sensibilité à NaCl chez *P. violaceum*, mil non tolérant, apparaît liée à un déficit de décarboxylation du malate dans les gaines. Il a été vérifié que NaCl ne modifie pas l'affinité de ces 2 enzymes pour leurs substrats, ni les sites antigéniques.

Mots clés additionnels : *Pennisetum*, protéines.

SUMMARY

Salt tolerance in Pennisetum spp. : growth, PEP carboxylase and NADP malic enzyme activities.

For the evaluation of salt tolerance, the fresh matter production, soluble protein content, phosphoenolpyruvate carboxylase and NADP-malic enzyme activities were analysed in the shoots of *P. typhoides* L. cv. 'Droû Zarzis', widespread in salt-rich soils in Tunisia and, for comparison, *P. americanum* (L.) Leeke cv 23 DB, *P. violaceum* (L.) Rich. and *P. mollissimum* Hochst originating from semi-arid climates. Salt treatments consisted of addition of NaCl at 25 mM or 75 mM to the nutrient solution when seedlings were 8 days old. Seedlings were sampled for analysis at the age of 26 days. Classification of the four millets in the order of decreasing salt tolerance, estimated as fresh matter production, was as follows : *P. typhoides*, inclined to halophily, *P. mollissimum*, *P. americanum* 23 DB and last, *P. violaceum*. Classification based on all criteria tested in this study confirmed *P. typhoides* as fairly NaCl-tolerant and *P. violaceum* as very sensitive. Salt stress brought about a positive effect on phosphoenolpyruvate carboxylase capacity in all four millets with a strong effect on the enzyme of the most tolerant *P. typhoides*, a positive effect on *P. typhoides* NADP-malic enzyme but a negative effect on NADP-malic enzyme of the less tolerant *P. violaceum*. These results were interpreted as suggesting that, relative to CO₂ assimilation, the salt tolerance of *P. typhoides* could be explained by the stimulation of CO₂ fixation associated with stimulation of CO₂ release from malate in the bundle-sheath chloroplasts. NaCl sensitivity of the non-tolerant *P. violaceum* could be partly explained by a shortage of malate decarboxylase in the bundle-sheath chloroplasts. NaCl was found to affect neither the affinity of either enzyme for its substrate, nor its antigenic site.

Additional key words : *Pennisetum*, proteins.

ABRÉVIATIONS UTILISÉES :

DTT : dithiothreitol ; EDTA : éthylène diamine tétra-acétate disodique ; MDH : malate déshydrogénase ; MF : matière fraîche ; NADP-EM : enzyme malique à NADP ; PEP : phosphoénolpyruvate ; PEPC : phosphoénolpyruvate carboxylase.

I. INTRODUCTION

La section *Penicillaria* du genre *Pennisetum* comprend un grand nombre d'espèces et de variétés représentées par des formes spontanées et des formes cultivées. La diversité des écotypes est illustrée par le fait que si, en Afrique, la culture du mil est surtout pratiquée en zone sahélo-soudanaise, caractérisée par un climat tropical semi-aride, un mil céréalier, *P. typhoides* Droë Zarzis, est cependant cultivé en Tunisie dans des zones irriguées par l'eau de la Medjerba dont la teneur en NaCl est proche de 3 g/l.

Dans cette étude, nous avons cherché à mettre en évidence des caractères de résistance au sel de *P. typhoides* L. cv. « Droë Zarzis », en cultivant les plantes dans des conditions contrôlées de salinité et en comparant leur comportement à celui de 3 *Pennisetum* d'origine géographique différente *P. americanum* (L.) Leeke 23 DB, forme cultivée sélectionnée en Géorgie (USA) et 2 formes sauvages, *P. violaceum* (L.) Rich. surtout localisé le long du fleuve Sénégal et *P. mollissimum* Hochst rencontré au Mali, en dehors des cultures de mil à chandelle. Ces mils ont tous un métabolisme carboné de type C_4 , à enzyme malique à NADP dominante (LAVERGNE *et al.*, 1979).

L'évaluation de la résistance des plantes à NaCl a porté sur un critère de croissance, la quantité de matière fraîche des organes aériens, sur la teneur en protéines solubles en tant qu'expression du contenu enzymatique global et sur les activités phosphoénolpyruvate carboxylase (PEPC, EC 4.1.1.31) et enzyme malique à NADP (NADP-EM, EC 1.1.1.40) de plantes de 26 j cultivées dans des milieux de salinité contrôlée. La comparaison de ces 2 enzymes chez les 4 mils a été également conduite par approche immunologique.

Le choix de l'étude de la PEPC et de la NADP-EM a été dicté par plusieurs considérations. La PEPC est responsable de la fixation initiale de CO_2 dans les cellules de mésophylle des plantes de type C_4 (HATCH & SLACK, 1970). Couplée à l'enzyme malique à NADP, elle participe à l'homéostasie du pH intracellulaire (DAVIES, 1979 ; GUERN *et al.*, 1983). La NADP-EM, localisée dans les chloroplastes des gaines périvasculaires catalyse la décarboxylation du malate et réalise ainsi l'approvisionnement en CO_2 du cycle photosynthétique du carbone (cycle de Calvin-Benson). Elle est activement impliquée dans l'élimination de l'excès de malate chez les plantes de terrains salés (OSMOND & LATIES, 1969). Des perturbations du contenu enzymatique des tissus végétaux sous l'effet de NaCl ont été signalées (OSMOND & GREENWAY, 1972 ; GREENWAY & OSMOND, 1972). Pour ce qui est de la PEPC et de la NADP-EM, de nombreuses études ont montré l'influence de la salinité ainsi que d'autres facteurs du milieu externe tels que l'éclairement ou la carence en

phosphate sur leur niveau d'activité chez le maïs, le blé, le sorgho (HATCH, 1969 ; COLLINS & HAGUE, 1983 ; MIGINIAC-MASLOW *et al.*, 1983 ; VIDAL & GADAL, 1983). Le sel entraînerait chez *Plantago maritima* L. une telle exaltation de l'activité PEPC que le métabolisme carboné de cette plante en milieu salé a été comparé à un métabolisme de type C_4 (FERRON *et al.*, 1977). Chez *Kalanchoe blossfeldiana*, glycophyte présentant le métabolisme acide des Crassulacées (CAM), le traitement salin provoque une forte augmentation de la capacité de la PEPC (DIALLO & QUEIROZ-CLARET, 1983). La NADP-EM des feuilles de *Triglochin maritima* L. est fortement inhibée par NaCl ou KCl (GREENWAY & SIMS, 1974).

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Culture des plantes

Les semences de *P. typhoides*, cv. « Droë Zarzis » et de *P. mollissimum* Hochst ont été fournies par le laboratoire de Génétique et Physiologie du Développement des Plantes du CNRS de Gif-sur-Yvette, France.

Les semences de *P. violaceum* (L.) Rich et de *P. americanum* synonyme de *P. typhoides* L. ou de *P. typhoideum* (L.) Rich, cv. 23 DB ont été fournies par l'ORSTOM, Bondy, France.

Les semences sont mises directement à germer dans du sable humidifié à capacité de rétention 130 ml/kg, à raison d'un grain par pot de 2 l en salle conditionnée. L'éclairement, de 250-270 W.m⁻² (mesure au quantum sensor) est fourni par les lampes OSRAM à décharge de 1 000 W. Le cycle photo-périodique est de 14 h/10 h (jour/nuit). Les températures de jour et de nuit sont respectivement de 30 et 20 °C. L'humidité est d'environ 70 p. 100. L'arrosage est fait par l'eau déminéralisée jusqu'au stade 2 feuilles (8 j après le semis) où débute le traitement salin. Les plantes traitées sont alors arrosées par la solution de base contenant NaCl aux concentrations 25 mM ou 75 mM. Les plantes témoins reçoivent la solution de base. Chaque lot comprend 3 plantes.

La solution de base type BLONDON (1968) a la composition suivante :

KNO_3 : 2,7 mM ; $Ca(NO_3)_2$: 4,5 mM ; KH_2PO_4 : 1 mM ; $(NH_4)_2SO_4$: 1 mM ; $MgSO_4$: 1,1 mM ; H_3BO_3 : 0,05 mM ; Na_2MoO_4 : 0,014 mM ; KCl : 0,04 mM ; $CuSO_4$: $0,5 \cdot 10^{-3}$ mM ; $MnSO_4$: 0,01 mM ; $ZnSO_4$: 0,002 mM ; EDTA ferrique : 0,1 mM. L'ion Na^+ n'est apporté que sous forme de traces par les impuretés des principaux sels utilisés. L'exigence d'un minimum de Na^+ dans le milieu de culture pour les plantes de type C_4 est bien connue (BROWNELL & CROSSLAND, 1972).

Au 26^e j de culture, les plantes sont récoltées 1 h 30 après le début de la photopériode. La totalité des organes aériens de chaque plante est pesée et fixée dans l'azote liquide. Trois cultures avec les traitements par NaCl 0, 25 mM, 75 mM de NaCl ont été répétées. Les 3 cultures donnent des résultats qui évoluent toujours dans le même sens avec cependant une très grande variation des valeurs absolues d'une culture à l'autre, de telle sorte qu'on a été amené à pré-

senter les résultats de la culture dont l'évolution est la plus représentative.

B. Préparation des extraits enzymatiques

Toutes les opérations ont été conduites à froid.

Les organes aériens préalablement fixés dans l'azote liquide sont broyés au mixer Polytron dans un tampon Tricine 50 mM (pH 8), DTT 5 mM puis homogénéisés dans un broyeur de tissus Tenbroeck.

Le broyat est filtré sur nylon (36 µm de vide de maille). Le filtrat est centrifugé à 25 000 g pendant 10 mn. Le surnageant obtenu constitue la fraction soluble utilisée pour la détermination des activités enzymatiques.

C. Mesure des activités enzymatiques

Les mesures sont effectuées à 30 °C.

L'activité PEPC est mesurée au spectrophotomètre Pye Unicam SP8 100 en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm dans une réaction couplée avec la malate déshydrogénase (SIGMA). L'extrait enzymatique est incubé 5 mn à 30 °C dans le milieu réactionnel suivant : Tricine 50 mM, pH 8, NADH 0,25 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 10 mM, NaHCO₃ 20 mM, MDH 0,02 U. La réaction est initiée par le PEP 5 mM (LANE *et al.*, 1969). Le volume réactionnel est de 1 ml.

L'activité NADP-EM est mesurée par spectrophotométrie en suivant la réduction du NADP, à 340 nm. Le volume réactionnel total est de 1 ml dans le tampon Tricine 50 mM, pH 8,3. Les substrats et cofacteurs sont : malate 5 mM, NADP 0,5 mM, EDTA 0,1 mM, MgCl₂ 2 mM. Un essai sans MgCl₂ est effectué dans chaque expérience afin de corriger une réduction possible du NADP due à l'activité malate deshydrogénase à NADP. La réaction est initiée par l'addition du malate 5 mM.

D. Analyse immunologique

Un volume de 10 ml de préparation enzymatique est précipité par (NH₄)₂SO₄, 7 H₂O entre 10 et 60 p. 100 de saturation. Le culot obtenu après 20 mn de centrifugation, à 48 000 g est repris dans 250 µl de tampon Tricine 50 mM pH 8,5. La méthode de double diffusion d'OUCHTERLONY (1958) est employée avec un anticorps de lapin contre la PEPC du sorgho (*Sorghum vulgare*) (VIDAL & GADAL, 1983) et un anticorps de lapin contre la NADP-EM de sorgho (JOLIVET & VIDAL, comm. pers.).

E. Dosage des protéines solubles

Les protéines sont dosées sur les extraits enzymatiques après précipitation à l'acide trichloracétique à 20 p. 100. Le précipité est repris par une solution de NaOH 1 M et dosé par colorimétrie selon LOWRY *et al.* (1951). La quantité de protéines est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage faite avec la sérum albumine bovine entre 0 et 250 µg de protéines.

III. RÉSULTATS

A. Croissance des plantes

Au terme de 26 j de culture, les plantes de *P. violaceum*, *P. mollissimum* et *P. americanum* cultivées sans traitement NaCl sont au stade 10-12 feuilles avec 3 talles à l'aisselle des feuilles 3-4. La feuille 1 est la 1^{re} feuille apparue. *P. typhoides* cv. « Droô Zarzis » présente 8-10 feuilles avec un seul talles à l'aisselle de la feuille 3. Par sa grande taille *P. typhoides* traité par NaCl 25 mM se démarque nettement de son témoin et des 3 autres mils. Il présente 10-13 feuilles avec de nombreux talles. *P. violaceum*, *P. mollissimum* et *P. americanum* traités par NaCl 25 mM sont très semblables à leurs témoins. Les plantes soumises au traitement 75 mM de NaCl apparaissent rabougries (7-8 feuilles) par rapport au témoin cultivé en absence de sel pour *P. violaceum*, *P. americanum* et *P. mollissimum* tandis que la morphologie et la taille de *P. typhoides* se rapprochent de celles de son témoin.

B. Quantité de matière fraîche et teneur en protéines solubles des organes aériens

Pour les 4 mils témoins (cultures non traitées par NaCl), on remarque que la production de matière fraîche en 26 j est plus faible chez *P. typhoides*, plus forte chez *P. violaceum* que chez les 2 autres mils. Elle est affectée de façon différente par l'addition de NaCl dans le milieu de culture. La concentration 25 mM favorise la croissance du « Droô Zarzis » qui tend à doubler. Elle ne modifie pas la quantité de matière fraîche de *P. americanum* « 23 DB » et *P. mollissimum*. Elle diminue la production de matière fraîche de *P. violaceum*. A la concentration 75 mM, le sel entrave la production de matière fraîche des 4 mils et en particulier de *P. violaceum* (tabl. 1).

Chez les témoins, la teneur en protéines solubles exprimée en g de matière fraîche est sensiblement égale pour le cv. « 23 DB », *P. violaceum* et *P. mollissimum*, alors qu'elle est plus élevée chez le « Droô Zarzis ». NaCl aux concentrations 25 et 75 mM ne modifie pas ces teneurs (tabl. 1). Les variations des

TABLEAU 1

Influence de la concentration en NaCl du milieu de culture sur la production de matière fraîche et la teneur en protéines solubles des organes aériens de mils de 26 jours.

Effect of NaCl in the nutrient solution on the fresh weight and soluble protein content of the shoots of 26-day-old pearl millets.

	NaCl mM	MF g par plante	Protéines solubles mg.g ⁻¹ MF
<i>P. typhoides</i>	0	7,5	11,6
cv. Droô Zarzis	25	18,3	7
	75	3,7	8,6
<i>P. americanum</i>	0	12	7
cv. 23 DB	25	10	7
	75	4,1	7,5
<i>P. violaceum</i>	0	23,7	5
	25	11,7	5,2
	75	7	5,2
<i>P. mollissimum</i>	0	12,2	8
	25	12,3	7,5
	75	7,4	8,4

quantités de protéines solubles par plante suivent celles de la masse de matière fraîche.

L'augmentation de la production de matière fraîche sous l'effet de NaCl 25 mM chez le « Droô Zarzis » montre une tendance marquée à l'halophilie chez ce mil. Il ressort de ces 1^{res} observations la possibilité d'un classement de 4 mils selon leur sensibilité dégressive vis-à-vis de NaCl : *P. typhoides* cv. « Droô Zarzis », *P. mollissimum*, *P. americanum* cv. « 23 DB », *P. violaceum*. Pour la suite des résultats, ce classement a été choisi afin d'en faciliter la lecture.

C. Activité PEPC

Qu'elle soit exprimée par g de matière fraîche ou par mg de protéines solubles, l'activité PEPC ne présente pas de variation marquée entre les différents mils cultivés en absence de sel (tabl. 2). L'effet du traitement par NaCl en revanche se présente comme suit : chez le « Droô Zarzis », l'activité par g de matière fraîche et par mg de protéines solubles est augmentée par le sel à la concentration 25 mM. Elle n'est pas affectée de façon interprétable chez *P. mollissimum*, *P. americanum* et *P. violaceum* par le sel à cette concentration. Mais la présence de NaCl 75 mM dans le milieu de culture stimule l'activité PEPC par unité de matière fraîche et par mg de protéines solubles chez tous les mils étudiés. Puisque la quantité de protéines solubles totales par plante diminue en présence de NaCl 75 mM, ce résultat suggère que la PEPC est moins affectée par la salinité que l'ensemble des protéines solubles.

Le NaCl aux concentrations étudiées ne modifie pas le Km apparent pour le PEPC de l'activité PEPC *in vitro*. Ce Km est 0,6, 0,55, 0,48, 0,56 respectivement pour *P. typhoides* cv. « Droô Zarzis », *P. mollissimum*, *P. americanum* cv. « 23 DB », *P. violaceum* cultivés en présence ou en absence de sel. Le sel

TABLEAU 2

Influence de la concentration en NaCl du milieu de culture sur les activités PEPC et NADP-EM des organes aériens de mils de 26 jours

Effect of NaCl in the nutrient solution on the PEPC and NADP-EM activities of the shoots of 26-day-old pearl millet.

	NaCl mM	PEPC μmol NADH oxydé mn ⁻¹		NADP-EM μmol NADP réduit mn ⁻¹	
		mg ⁻¹		mg ⁻¹	
		g ⁻¹ MF	protéines solubles	g ⁻¹ MF	protéines solubles
<i>P. typhoides</i>	0	8,6	0,7	7	0,6
cv. Droô Zarzis	25	10,4	1,4	5,6	0,8
	75	13	1,5	12	1,4
<i>P. mollissimum</i>	0	10	1,2	7	0,9
	25	11	1,4	7,2	1
	75	14	1,6	6	0,7
<i>P. americanum</i>	0	8	1,1	6	0,9
	25	8	1,1	6	0,9
	75	12	1,6	10	1,3
<i>P. violaceum</i>	0	10	1,5	3,6	0,7
	25	11	1,5	3,1	0,6
	75	14	2,2	3,4	0,6

n'altère donc pas l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Cependant, le traitement par NaCl 50 mM et 75 mM des extraits bruts de mils cultivés en absence de sel provoque une inhibition de l'activité *in vitro* mesurée en présence de PEP 1,5 mM. La concentration de PEP 3 mM lève cette inhibition au moins partiellement, sinon totalement (tabl. 3). A ce point de vue, la PEPC de « Droô Zarzis » est beaucoup plus inhibée que celle des autres mils notamment de *P. violaceum*. Le traitement par NaCl des extraits bruts de plantes cultivées en présence de NaCl 75 mM provoque aussi une inhibition de l'activité PEPC *in vitro*, mais l'inhibition n'est pas levée par le PEP (tabl. 4). Des effets similaires ont été signalés par GREENWAY & OSMOND (1972) travaillant avec des extraits de feuilles d'*Atriplex spongiosa*, espèce connue pour sa résistance élevée à la salinité.

TABLEAU 3

Effet du prétraitement *in vitro* par NaCl, d'extraits de mils cultivés en absence de NaCl, sur l'activité PEPC. L'activité de l'extrait non prétraité par NaCl (témoin) est prise égale à 100. Deux expériences sont présentées (moyenne de 2 mesures par expérience).

Effect of *in vitro* pretreatment by NaCl of crude extracts from shoots of pearl millets grown without NaCl, on PEPC activity. The activity of the non-pretreated extract is taken as 100. Two experiments are shown (mean of two measurements per experiment).

	Traitement de l'extrait NaCl, mM	Activité PEPC, % du témoin			
		PEP <i>in vitro</i> , mM			
		1,5	3		
<i>P. typhoides</i>	25	95	93	99	100
	cv. Droô Zarzis	50	58	61	75
		75	45	39	74
<i>P. mollissimum</i>	25	98	98	99	100
	50	63	62	100	99
	75	57	59	98	100
<i>P. americanum</i>	25	98	97	99	99
	cv. 23 DB	50	70	73	99
		75	58	65	92
<i>P. violaceum</i>	25	98	98	100	100
	50	75	74	98	100
	75	60	64	98	99

D. Activité NADP-EM

Sur le milieu sans sel, *P. violaceum* se distingue par une activité NADP-EM plus faible que celle des autres mils (tabl. 2). NaCl 25 mM n'affecte pas sensiblement l'activité par unité de matière fraîche ou de protéines solubles. En revanche, à 75 mM, il la stimule chez le « Droô Zarzis » et chez *P. americanum*, que l'activité soit exprimée par g de matière fraîche ou par mg de protéines solubles.

Le Km apparent de la NADP-EM pour le malate est 0,57, 0,50, 0,35, 0,47 mM respectivement pour l'enzyme des extraits bruts de « Droô Zarzis », *P. mollissimum*, *P. americanum* et *P. violaceum*. Ces Km ne sont pas affectés par la présence de NaCl dans le milieu de culture. Le traitement des extraits bruts des plantes témoins pour le NaCl *in vitro* ne modifie pas les activités NADP-EM.

E. Analyse immunologique

Les tests d'immunologie effectués en présence des immun-sérums anti-PEPC et anti-NADP-EM de sorgho, sur les extraits enzymatiques des 4 mils culti-

vés en présence ou en absence de NaCl, révèlent une parfaite identité des PEPC, d'une part, des NADP-EM, d'autre part, entre les 4 mils et selon les conditions de culture (fig. 1A et 1B).

Figure 1

Analyse immunologique par le test de la double diffusion d'OUCHTERLONY (1958) de la PEPC (A), de la NADP-EM (B) de (1), *P. americanum* cv. 23 DB ; (2), *P. typhoides* cv. Droô Zargis ; (3), *P. mollissimum* ; (4), *P. violaceum*. Influence de l'addition de NaCl dans le milieu de culture : (1, 2, 3, 4), témoins sans NaCl ; (1a, 2a, 3a, 4a), NaCl 25 mM ; (1b, 2b, 3b, 4b), NaCl 75 mM. (ac), dans le puits central 10 µl d'antisérum de lapin contre la PEPC de sorgho (A), contre la NADP-EM de sorgho (B). Les puits périphériques contiennent 10 µl des extraits protéiques des feuilles des mils.

Immunological analysis by the OUCHTERLONY double diffusion test of PEPC (A) and NADP-EM (B) from : 1) *P. americanum* cv. 23 DB ; 2) *P. typhoides* cv. Droô Zargis ; 3) *P. mollissimum* ; 4) *P. violaceum* : 1-4) controls without NaCl, 1a-4a) 25 mM NaCl, 1b-4b) 75 mM NaCl. Centre well (ac) with 10 µl rabbit antiserum against sorghum PEPC (A) or NADP-EM (B). Surrounding wells with 10 µl protein extract from Pennisetum leaves.

IV. DISCUSSION

P. typhoides cv. « Droô Zarzis » se distingue très nettement des 3 autres mils étudiés par sa tendance à l'halophilie. Des différences variétales ont aussi été signalées chez le maïs (SIEGEL *et al.*, 1980) et le lupin. En effet, un gain de 50 p. 100 de matière fraîche est provoqué chez *Lupinus luteus* mais non chez *Lupinus angustifolius*, par la culture sur milieu salé (VAN STEVENINK *et al.*, 1982). *P. americanum*, *P. mollissimum* et *P. violaceum* soumis au traitement par NaCl 75 mM présentent au niveau de leur morphologie et de leur croissance des caractéristiques déjà décrites chez les glycophytes sensibles au sel (atriplex, haricot) c'est-à-dire, réduction du nombre de feuilles et de leur croissance pondérale (HAMZA, 1977 ; MEIRI & POLJAKOFF-MAYBER, 1970).

Les teneurs en protéines solubles ne présentent pas de variations significatives sous l'effet du sel chez les mils étudiés ce qui est comparable aux observations sur l'orge soumis à un traitement par NaCl 200 mM (ASLAM *et al.*, 1984). Cependant, une diminution des teneurs en protéines a été signalée chez le pois (KAHANE & POLJAKOFF-MAYBER, 1968). Il est toutefois à noter que les différences ainsi observées peuvent ne dépendre que de l'âge physiologique des plantes et du moment d'application du traitement au sel (LEVITT, 1972). L'augmentation des activités PEPC et NADP-EM par unité de protéines solubles chez les plantes traitées par NaCl 75 mM suggère un enrichissement relatif des pools de protéines solubles en ces 2 enzymes par rapport aux autres protéines, comme cela a déjà été signalé chez le blé (MIGINIAC-MASLOW *et al.*, 1983).

L'augmentation de l'activité PEPC par le traitement des plantes par NaCl 75 mM est une manifestation de la réponse des plantes au choc salin qui peut être comparée à l'augmentation de l'activité PEPC chez le maïs et chez le blé en réponse à des contraintes nutritionnelles (HAGUES & SIM, 1980 ; MIGINIAC-MASLOW *et al.*, 1983). L'activité PEPC mesurée *in*

TABLEAU 4

Effet du prétraitement *in vitro* par NaCl, d'extraits de mils cultivés en présence de NaCl 75 mM, sur l'activité PEPC. L'activité de l'extrait non prétraité par NaCl (témoin) est prise égale à 100. Deux expériences sont présentées (moyenne de 2 mesures par expérience).

Effects of *in vitro* pretreatment by NaCl of crude extracts from shoots of pearl millets grown on 75 mM NaCl, on PEPC activity. The activity of the non-pretreated extracts is taken as 100. Two experiments are shown (mean of two measurements per experiment).

	Traitement de l'extrait NaCl, mM	Activité PEPC, % du témoin			
		PEP <i>in vitro</i> , mM			
		1,5	3		
<i>P. typhoides</i>	25	88	92	90	92
Droô Zarzis	50	86	87	89	91
	75	86	89	87	90
<i>P. mollissimum</i>	25	87	85	89	87
	50	86	85	90	87
	75	89	90	89	91
<i>P. americanum</i> cv. 23 DB	25	83	87	82	85
	50	86	86	100	92
	75	86	87	87	89
<i>P. violaceum</i>	25	86	82	88	84
	50	89	90	94	92
	75	87	87	87	87

vitro dans les extraits de tissus foliaires peut être considérée comme l'expression de l'activité potentielle ou capacité enzymatique. Le fait que l'activité PEPC soit inhibée par traitement *in vitro* des extraits de feuilles par NaCl alors que la capacité PEPC des tissus est soit non modifiée, soit stimulée par le traitement des plantes par NaCl, laisse supposer l'existence *in situ* d'une protection de la PEPC vis-à-vis des ions Na⁺ et Cl⁻. Cette protection serait meilleure chez « Droô Zarzis » que chez les autres cultivars, en particulier que chez *P. violaceum*.

L'absence de modification des sites antigéniques de la PEPC et de la NADP-EM par le traitement salin

TABLEAU 5

Tolérance à NaCl de *P. typhoides* cv « Droô Zarzis », *P. mollissimum*, *P. americanum*, *P. violaceum*, calculée par la somme algébrique des effets des traitements par NaCl 25 mM et 75 mM sur la quantité de matière fraîche, la teneur en protéines solubles, les activités PEPC et NADP-EM. Les effets sont exprimés par la variation en p. 100 des mesures obtenues avec les plantes non traitées.

Sensitivity to NaCl of *P. typhoides* cv «Droô Zarzis», *P. americanum*, *P. mollissimum*, *P. violaceum*, calculated as the algebraic sum of the effects of treatments by 25 mM and 75 mM NaCl on fresh weight, soluble protein content, PEPC and NADP-EM activities. Effects are expressed by variation in % of corresponding values for non-treated plants.

	NaCl mM	a Matière fraîche	b Protéines solubles	c PEPC	d NADPH-EM	Effet de NaCl = a + b + c + d	
<i>P. typhoides</i>	0	100	100	100	100		
cv. Droô Zarzis	25	+ 144	- 40	+ 21	- 20	+ 105	+ 150
	75	- 51	- 26	+ 51	+ 71	+ 45	
<i>P. americanum</i>	0	100	100	100	100		
	25	- 17	0	0	0	- 17	+ 41
	75	- 66	+ 7	+ 50	+ 67	+ 58	
<i>P. mollissimum</i>	0	100	100	100	100		
	25	+ 0,8	- 6	+ 10	+ 3	+ 7,8	- 0,2
	75	- 39	+ 5	+ 40	- 14	- 8,0	
<i>P. violaceum</i>	0	100	100	100	100		
	25	- 51	+ 4	+ 10	- 14	- 51	- 83,5
	75	- 70,5	+ 4	+ 40	- 6	- 32,5	

des plantes, et l'augmentation des activités enzymatiques correspondantes laissent supposer que les mécanismes mis en jeu par les mils en réponse au choc salin dépendent plus de la capacité des plantes à compartimenter Na^+ voire Cl^- que de l'adaptabilité des systèmes enzymatiques (GREENWAY & MUNNS, 1980).

Le rôle fondamental de la compartimentation intracellulaire des métabolites a été signalé par OSMOND & LATIES (1969). Des mesures physiologiques concordent pour suggérer l'existence d'une expulsion active du sodium cytoplasmique vers l'apoplasme ou vers la vacuole, protégeant ainsi les équipements enzymatiques du cytoplasme, notamment dans les organes aériens (GREENWAY & MUNNS, 1980).

Afin de comparer le comportement des 4 mils vis-à-vis de la salinité du milieu de culture, une classification intégrant l'ensemble des résultats présentés dans cette étude a été tentée (tabl. 5). Les effets du sel sur la production de matière fraîche, la teneur en protéines solubles, les capacités PEPC et NADP-EM des organes aériens sont calculés par la variation des valeurs de chaque paramètre chez les plantes traitées, en p. 100 de celles des plantes témoins. La tolérance est traduite par une valeur positive et la sensibilité par une valeur négative. Cette approche confirme la classification présentée plus haut sur la base de la production de matière fraîche. Elle précise de plus le caractère très tolérant de *P. typhoides* « Droô Zarzis » (+ 150), mais très sensible de *P. violaceum* (− 83,5). *P. americanum* et *P. mollissimum* ont un comportement intermédiaire. Soit les mécanismes de réponse au choc salin, soit leur intensité sont différents chez les

4 mils, *P. typhoides* « Droô Zarzis » et *P. violaceum* représentent 2 comportements extrêmes qu'il serait intéressant d'utiliser comme sujet d'étude des modes d'adaptabilité de *Pennisetum* à NaCl.

Les relations entre les capacités PEPC et NADP-EM et le choc salin se traduisent par un effet positif sur la capacité PEPC quel que soit le comportement des plantes, un effet positif (+ 51) sur la capacité NADP-EM de *P. typhoides*, mil tolérant, mais négatif (− 20) sur la capacité NADP-EM de *P. violaceum*, mil, très sensible. Ces 2 enzymes impliquées dans le métabolisme carboné des plantes de type C_4 sont donc affectées différemment lors du traitement des plantes par NaCl. En 1^{re} approche, la capacité NADP-EM apparaît être un marqueur de tolérance à NaCl chez le mil. En effet, la tolérance à NaCl observée chez *P. typhoides* « Droô Zarzis » peut être considérée comme associée à une production activée de CO_2 à partir du malate dans les cellules de gaine, tandis que la sensibilité à NaCl chez *P. violaceum* serait liée à un ralentissement de décarboxylation du malate dans les gaines.

Reçu le 6 novembre 1985.

Accepté le 7 avril 1986.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Mr le Professeur A. MOYSE pour la lecture critique du manuscrit, Mr le Dr J. VIDAL qui a bien voulu nous fournir les anticorps et nous initier aux techniques d'immunologie, Melle F. MAURY pour la participation à la présentation du manuscrit.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aslam M., Huffaker R. C., Williams R. D., 1984. Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.*, **76**, 321-325.
- Blondon F., 1968. *Contribution à l'étude du développement des graminées fourragères : Ray-grass et dactyle*. Thèse Doct. Etat, Sc. Nat., Univ. de Paris, CNRS N° AO 2522, 74 p.
- Brownell P. F., Crossland C. J., 1972. The requirement for sodium as a micronutrient by species having the C_4 dicarboxylic photosynthetic pathway. *Plant Physiol.*, **49**, 794-797.
- Collins P. D., Hague D. R., 1983. Light-stimulated synthesis of NADP malic enzyme in leaves of maize. *J. Biol. Chem.*, **258**, 4012-4037.
- Davies D. D., 1979. The central role of phosphoenolpyruvate in metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 131-158.
- Diallo N., Queiroz-Claret C., 1983. Effet du chlorure de sodium sur le métabolisme carboné de *Cakile maritima* et *Kalanchoe blossfeldiana*. *Physiol. Vég.*, **21**, 621-632.
- Ferron F., Coudret A., Gaudillère J. P., 1977. Etude de la salinité du milieu de culture sur les voies de carboxylation d'une halophyte (*Plantago maritima* L. var. *graminaea*) et d'une glycophyte (*Plantago lanceolata* L.). *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **285**, Série D, 323-326.
- Greenway H., Munns R., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 149-190.
- Greenway H., Osmond C. B., 1972. Salt responses of enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiol.*, **49**, 256-259.
- Greenway H., Sims A. P., 1974. Effects of high concentrations of KCl and NaCl on responses of malate dehydrogenase (decarboxylating) to malate and various inhibitors. *Austr. J. Plant Physiol.*, **1**, 15-29.
- Guern J., Mathieu Y., Kurdjian A., 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and the regulation of intracellular pH in plant cells. *Physiol. Vég.*, **21**, 855-866.
- Hagues D. R., Sims T. L., 1980. Evidence for light-stimulated synthesis of PEPC in leaves of maize. *Plant Physiol.*, **66**, 506-509.
- Hamza M., 1977. *Action de différents régimes d'apport de chlorure de sodium sur la physiologie de deux légumineuses : Phaseolus vulgaris (sensible) et Hedysarum carnosum (tolérante). Relations hydriques et relations ioniques*. Thèse Doct. Etat, Université Paris VII, 251 p.
- Hatch M. D., 1969. Light-induced changes in the content of some enzymes of the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis and its effect on the characteristic of photosynthesis. *Phytochemistry*, **8**, 697-706.
- Hatch M. D., Slack C. R., 1970. Photosynthetic CO_2 fixation pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **21**, 141-162.
- Kahane I., Poljakoff-Mayber A., 1968. Effect of substrate salinity on the activity for protein synthesis in pea roots. *Plant Physiol.*, **43**, 1115-1119.
- Lane M. D., Maquyama H., Easterday R. L., 1969. Phosphoenolpyruvate carboxylase from peanut cotyledon. *Method. Enzymol.*, **13**, 277-283.
- Lavergne D., Bismuth E., Champigny M. L., 1979. Physiological studies of two cultivars of *Pennisetum* : *P. americanum* 23 DB, a cultivated species and *P. mollissimum*, a wild species. *Z. Pflanzphysiol.*, **91**, 291-303.
- Levitt J., 1972. *Responses of plants to environmental stresses*. Academic Press, New York, London, 697 p.

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.**, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Meiri A., Poljakoff-Mayber A.**, 1970. Effect of various salinity regimes on growth, leaf expansion and transpiration rate of bean plants. *Soil Sci.*, **109**, 26-34.
- Miginiac-Maslow M., Vidal J., Bismuth E., Hoarau A., Champigny M. L.**, 1983. Effet de la carence et de la réalimentation en phosphate sur l'équilibre énergétique et l'activité phosphoenolpyruvate carboxylase de jeunes plantes de blé. *Physiol. Vég.*, **21**, 325-336.
- Osmond C. B., Greenway H.**, 1972. Salt response of carboxylation enzymes from species differing in salt tolerance. *Plant Physiol.*, **49**, 260-263.
- Osmond C. B., Laties G. G.**, 1969. Compartmentation of malate in relation to ion absorption in beet. *Plant Physiol.*, **44**, 7-14.
- Ouchterlony O.**, 1958. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy*, **5**, 1-78.
- Siegel S. M., Siegel B. Z., Massey J., Lahne P., Chen J.**, 1980. Growth of corn in saline waters. *Physiol. Plant.*, **50**, 71-73.
- Van Steveninck R. F. M., Steveninck M. E., Stelzer R., Laüchli A.**, 1982. Studies on the distribution of Na and Cl in two species of lupin (*Lupinus luteus* and *Lupinus angustifolius*) differing in salt tolerance. *Physiol. Plant.*, **56**, 465-473.
- Vidal J., Gadal P.**, 1983. Influence of light on phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. II. Immunochemical study. *Physiol. Plant.*, **57**, 124-128.