

Mécanismes régénérateurs d'ATP au cours des premières phases de la germination

par Philippe RAYMOND ¹, Annick HOURMANT ², Jean-Marc LEBLANC ³,

Ali AL-ANI ¹ et Alain PRADET ¹

¹ I.N.R.A. — Station de Physiologie Végétale
Centre de Recherches de Bordeaux, 33140 Pont-de-la-Maye, France.

² Laboratoire de Physiologie Végétale
Faculté des Sciences de Brest, Avenue Victor Le Gorgeu, 29283 Brest Cedex, France.

³ O.R.S.T.O.M. — 24, rue Bayard
75008 Paris, France.

Résumé.— L'activité métabolique extrêmement faible des semences sèches augmente considérablement dès le début de l'imbibition. Cependant, la nature des mécanismes qui produisent l'énergie nécessaire au travail cellulaire est controversée. Les difficultés de mise en évidence de l'oxydation phosphorylante dans les mitochondries extraites de semences récemment imbibées ont fait douter du fonctionnement de cette voie métabolique. La désorganisation des membranes cellulaires provoquée par la dessiccation renforce ce point de vue. Des travaux récents effectués avec une approche différente du problème ont permis de montrer que les mécanismes universels que sont la glycolyse et l'oxydation phosphorylante sont fonctionnels dès le début de l'imbibition. L'importance respective de ces deux voies pour la synthèse d'ATP, selon la nature des réserves des semences, est discutée.

Summary.— The very low metabolic activity of dry seeds increases dramatically as soon as the seeds are imbibed. Nevertheless, the mechanisms of energy production during this period are still under debate. The mitochondria extracted from dry or recently imbibed seeds do not exhibit the oxidative phosphorylation. From this fact and also from the study of the disorganization of biological membranes by drying, it was often asserted that ATP cannot be produced by oxidative phosphorylation during the first hours of imbibition. From recent *in vivo* studies of ATP synthesis, it is now clear that the universal mechanisms of ATP production : glycolysis and oxidative phosphorylation, are able to produce ATP as soon as water enters the seeds. The importance of these pathways varies according to the nature of reserves stored by the seeds.

*
* *

INTRODUCTION

La dessiccation soumet les cellules vivantes à des contraintes extrêmement importantes, qui provoquent dans la plupart des tissus des dommages irréversibles. Dans le

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 15798, ex 1

Cote : B

2 - OCT. 1984

monde végétal, un certain nombre de tissus sont capables de supporter cette épreuve et de reprendre une vie normale après réhydratation. Il en est en particulier ainsi des semences et des spores.

La séquence des événements métaboliques qui ont lieu dans les semences pendant le laps de temps qui sépare le début de l'hydratation de la reprise de la croissance, a donné lieu à beaucoup de travaux (Bewley, 1979). Malgré cela, le métabolisme respiratoire des semences en début de germination reste mal connu. On a cru longtemps que les polyphénol oxydases (Mayer et coll., 1957) ou l'oxydase alterne, résistante au cyanure, avaient un rôle prépondérant dans le transport des électrons (Yentur et Léopold, 1976). Mais des travaux récents tendent à montrer que c'est la voie cytochromique qui joue ce rôle. Longtemps également, les résultats expérimentaux ont poussé certains auteurs à assurer que l'oxydation phosphorylante n'était pas fonctionnelle et différents mécanismes originaux avaient été imaginés pour expliquer la production de l'ATP : synthèse à partir de la phytine (Biswas et Biswas, 1965), de phosphoprotéines (Mayer, 1977) et, plus récemment, Perl (1980) démontrait la possibilité de synthèse d'ATP à partir d'intermédiaires phosphorylés de la glycolyse.

A la suite de travaux récents et d'un réexamen de la littérature, il nous semble que les mécanismes universels de production de l'énergie sont fonctionnels dans les semences dès le début de l'imbibition.

EFFET DE LA DESSICCATION SUR L'ARCHITECTURE CELLULAIRE

La présence d'une couche d'eau sur les deux faces des membranes cellulaires attirant les têtes polaires de phospholipides vers l'extérieur est considéré comme une nécessité pour la stabilisation de cette structure. Luzzatti (1968), analysant des clichés de diffraction de rayons X, montre que la structure ordonnée des phospholipides de différentes membranes biologiques est complètement modifiée au-dessous de 20% d'eau. A ce stade d'hydratation, les têtes polaires des phospholipides entourent de longs canaux d'eau. On s'est demandé quel pouvait être l'effet de la très forte réduction de la teneur en eau sur les membranes des cellules des semences, tout particulièrement sur l'architecture extrêmement sophistiquée de la membrane interne des mitochondries. Simon (1974, 1981) a particulièrement analysé l'importance de ces phénomènes au cours de l'hydratation des semences. Cet auteur pense que l'efflux de sels minéraux et de molécules organiques solubles observé dans les premières heures de l'imbibition, est dû à la désorganisation des membranes. Cette interprétation n'est pas acceptée par d'autres auteurs comme Powell et Matthews (1978) qui l'attribuent à la destruction de cellules due à l'entrée brutale d'eau. Très récemment, Mc Kersie et Stinson (1980), effectuant une étude des propriétés des membranes de semences de *Lotus corniculatus* par diffraction de rayons X, concluent que les modifications des membranes sont très faibles même à 5% d'eau.

Différents auteurs, ces dernières années, ont montré que des protéines qui sont normalement fortement liées à la membrane interne des mitochondries, comme la succinate déshydrogénase ou la cytochrome oxydase, apparaissent dans une fraction non membranaire dans les semences en formation, les semences sèches ou les semences en germination soumises à dessiccation (Lado, 1967 ; Nakayama et coll., 1980).

Simon (1981) voit dans ce phénomène une preuve de la fragmentation des mitochondries pendant la dessiccation suivie d'une insertion des protéines pendant l'imbibition. Mais les connaissances actuelles concernant la biogenèse des mitochondries (Neupert et Schatz, 1981) rendent peu probable la possibilité que des protéines préalable-

ment présentes dans des membranes puissent y être insérées à nouveau, puisque, au moment de l'incorporation, les protéines perdent des séquences d'amino-acides nécessaires à la reconnaissance des sites d'insertion.

Les premières études ultrastructurales de semences sèches avaient également apporté des arguments en faveur de la désorganisation des membranes. Mais ces études avaient été effectuées en employant les techniques usuelles de la microscopie électronique qui commencent par une fixation en milieu aqueux. Avec ces méthodes on observait souvent des ruptures dans les membranes de plasmalemme et les membranes de mitochondries étaient difficiles à voir (pour une revue, voir Webster et Léopold, 1977 ; Opik, 1980). Ces observations pouvaient donner des doutes sur l'intégrité de la membrane interne des mitochondries.

Cependant, en utilisant des techniques de cryodécapage ou de fixation anhydre, différents auteurs (Buttrose, 1973 ; Hallam, 1976) ont publié des clichés dans lesquels on ne note pas plus de discontinuité dans les membranes de tissus secs que dans celles de tissus hydratés (Opik, 1980).

Finalement, l'ensemble de ces travaux ne donne pas la preuve que la dessiccation provoque une désorganisation des membranes des semences aussi profonde qu'on le pensait récemment.

ACTIVITE METABOLIQUE DES SEMENCES SECHES

La durée extrêmement longue de la conservation de certaines semences implique que leur activité métabolique, qui entraîne l'utilisation des réserves, soit très faible. Elle n'est, cependant, pas nulle et dépend de la température ainsi que du taux d'hydratation des semences. En effet, le terme de semence sèche s'applique à des matériels dont le taux d'hydratation est très variable, de 6 à 20%.

Une humidité de 14% est normale pour la conservation des semences de Maïs. A cette teneur, Ragai et Loomis (1954) ont montré un dégagement de CO_2 de quelques dix millièmes de celui observé dans des semences hydratées au cours de la phase qui précède la germination. Entre 14 et 24% d'hydratation ce dégagement de CO_2 augmente exponentiellement. Il n'est pas prouvé que la faible consommation d'oxygène observée dans les semences sèches soit due à une oxydation mitochondriale.

La réalité d'une activité métabolique dans les semences à très faibles taux d'hydratation a été confortée par les travaux de différents auteurs qui ont montré l'incorporation de précurseurs radioactifs dans de nombreuses molécules. A l'aide de ces méthodes, Edwards (1976) a montré qu'il faut atteindre des taux d'hydratation extrêmement faibles, de l'ordre de 5%, pour stopper presque complètement l'activité métabolique des semences de *Sinapis*. Cet auteur a également confirmé le caractère exponentiel de l'augmentation de l'activité métabolique entre 5 et 20% d'humidité. Par ailleurs, Chen (1971) a obtenu des résultats qui lui ont permis de suggérer que des amino-acides pouvaient s'incorporer dans les protéines des semences sèches d'Avoine.

L'importance des problèmes posés par la conservation des semences à moyen terme pour l'agriculture, à long terme pour la constitution de banques de gènes, devrait stimuler les recherches dans ce domaine.

MECANISMES DE LA RESPIRATION

— Phases de la germination :

On sait depuis longtemps que dès les premières minutes de l'imbibition de se-

mences, on observe une augmentation très rapide de leurs échanges gazeux respiratoires. La consommation d'oxygène pendant l'imbibition a été étudiée pour beaucoup de semences. Bewley et Black (1978) ont souligné qu'il est important de distinguer entre les tissus capables d'un développement ultérieur et les tissus de réserve. Les courbes typiques de la respiration de ces deux sortes de tissus sont données dans la figure 1. Le processus de germination basé sur la consommation d'oxygène est divisé en plusieurs phases. Une analyse critique de la signification de ces phases est donnée par Kolöffel (1967). La durée respective des différentes phases varie selon les semences et peut être affectée par des facteurs tels que l'humidité, la température et même la lumière pour les semences photosensibles. A partir de la phase III on considère que le métabolisme énergétique est normal.

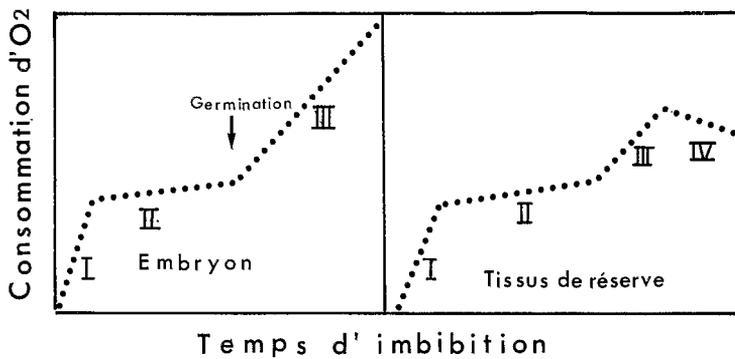


Fig. 1.— Caractérisation des phases de la germination par la vitesse de respiration. (Redessiné d'après Kollöffel, 1967)

D'APRES KOLÖFFEL (1967)

— Substrats utilisés pendant les premières phases :

C'est au cours de la phase III de la germination qu'atteint son maximum l'activité des enzymes permettant l'utilisation massive des réserves de la semence : α -amylase, lipase et enzymes du cycle glyoxylique, ou protéases, selon la nature des réserves. On dispose de peu d'information sur les réserves utilisées dans les phases I et II de la germination. Une activité phosphorylase a été trouvée dans plusieurs semences amylacées sèches (Tarrago et Nicolas, 1976). Des oligosaccharides (saccharose, raffinose, stachyose) sont très répandus dans les semences (Dupéron, 1955). Dans l'Orge, ils sont concentrés dans l'embryon qui les épuise à 95% dans les 24 premières heures de la germination (pour une revue, voir Bewley et Black, 1978). La semence de Laitue contient 3% de saccharose, une quantité très supérieure aux besoins de la respiration dans les premières phases de la germination. Cependant, son quotient respiratoire de 0,7 ainsi que des incorporations de glucose radioactif (Park et Chen, 1974) suggèrent une utilisation par le cycle de Krebs d'acétyl CoA provenant de l'oxydation des acides gras.

— Transport d'électrons :

Depuis plusieurs années, des mitochondries ont pu être extraites des semences sèches d'un petit nombre d'espèces (*Arachis hypogea*, *Pisum sativum*, *Pisum elatius*, *Cicer arietinum*). Ces particules sont capables d'oxyder le succinate et le NADH. Leur capacité d'oxydation de ces substrats est très faible comparée à des mitochondries nor-

males. La vitesse d'oxydation s'accroît notablement au cours de la phase I de la germination. Les mitochondries extraites de semences en germination ne deviennent généralement capables d'oxyder le malate et l' α -cétoglutarate que plus tard au cours de la phase II (Morohashi et Bewley, 1980). Cependant, l'oxydation de l' α -cétoglutarate a pu être observée dès 35 minutes d'imbibition dans les semences de *Phaseolus aureus* (Morohashi et Shimokoriyama, 1975).

La présence des principaux composants de la chaîne des cytochromes a pu être montrée dans des embryons de semences d'Arachide secs ou imbibés pendant quelques minutes (Wilson et Bonner, 1971). Récemment, la sensibilité au cyanure du transport d'électrons de mitochondries en début de germination a été confirmée par Burguillo et Nicolas (1977) et Siedow et Girvin (1980).

Pendant longtemps, des études de l'effet des inhibiteurs de la cytochrome oxydase sur la germination de semences entières avaient compliqué l'analyse de ce problème. Jusqu'à une date très récente, différents auteurs ont présentés des résultats montrant que la germination des semences n'est pas inhibée par KCN et NaN_3 à très fortes concentrations (Mayer et coll., 1957 ; Yentur et Léopold, 1976 ; Yu et coll., 1979 a). La stimulation de la germination par le cyanure était même observée par Hendricks et Taylorson (1972). Cependant, Pradet (1964) avait montré que ces résultats étaient dus à des erreurs dans l'emploi de ces inhibiteurs. Ce résultat a été confirmé récemment par Yu et coll. (1979b). La germination de semences est en fait très sensible à de faibles concentrations de KCN et NaN_3 .

Un artéfact, l'activation pendant la préparation des mitochondries d'une lipoxygénase insensible au KCN et sensible au SHAM, avait fait croire également à l'insensibilité au cyanure de la respiration des premiers stades de la germination (Parrish et Léopold, 1978). Ces travaux avaient permis d'assurer que la voie alterne insensible au cyanure joue un rôle essentiel pour le démarrage de la germination. Des travaux plus récents, dont certains font appel à la méthode de Bahr et Bonner (1971) pour apprécier *in vivo* la participation des oxydations terminales, montrent que la voie cytochromique joue un rôle prépondérant pendant la phase initiale de la germination (Siedow et Girvin, 1980 ; Léopold et Musgrave, 1980 ; Hourmant et Pradet, 1981).

La voie alterne résistante au cyanure semble apparaître après la voie cytochromique (Burguillo et Nicolas, 1977 ; Hourmant et Pradet, résultats non publiés). Mais son rôle et son importance quantitative ne sont pas encore évalués.

— Oxydation phosphorylante :

Les premiers essais de mise en évidence de l'oxydation phosphorylante par mesure du rapport P/O dans les mitochondries de tissus en germination ont été effectués sur des semences de Laitue. Ce n'est qu'après 24 heures d'imbibition, c'est-à-dire au début de la phase III, que l'oxydation phosphorylante pouvait être observée (Ulitzur et Poljakoff-Mayber, 1963). Ces résultats avaient conforté l'idée que la production d'ATP au cours de la germination ne dépendait pas de ce mécanisme (Mayer, 1977). En utilisant des méthodes basées sur la mesure de la synthèse d'ATP *in vivo*, on a montré (Pradet et coll., 1967) que cette synthèse était dépendante de la consommation d'oxygène au cours de la phase II et conclu que l'oxydation phosphorylante était fonctionnelle. Depuis cette époque, on a pu mettre en évidence des contrôles respiratoires et des rapports ADP/O dans des mitochondries extraites de semences en phase II (pour une revue, voir Bewley et Black, 1978 ; Pradet, 1981). Mais jusqu'à présent, il a été impossible de mettre en évidence l'oxydation phosphorylante dans des mitochon-

dries de semences sèches ou en phase I d'imbibition. Reprenant une approche fondée sur la mesure de la synthèse d'ATP *in vivo*, Hourmant et Pradet (1981) ont montré que la synthèse d'ATP étudiée *in situ* dans les premières minutes d'imbibition de semences de Laitue était dépendante de la présence d'oxygène et sensible au cyanure (figure 2).

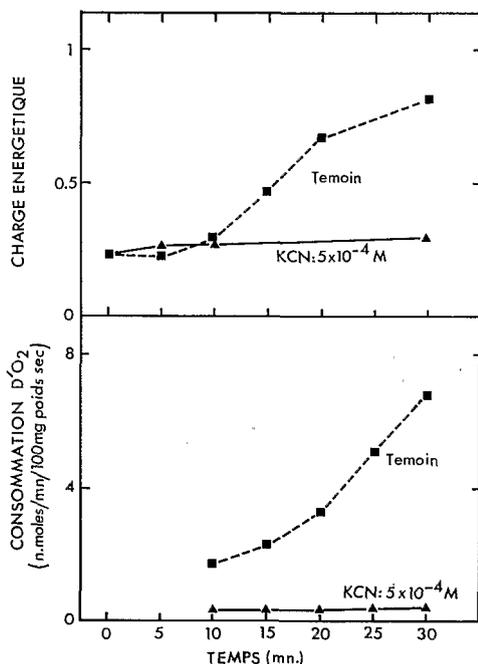


Fig. 2.— Evolution de la consommation d'oxygène et de la charge énergétique au cours des premières minutes d'imbibition de semences de Laitue en condition aérée : dans l'eau et dans une solution de cyanure de potassium (Redessiné d'après Hourmant et Pradet, 1981).

Ils ont conclu que l'oxydation phosphorylante liée à la voie d'oxydation cytochromique est fonctionnelle dès le début de la phase I. Il est vraisemblable que les méthodes qui ont été si fructueuses pour l'étude *in vitro* des mitochondries de tissus hydratés sont encore inadaptées à l'étude des propriétés des tissus secs ou en cours d'hydratation.

ACTIVITE FERMENTAIRE DE SEMENCES GERMANTE A L'AIR

La formation d'éthanol et d'acide lactique au cours de la première phase de la germination à l'air a été mise en évidence dans un grand nombre de semences, indépendamment du type de réserves (Leblova, 1978). L'éthanol s'accumule en quantités environ 10 fois plus fortes que l'acide lactique (Leblova, 1969) et principalement dans les parties axiales (Doireau, 1969). Le fait que la production d'éthanol dépende de la pression partielle d'oxygène, de l'épaisseur de la cuticule ou de celle de la couche d'eau entourant la semence montre que la fermentation est causée le plus souvent par une limitation de l'approvisionnement des tissus en oxygène. Cependant, Morohashi et Shimokoriyama (1975) pensent que l'activité fermentaire de semences de *Phaseolus mungo* est due en partie à une insuffisance relative de la chaîne respiratoire par rapport à la glycolyse.

La contribution des voies fermentaires à la fourniture d'ATP pour la germination sera d'autant plus importante que l'hypoxie sera plus forte. C'est donc en plaçant

les semences en anoxie que l'on pourra estimer la quantité maximum d'ATP qu'elles peuvent fournir pour la germination. Dans ces conditions nous avons trouvé des différences quantitatives importantes en fonction du type de réserves. Dans les semences à réserves amylacées, les fermentations peuvent apporter de l'ATP en quantités relativement importantes tandis que leur apport est vraisemblablement négligeable dans le cas des semences à réserves lipidiques.

La distinction des semences en deux groupes en fonction du type de réserves et de l'activité fermentaire se retrouve quand on examine leurs besoins en oxygène pour la germination. Si dans tous les cas l'oxygène est nécessaire, les besoins en oxygène sont plus élevés pour les semences lipidiques que pour les semences amylacées. La germination des semences lipidiques requiert des pressions partielles d'oxygène supérieures à 1%, tandis que les semences amylacées germent, beaucoup plus lentement que dans l'air, à des pressions d'oxygène inférieures à 0,1%.

Il semble donc qu'il ne soit pas nécessaire pour expliquer la régénération de l'ATP au début de la germination de faire appel à des mécanismes nouveaux. L'oxydation phosphorylante est fonctionnelle dès l'hydratation des tissus. La contribution des voies fermentaires est variable selon le type de réserves de la semence : elle peut être importante pour les semences amylacées quand les structures de la semence ou les conditions de milieu limitent l'approvisionnement des tissus en oxygène.

La connaissance des mécanismes régénérateurs d'ATP au cours de la première phase de la germination est un progrès important dans les recherches qui contribuent à améliorer la survie des semences en conditions défavorables (sols asphyxiants) ou la qualité de leur germination dont dépend la vigueur ultérieure de la plantule.

BIBLIOGRAPHIE

- BAHR J.T. et W.D. BONNER, 1973.— *J. Biol. Chem.*, 240, 3441 - 3445.
 BEWLEY J.D. et M. BLACK, 1978.— *In* : *Physiology and biochemistry of seeds. Development, germination and growth*, Vol. 1. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
 BEWLEY J.D., 1979.— *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 30, 195 - 238.
 BISWAS S. et B.B. BISWAS, 1965.— *Biochim. Biophys. Acta*, 108, 710 - 713.
 BURGUILLO P.F. et G. NICOLAS, 1977.— *Plant Physiol.*, 60, 524 - 527.
 BUTTROSE M.S., 1973.— *Protoplasma*, 77, 111 - 122.
 CHEN S.S.C., 1971.— *Plant Physiol.*, 47, S - 106, 18.
 DOIREAU P., 1969.— *C.R. Acad. Sci. Paris*, 268, série D, 933 - 936.
 DUPERON R., 1955.— *C.R. Acad. Sci. Paris*, 241, série D, 1817 - 1819.
 EDWARDS M., 1976.— *Plant Physiol.*, 58, 237 - 239.
 HALLAM N.D., 1976.— *J. Microscop. Oxford*, 106, 337 - 342.
 HENDRICKS S.B. et R.B. TAYLORSON, 1976.— *Plant Physiol.*, 58, 7 - 11.
 HOURMANT A. et A. PRADET, 1981.— *Plant Physiol.*, 68, 631 - 635.
 KOLLOFFEL C., 1967.— *Acta Bot. Neer.*, 16, 111 - 122.
 LADO P., 1967.— *Giorn. Bot. Ital.*, 101, 303 - 304.
 LEBLOVA S., 1978.— *In* : *Plant life under anaerobic environments*. Hook (D.D.) and Crawford (R. M.M.) Eds. Ann Arbor Science, Ann Arbor, Michigan, 155 - 168.
 LEOPOLD A.C. et M.E. MUSGRAVE, 1980.— *Physiol. Plant.*, 49, 49 - 54.
 LUZZATI V., 1968.— *In* : *Biological membranes : physical fact and function*. Chapman D. Ed. Academic Press, London, 71 - 123.
 Mc KERSIE B.D. et R.H. STINSON, 1980.— *Plant Physiol.*, 66 (2), 316 - 320.
 MAYER A.M., 1977.— *In* : *The physiology and biochemistry of seed dormancy and germination*. Khan A. Ed. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 357 - 383.
 MAYER A.M., A. POLJAKOFF-MAYBER et W. APPLEMAN, 1957.— *Physiol. Plant.*, 10, 1 - 13.

- MOROHASHI Y. et M. SHIMOKORIYAMA, 1975.— J. Exp. Bot., 26, 932 - 938.
- MOROHASHI Y. et J.D. BEWLEY, 1980.— Plant Physiol., 66, 70 - 73.
- NAKAYAMA N., I. SUGIMOTO et T. ASAH, 1980.— Plant Physiol., 65, 229 - 233.
- NEUPERT W. et G. SCHATZ, 1981.— Trends Biochem. Sci., 6, 1 - 4.
- OPIK H., 1965.— J. Exp. Bot., 16, 667 - 682.
- PARK W.N. et S.S.C. CHEN, 1974.— Plant Physiol., 53, 64 - 66.
- PARRISH D.J. et A.C. LEOPOLD, 1978.— Plant Physiol., 62, 470 - 472.
- PERL M., 1980.— Planta, 149, 1 - 6.
- POWELL A.A. et S. MATTHEWS, 1978.— J. Exp. Bot., 29, 1215 - 1229.
- PRADET A., 1964.— C.R. Acad. Sci. Paris, 258, série D, 1610 - 1612.
- PRADET A., A. NARAYANAN et J. VERMEERSCH, 1968.— Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 14, 107 - 144.
- PRADET A., 1982.— In : The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination. Khan A.A. Ed., Spinger Verlag (sous presse).
- RAGAI H. et W.E. LOOMIS, 1954.— Plant Physiol., 29, 49 - 54.
- SIEDOW J.N. et M.E. GIRVIN, 1980.— Plant Physiol., 65, 669 - 674.
- SIMON E.W., 1974.— New Phytol., 73, 377 - 420.
- SIMON E.W., 1982.— In : Physiology and biochemistry of plant respiration. Palmer J.M. Ed. Society for Experimental Biology, Seminar Serie, Cambridge Universty Press. (sous presse).
- TARRAGO J.F. et G. NICOLAS, 1976.— Plant Physiol., 58, 618 - 621.
- ULITZUR S. et A. POLJAKOFF-MAYBER, 1963.— J. Exp. Bot., 14, 95 - 100.
- WEBSTER B.D. et A.C. LEOPOLD, 1977.— Amer. J. Bot., 64, 1286 - 1293.
- WILSON S.B. et W.D. BONNER, 1971.— Plant Physiol., 48, 340 - 344.
- YENTUR S. et A.C. LEOPOLD, 1976.— Plant Physiol., 57, 274 - 276.
- YU K.S., C.A. MITCHELL, S. YENTUR et H.A. ROBITAILLE, 1979a.— Plant Physiol., 63, 121 - 125.
- YU K.S., C.A. MITCHELL et H.A. ROBITAILLE, 1979b.— Plant Physiol., 47, S - 106, 16.